

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



# THÈSE

PRESENTÉE

À L'UNIVERSITÉ ABOUBEKR BELKAID DE TLEMCEM

FACULTÉ DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

POUR OBTENIR LE DIPLOME DE

DOCTORAT EN CHIMIE

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUÉE

PAR

MEMMOU FAIZA (née MEMMOU)

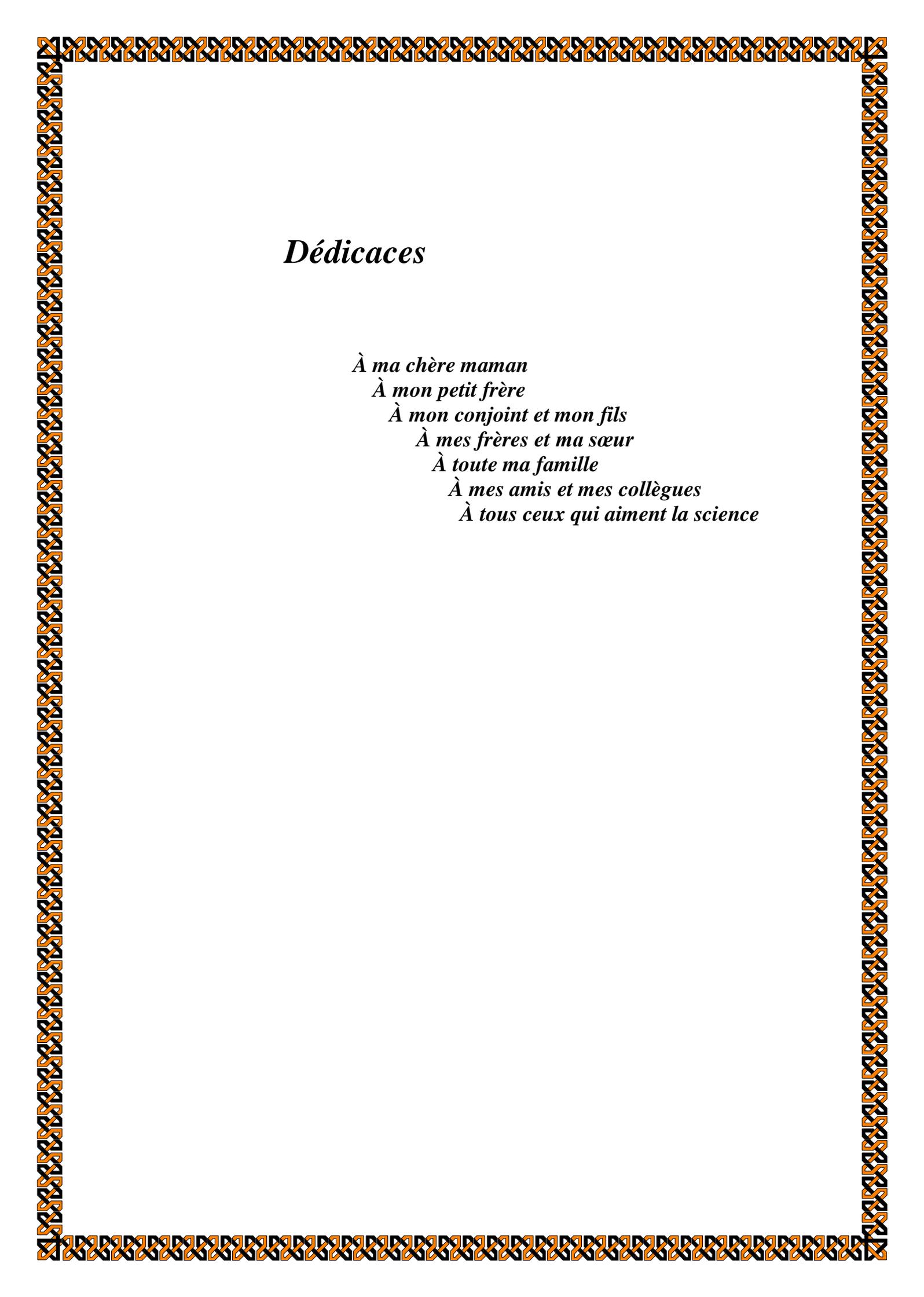
**SYNTHÈSE, ETUDES CINÉTIQUES ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DE  
DÉRIVÉS DE L'EUGENOL.  
COMPOSITION DE L'HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE DU CLOU DE GIROFLE**

Soutenue Le 05 décembre 2015 devant la commission d'examen

|                            |                     |   |
|----------------------------|---------------------|---|
| <b>Président</b>           | Pr. MANSRI ALI      | Université de Tlemcen                   |
| <b>Directrice de thèse</b> | Pr. MAHBOUB RADIA   | Université de Tlemcen                   |
| <b>Examineurs</b>          | Pr. ABDI KELTOUM    | Université de Sidi Bel-Abbès            |
|                            | Pr. BOUSSALEM SMAIN | Centre Universitaire de Aïn -Témouchent |
|                            | Pr. TABTI BOUFELDJA | Université de Tlemcen                   |
| <b>Invitée</b>             | Pr. MOKHTARI MALIKA | Université de Tlemcen                   |

ANNÉE UNIVERSITAIRE : 2015- 2016

**DEDICACES**



## *Dédicaces*

*À ma chère maman*

*À mon petit frère*

*À mon conjoint et mon fils*

*À mes frères et ma sœur*

*À toute ma famille*

*À mes amis et mes collègues*

*À tous ceux qui aiment la science*

# REMERCIEMENTS

## **REMERCIEMENTS**

*Louange à Allah, nous Le glorifions, Lui demandons aide et invoquons Son pardon contre le mal de nos pechés, celui qui fut guidé personne ne peut l'égarer et celui qui est égaré personne ne peut le guider. Je témoigne qu'il n'y a point de divinité digne d'adoration sauf Allah, l'Unique, qui n'a point d'associé et je témoigne aussi que Muhammed est Son Serviteur et Son Messager, que la bénédiction d'Allah soit sur Lui, sa famille, ses compagnons, et tous ceux qui le suivent sur le droit chemin jusqu'au Jour Dernier. Ensuite...*

*Je tiens à remercier vivement Madame le Professeur Radia Mahboub à Faculté des Sciences de l'Université Aboubaker Belkaid de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle m'a faite en acceptant la direction de ma thèse. Son dynamisme, sa disponibilité, son aide, ses précieux conseils, ses connaissances scientifiques m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches. Je la remercie, tout particulièrement, pour ses grandes qualités humaines et son soutien permanent, au long de ces années.*

*Je remercie Monsieur le Professeur Ali Mansri de Faculté des Sciences à l'Université de Aboubeker Belkaid de Tlemcen pour son aide et pour avoir bien voulu présider le jury et examiner ce travail.*

*Mes remerciements vont aussi à Madame le Professeur Keltoum Abdi à l'Université de Sidi Bel-Abbès, à Monsieur le Professeur Smail Boussalem à Centre Universitaire de Aïn – Témouchent, à Monsieur le Professeur Boufeldja Tabti à l'Université de Tlemcen et à Madame le Professeur Malika Mokhtari à l'Université de Tlemcen pour avoir accepté de rapporter et de juger mon travail. Je vous transmets ma profonde gratitude pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce document ainsi que pour vos remarques lors de ma soutenance.*

*Je remercie, également, Melle K. Fallah technicienne au laboratoire pédagogique de microbiologie et à toute l'équipe de chimie du laboratoire pédagogique de l'Université de Bécher et*

*aussi à toute l'équipe du laboratoire de LAMMABE (Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'agroalimentaire, Au Biomédical et à l'Environnement) de l'Université de Tlemcen.*

*Je remercie le laboratoire de Chimie Organique et Organométallique (ISM) de l'Université de Bordeaux-I pour les analyses GC-MS et RMN ; et je remercie, également le laboratoire de Chimie Thérapeutique de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Reims (URCA) pour les analyses RMN.*

*Un très grand merci à ma mère pour ses encouragements et son soutien tout au long de mes études et aussi pour ses innombrables sacrifices, à mes frères et ma sœur, à mon conjoint, à mon fils Mahdi Charaf Addine que j'adore pour tout ce qui m'apporte.*

*Je tiens à exprimer mes sincères gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Merci à toute ma famille pour leur soutien et leur amour qui m'ont permis d'aboutir au grade de Docteur en chimie organique et de devenir la personne que je suis.*

# RESUME

## Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la synthèse de dérivés de l'eugénol et de sa valorisation en tant qu'antioxydant et antibactérien. La préparation de dérivés de l'eugénol est réalisée en deux parties: la première est la synthèse du 6-bromoéugénol par l'action du LiBr sur l'eugénol en présence de  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  et conduit exclusivement au composé *orthomonobromé*. Le rendement du produit isolé est très élevé. Un mécanisme faisant appel à une substitution électrophile par l'anion  $\text{Br}^-$  est postulé, permettant l'interprétation de cette réaction de bromation régiosélective. La deuxième partie est la synthèse de l'acétate d'eugénol par l'action de l'anhydride acétique sur l'eugénol. Les rendements des produits obtenus sont variés. Nous proposons un mécanisme d'estérification.

L'évaluation de l'activité antioxydante de dérivés de l'eugénol par la méthode HPTLC, s'est révélée positive par l'apparition de taches jaunes sur la plaque CCM pulvérisées par le DPPH $\bullet$ . L'activité antioxydante des différents produits (6-bromoéugénol, acide ascorbique, eugénol et acétate d'eugényle) a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH $\bullet$  (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Les propriétés antioxydantes ont été mesurées et mises en évidence par la concentration d'inhibition  $\text{IC}_{50}$  et par la cinétique de réduction. Les résultats de la capacité de piégeage du radical libre DPPH $\bullet$  sont très intéressantes avec :  $\text{IC}_{50_{\text{BrEu}}} = 34.270 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{IC}_{50_{\text{AcAs}}} = 54.888 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{IC}_{50_{\text{Eu}}} = 130.485 \mu\text{g/mL}$ , et  $\text{IC}_{50_{\text{AcEu}}} = 0 \mu\text{g/mL}$ , respectivement avec des temps de réaction  $\text{TEC}_{50_{\text{BrEu}}} = 1.45\text{min}$ ,  $\text{TEC}_{50_{\text{AcAs}}} = 0.95\text{min}$ ,  $\text{TEC}_{50_{\text{Eu}}} = 1.55\text{min}$  et  $\text{TEC}_{50_{\text{AcEu}}} = 34\text{min}$ , qui corrélerent avec leurs structures chimiques. Les résultats obtenus montrent bien que le 6-bromoéugénol est l'antioxydant le plus efficace de cette série de produits.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur trois souches bactériennes selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les diamètres des zones d'inhibition dûs à la croissance microbienne au tour des disques représentent l'activité antimicrobienne maximale. Les résultats obtenus montrent bien que la souche de *Staphylococcus aureus* se révèle la plus résistante pour tous les échantillons. La souche d'*Escherichia coli* est plus résistante que la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

**Mots clés :** Synthèse de dérivés de l'eugénol, activité antibactérienne, activité antioxydante (HPTLC, DPPH).

# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....   | 1  |
| <b>CHAPITRE 1 : Propriétés des dérivés phénoliques. Synthèse de dérivés du l'eugénol</b> |    |
| 1.1. Généralités sur les phénols.....  | 4  |
| 1.2. Réactivité chimique des dérivés phénoliques.....                                    | 6  |
| 1.2.1. Réactivité liée aux propriétés de la liaison O-H.....                             | 7  |
| 1.2.1.1. Alkylation : Synthèse d'éthers aromatiques.....                                 | 7  |
| 1.2.1.2. Acylation : Synthèse d'esters aromatiques.....                                  | 8  |
| 1.2.2. Réactivité liée aux propriétés du noyau aromatique et autres réactions.....       | 9  |
| 1.2.2.1. Réaction de substitution électrophile aromatique.....                           | 9  |
| 1.2.2.2. Réaction de bromation.....  | 10 |
| 1.2.2.2. a. Monobromation en position <i>para</i> du phénol.....                         | 11 |
| 1.2.2.3. Réarrangement de Claisen.....   | 11 |
| 1.3. Eugénol.....  | 12 |
| 1.3.1. Présentation.....   | 12 |
| 1.3.2. Propriétés physico-chimiques.....   | 13 |
| 1.3.3. Propriétés biologiques.....   | 13 |
| 1.3.4. Toxicité.....   | 13 |
| 1.3.5. Sources.....  | 13 |
| 1.3.5.1. Sources naturelles de l'eugénol.....  | 13 |
| 1.3.5.1. a. <i>Extraction de l'eugénol</i> .....   | 15 |

|  |    |
|--|----|
| 1.3.5.1.b. <i>Mécanisme de réaction</i> .....  | 16 |
| 1.3.5.1.c. <i>Biosynthèse des phénylpropanoïdes</i> .....  | 17 |
| 1.3.5.1.d. <i>Biosynthèse de l'allylphénol dans <i>Ocimum basilicum</i> L. : eugénol et méthyleugénol</i> .... | 18 |
| 1.3.5. 2. Sources industrielles ou synthétiques de l'eugénol.....  | 19 |
| 1.3.6. Médicaments contenant de l'eugénol.....   | 19 |
| 1.3.7. Réactivité chimique de l'eugénol et ses dérivés.....  | 20 |
| 1.3.7.1. Synthèse de vanilline .....   | 20 |
| 1.3.7.2. Synthèse de l'impéranène.....   | 21 |
| 1.3.7.3. Synthèse des ciments dentaires.....   | 22 |
| 1.3.7.4. Synthèse de l'époxyde d'eugénol.....  | 23 |
| 1.3.7.5. Synthèse d'acétate d'eugényle ou éthanoate d'eugényle.....  | 24 |
| 1.3.7.6. Synthèse de dérivés du pyrazole.....  | 25 |
| 1.3.7.7. Synthèse 7-hydroxy-3',4'-diméthoxyisoflavon.....  | 26 |
| 1.3.7.8. Synthèse du phthalocyanine.....   | 27 |
| 1.4. Résultats et discussions.....   | 29 |
| 1.4.1. Eugénol et ses dérivés.....   | 30 |
| 1.4.2. Synthèse d'acétate d'eugényle ou éthanoate d'eugényle.....  | 30 |
| 1.4.3. Synthèse du 6-bromoeugénol.....   | 34 |
| 1.4.4. Essais de réactions de substitutions électrophiles aromatiques.....                                     | 38 |
| 1.4.5. Conclusion.....   | 39 |
| 1.5. PARTIE EXPERIMENTALE.....   | 40 |
| Références Bibliographiques.....   | 45 |

## CHAPITRE 2 : Etude antioxydante et antibactérienne

### Partie I. Evaluation de l'activité antioxydante des dérivés de l'eugénol et études cinétiques.

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 2. Activité antioxydante..... | 48 |
|-------------------------------|----|

|   |    |
|---|----|
| 2.1. Introduction.....  | 48 |
| 2.2. Les radicaux libres et le stress oxydant.....                          | 48 |
| 2.2.1. Le stress oxydant.....   | 48 |
| 2.2.1.1. Introduction.....  | 48 |
| 2.2.1.2. Définition.....  | 48 |
| 2.2.2. Les radicaux libres.....   | 48 |
| 2.2.2.1. Définition.....  | 48 |
| 2.2.2.2. Nature des radicaux libres .....                                   | 49 |
| 2.2.2.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) .....              | 49 |
| 2.2.2.2.1.a. Ion superoxyde.....  | 49 |
| 2.2.2.2.1.b. Radical libre hydroxyle: HO•.....                              | 49 |
| 2.2.2.2.1.c. Oxygène singulet: $^1\text{O}_2$ .....                         | 50 |
| 2.3. Antioxydants.....  | 50 |
| 2.3.1. Définition.....  | 50 |
| 2.3.2. Utilisation des antioxydants.....                                    | 51 |
| 2.3.3. Additifs alimentaires.....   | 51 |
| 2.4. Classification des antioxydants.....                                   | 51 |
| 2.4.1. Antioxydants de synthèses.....                                       | 52 |
| 2.4.2. Substances synergiques.....  | 52 |
| 2.4.3. Antioxydants d'origine végétale.....                                 | 53 |
| 2.4.3.1. Acide ascorbique ou la vitamine C et ses dérivés : (SIN 300) ..... | 53 |
| 2.4.3.2. Tocophérols .....  | 54 |
| 2.4.3.3. Exemple :Vitamine E .....  | 54 |
| 2.4.3.4. Caroténoïdes .....   | 55 |
| 2.4.3.5. Composés phénoliques .....   | 56 |
| 2.4.3.5.a. Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3) .....                        | 57 |

|   |    |
|---|----|
| 2.4.3.5.a <sub>1</sub> . Acides hydroxybenzoïques C6-C1.....                      | 58 |
| 2.4.3.5.a <sub>2</sub> . Acides hydroxycinnamiques C6-C3 .....                    | 58 |
| 2.4.3.5.b. Flavonoïdes C6-C3-C6 .....   | 59 |
| 2.4.3.5.c. Coumarines C6-C3.....  | 60 |
| 2.4.3.5.d. Tannins.....   | 60 |
| 2.4.3.6. Composés phénoliques des raisins.....                                    | 60 |
| 2.4.3.7. Composés phénoliques des margines .....                                  | 62 |
| 2.4.3.8. Composés phénoliques des feuilles d'olivier.....                         | 62 |
| 2.4.3.9. Composés phénoliques extraits de végétaux (épices).....                  | 63 |
| 2.5. Mécanismes d'action des antioxydants.....                                    | 64 |
| 2.5.1. Antioxydants primaires ou distributeurs de chaîne.....                     | 64 |
| 2.5.2. Antioxydants secondaires.....  | 64 |
| 2.6. Différents types d'antioxydants.....   | 65 |
| 2.6.1. Antioxydants de type I.....  | 65 |
| 2.6.2. Antioxydants de type II.....   | 65 |
| 2.6.3. Antioxydants de type III.....  | 65 |
| 2.6.4. Antioxydants synthétiques .....  | 65 |
| 2.7. Efficacité des antioxydants .....  | 67 |
| 2.7.1. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests <i>in vitro</i> ..... | 67 |
| 2.7.2. Tests les moins fréquemment cités dans la littérature .....                | 67 |
| 2.7.2.1. Test Rancimat .....  | 67 |
| 2.7.2.2. $\beta$ -carotène comme indicateur d'oxydation .....                     | 67 |
| 2.7.2.3. Dosage des TBARS .....   | 68 |
| 2.7.2.4. Test de crocine .....  | 68 |
| 2.7.3. Tests les plus utilisés .....  | 68 |
| 2.7.3.1. Test de réduction du radical-cation ABTS <sup>+</sup> • ou TEAC.....     | 69 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.7.3.2. Test de capture des radicaux peroxydes : TRAP et ORAC .....                                   | 70  |
| 2.7.3.3. Test FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ).....                                   | 72  |
| 2.7.3.4. Test de réduction du radical stable, DPPH <sup>•</sup> (2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl)..... | 72  |
| 2.7.4. Comparaison des tests les plus utilisés .....   | 80  |
| 2.7.5. Effet des antioxydants sur la santé humaine .....   | 80  |
| 2.7.6. Conclusion.....   | 81  |
| 2.8. Résultats et discussion.....  | 82  |
| 2.8.1. Evaluation de l'activité antioxydante .....   | 82  |
| 2.8.2. Méthode chromatographique CCM (test au DPPH <sup>•</sup> ) .....                                | 82  |
| 2.8.3. Test antioxydant par quantification spectrophotométrique DPPH <sup>•</sup> .....                | 83  |
| 2.8.4. Détermination du pourcentage d'inhibition .....   | 83  |
| 2.8.5. Détermination d'IC <sub>50</sub> .....  | 85  |
| 2.8.6. Suivi cinétique de la réaction de piégeage des radicaux libres DPPH <sup>•</sup> .....          | 86  |
| 2.8.6.1. Courbe d'étalonnage de la solution du DPPH <sup>•</sup> .....                                 | 86  |
| 2.8.6.2. Étude cinétique.....  | 87  |
| 2.8.6.3. Détermination d'EC <sub>50</sub> .....  | 95  |
| 2.8.6.4. Détermination du temps d'équilibre TEC <sub>50</sub> .....                                    | 97  |
| 2.8.7. Conclusions.....  | 91  |
| 2.9. Matériel et méthodes .....  | 103 |
| Références Bibliographiques.....   | 109 |
| Annexe 1.....  | 117 |
| <br>   |     |
| <b>Partie II. Evaluation de l'activité antibactérienne</b>   |     |
| 2.10. Activité antimicrobienne.....  | 119 |
| 2.10.1. Généralités .....  | 119 |
| 2.10.2. Culture des bactéries .....  | 119 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.10.3. Antibiotiques .....   | 119 |
| 2.10.3.1. Classification des antibiotiques.....   | 119 |
| 2.10.3.2. Activité antimicrobienne sur les extraits des plantes et les produits synthétiques..... | 120 |
| 2.10.3.3. Description des bactéries étudiées.....   | 120 |
| 2.10.3.3.a. <i>Escherichia coli</i> .....   | 120 |
| 2.10.3.3.b. <i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 121 |
| 2.10.3.3.c. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....   | 121 |
| 2.11. Résultats et discussions .....  | 122 |
| 12.11.1. Activité antimicrobienne ( <i>in vitro</i> ).....  | 122 |
| 2.11.1.1. Sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).....                                      | 122 |
| 2.11.1.2. Test comparatif par antibiogramme.....  | 123 |
| 2.11.1.3. Pouvoir antimicrobien.....  | 124 |
| 2.11.1.4 .Etude de l'effet antimicrobien par la méthode de disque.....                            | 124 |
| 2.11.1.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....                      | 130 |
| 2.11.1.6. Conclusion.....   | 132 |
| 2.12. Matériel et méthodes.....   | 132 |
| Références Bibliographiques.....  | 138 |
| Annexe 2.....   | 140 |

**CHAPITRE 3 : Propriétés de quelques huiles essentielles. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle.**

|  |     |
|--|-----|
| 3. Huiles essentielles .....                                   | 142 |
| 3.1. Introduction .....  | 142 |
| 3.2. Définition .....  | 142 |
| 3.3. Localisation des huiles essentielles dans la plante ..... | 143 |
| 3.4. Rôles et propriétés des huiles essentielles .....         | 144 |
| 3.5. Composition chimique .....                                | 144 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.5.1. Terpénoïdes.....  | 145 |
| 3.5.2. Phénylpropanoïdes.....  | 146 |
| 3.5.2.1. Notion de chémotype .....   | 146 |
| 3.6. Propriétés physico-chimiques .....  | 147 |
| 3.7. Caractéristiques économiques.....   | 147 |
| 3.8. Caractéristiques traditionnelles .....  | 148 |
| 3.9. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles .....                           | 148 |
| 3.9.1. Facteurs intrinsèques liés à l'espèce.....  | 148 |
| 3.9.2. Facteurs extrinsèques liés à la méthode.....  | 149 |
| 3.10. Toxicité des huiles essentielles .....   | 149 |
| 3.11. Activités biologiques des huiles essentielles .....  | 149 |
| 3.11.1. Activité antioxydante .....  | 150 |
| 3.11.2. Activité antibactérienne.....  | 150 |
| 3.12. Méthodes d'extraction et d'identification des composés des huiles essentielles .....             | 151 |
| 3.12.1 Méthodes d'extraction.....  | 151 |
| 3.12.1.1. Distillation.....  | 151 |
| 3.12.1.1.a. <i>Distillation par entraînement à la vapeur d'eau</i> .....                               | 151 |
| 3.12.1.1.b. <i>Principe de l'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles</i> .....          | 152 |
| 3.12.1.1.c. <i>Extraction par Distillation à l'eau ou hydro distillation d'huile essentielle</i> ..... | 154 |
| 3.12.1.1.d. <i>Hydrodiffusion</i> .....  | 156 |
| 3.12.1.2. Expression à froid.....  | 156 |
| 3.12.1.3. Extraction par solvants organiques.....  | 156 |
| 3.12.1.4. Extraction par fluide à l'état supercritique.....  | 157 |
| 3.12.1.5. Extraction assistée par micro-ondes.....   | 158 |
| 3.12.2.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....   | 159 |
| 3.12.2.2 Couplage chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM).....                   | 159 |

|  |            |
|--|------------|
| 3.13. Clou de girofle .....                                    | 160        |
| 3.13.1. Histoire et présentation .....                         | 160        |
| 3.13.2. Huile essentielle du clou de girofle .....             | 162        |
| 3.13.2.1. Description, Extraction, Composition et Analyse..... | 162        |
| 3.13.2.2. Propriétés biologiques.....                          | 163        |
| 3.14. Résultats et discussions .....                           | 164        |
| 3.14.1. Huile essentielle .....                                | 164        |
| 3.14.1.1. Rendement en huile essentielle .....                 | 164        |
| 3.14.1.2. Analyse de l'huile essentielle .....                 | 167        |
| 3.14.1.2.1. Analyse CCM.....                                   | 167        |
| 3.14.1.2.2 Analyse par CG-MS.....                              | 168        |
| 3.15. Matériel et méthodes .....                               | 172        |
| Références Bibliographiques.....                               | 175        |
| <b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>               | <b>180</b> |

# LISTE DES ABREVIATIONS

## LISTE DES ABREVIATIONS

- AAI** : Indice de l'activité antioxydant
- AAR** : Activité anti-radicalaire
- Abs** : Absorbance
- ABTS+•** : 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AFNOR** : Norme de l'Association Française de Normalisation
- ArOCH<sub>3</sub>** : Ether méthylique de phénol
- ARP** : Pouvoir anti-radicalaire
- ATCC**: American Type Collection Culture
- A<sub>517</sub>** : Absorbance à 517 nm
- BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O**: trifluorure de bore ; éther
- BN** : Bouillon nutritive
- BHA** :Butylhydroxyanisole
- BHT** : Butylhydroxytoluène
- CCM** : Chromatographie sur couche mince
- CDCl<sub>3</sub>**: Deutérochloroforme
- C<sub>f</sub>** : Concentration finale
- CMI**: Concentration minimale inhibitrice
- Cu(OAc)<sub>2</sub>** : Acétate de Cuivre (II)
- DBDMH** : 1,3-dibromo-5,5-diméthylhydantoïne
- DMF**: *N,N*-diméthylformamide
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DMS**: Diméthylsulfate
- DO**: Densité optique
- DPPH•**: 2, 2-Diphényl-1-picrylhydrazyle
- EC<sub>50</sub>**: Concentration efficace
- FRAP**: Ferric Reducing Ability of Plasma
- g**: Gramme
- GC** : Chromatographie en phase gazeuse
- GN** :Gélose Nutritive

**HES** : huiles essentielles

**HPLC** : Chromatographie liquide haute performance

**HPTLC**: Hight Performance Thin Layer Chromatography

**IC50**: Concentration inhibitrice à 50%.

***i*-PrMgCl** : Chlorure isopropylmagnésium

**IR** : Infra Rouge

**K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de potassium

**KMnO<sub>4</sub>** : Permanganate de potassium

**L-DOPA** :(L)-3,4-dihydroxyphénylalanine

**LiBr** : Bromure de lithium

**mg** : milligramme

**MH** :Gélose Müeller Hinton

**min** : minute

**ml** :Millilitre

**mm** :millimètre

**MR** : Rapport Molaire

**NaCl** : Chlorure de sodium

**nm** :Nanomètre

**NRD** : Nombre de DPPH• réduit

**OH•**: Radical hydroxyle.

**OMS** :Organisation mondiale de santé

**ORAC**: Oxygen Radical Absorbance Capacity

***p*** : *para*

**Pf** : Température de fusion

**Rdt**: Rendement

**Rf** : Rapport frontal

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**RNA** : Acide ribonucléique

**ROS**: Espèces réactives de l'oxygène

**SD** : Standard déviation

**SM** : Spectrométrie de masse

**S<sub>N</sub>1** : Substitution Nucléophile aromatique type 1

**S<sub>N</sub>2** : Substitution Nucléophile aromatique type 2

**SV** : Valeur stœchiométrique

**TBABr<sub>3</sub>** : Tribromure de tétrabutylammonium

**TBARS**: Acide thiobarbiturique

**TEAC** : Capacité Antioxydante Equivalente au Trolox

**TEC50** : Temps nécessaire pour aboutir la concentration EC50

**Teq** : Temps d'équilibre (Plateau)

**THF** : Tétrahydrofurane

**TMS** : Tétraméthylsilane

**TRAP**: Total Radical Trapping Antioxidant Potential

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UV**: Ultra violet

**μl** :Microlitre

**%** :Pourcentage

# LISTE DES TABLEAUX

# LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE 1 : Propriétés des dérivés phénoliques. Synthèse de dérivés du l'eugénol

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1.1</b> : Pourcentages de l'eugénol dans l'huile essentielle de différentes plantes | 14 |
| <b>Tableau 1.2</b> : Caractéristiques des composés <b>3A</b> et <b>3B</b>                      | 33 |

## CHAPITRE 2 : Etude antioxydante et antibactérienne

### Partie I. Evaluation de l'activité antioxydante des dérivés de l'eugénol et études cinétiques.

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 2.1</b> : Classification des additifs alimentaires  | 51 |
| <b>Tableau 2.2</b> : Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse  | 52 |
| <b>Tableau 2.3</b> : Effet synergique de l'association de plusieurs antioxydants   | 53 |
| <b>Tableau 2.4</b> : Les principales classes de composés phénoliques   | 57 |
| <b>Tableau 2.5</b> : Quelques composés phénoliques à activité antioxydante dans les épices   | 63 |
| <b>Tableau 2.6</b> : Structures de quelques antioxydants synthétiques  | 66 |
| <b>Tableau 2.7</b> : Protocoles utilisés pour la mesure de l'activité antioxydante   | 79 |
| <b>Tableau 2.8</b> . Résultats cinétique du piégeage de radicaux libres et activité antioxydante de l'eugénol, ses dérivés et l'huile essentielle du clou de girofle (sec) | 94 |
| <b>Tableau 2.9</b> . Paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH•   | 98 |

### Partie II. Evaluation de l'activité antibactérienne

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 2.10</b> : Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm).   | 123 |
| <b>Tableau 2.11</b> : Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents échantillons : l'huile essentielle de clou de girofle, l'eugénol, l'acétate d'eugényle (eugenol et huile essentielle) et le 6-bromoeugénol (diamètre de la zone d'inhibition en mm).  | 127 |
| <b>Tableau 2.12</b> : Résultats de l'activité antibactérienne des différents échantillons (l'huile essentielle de clou de girofle (sec), l'eugénol, l'acétate d'eugényle (source eugénol commercial), l'acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec) et le 6-bromoeugénol (diamètre de la zone d'inhibition en mm). | 131 |
| <b>Tableau 2.13</b> : Souches bactériennes testées.  | 133 |
| <b>Tableau 2.14</b> : Résultats d'identification des souches testés  | 134 |

## CHAPITRE 3 : Propriétés de quelques huiles essentielles. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle.

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tableau 3.1</b> . Rendement du clou de girofle d'Eugenia Caryophyllata (le giroflier).  | 165 |
| <b>Tableau 3.2</b> : Temps de rétention, surface mesurée, composition et masse molaire des différents composés obtenus par analyse chromatographique en phase gazeuse de l'huile essentielle du clou de girofle. | 170 |
| <b>Tableau 3.3</b> . Composition chimique de différentes huiles essentielles extraites du giroflier.   | 171 |

# LISTE DES FIGURES

# LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1 : Propriétés des dérivés phénoliques. Synthèse de dérivés du l'eugénol

|  |    |
|--|----|
| Figure 1.1 : Structures de quelques phénols  | 4  |
| Figure 1.2 : Obtention de la Bakélite  | 5  |
| Figure 1.3 : Synthèse de l'acide salicylique   | 5  |
| Figure 1.4 : Structure de la vanilline   | 6  |
| Figure 1.5 : Structure du phénol   | 7  |
| Figure 1.6 : Formation de l'ion phénate  | 7  |
| Figure 1.7 : Synthèse de Williamson  | 7  |
| Figure 1.8 : Synthèse méthylphényl éther   | 8  |
| Figure 1.9 : Synthèse <i>t</i> -butylphényl éther  | 8  |
| Figure 1.10 : Synthèse d'esters aromatiques  | 9  |
| Figure 1.11 : Schéma général de SEAr   | 9  |
| Figure 1.12 : Bromation du phénol  | 10 |
| Figure 1.13 : Monobromation en position <i>para</i> du phénol  | 11 |
| Figure 1.14 : Réarrangement de Claisen   | 12 |
| Figure 1.15 : Formule semi-développée de l'eugénol   | 12 |
| Figure 1.16 : Structure et sources de l'eugénol  | 14 |
| Figure 1.17 : Couple eugénol/eugénate de sodium avec leur solubilité respective                                    | 15 |
| Figure 1.18 : Extraction de l'eugénol  | 16 |
| Figure 1.19 : Solubilisation de l'eugénol. a) milieu basique, b) milieu acide                                      | 17 |
| Figure 1.20 : Voie biosynthétique des principaux phénylpropanoïdes   | 18 |
| Figure 1.21 : Biosynthèse de l'eugénol et le méthyleugénol dans <i>Ocimum basilicum</i> L.                         | 19 |
| Figure 1.22 : Synthèse du (6-allyl-2-méthoxyphénol) à partir de gaiacol  | 19 |
| Figure 1.23 : Synthèse de quelques dérivés de l'eugénol  | 20 |
| Figure 1.24 : Synthèse de vanilline  | 21 |
| Figure 1.25 : Synthèse de l'impéranène   | 21 |
| Figure 1.26 : Déshydratation de l'hydrate de zinc  | 22 |
| Figure 1.27 : Préparation de ciment  | 23 |
| Figure 1.28 : Synthèse de l'époxyde d'eugenol  | 24 |
| Figure 1.29 : Synthèse d'acétate d'eugényle  | 25 |
| Figure 1.30 : Synthèse de dérivés du pyrazole. (a) Et <sub>3</sub> N, solvant, reflux, 48h                         | 26 |
| Figure 1.31 : Synthèse du 7-hydroxy-3',4'-diméthoxyisoflavon   | 27 |
| Figure 1.32 : Synthèse du phthalocyanines  | 28 |
| Figure 1.33 : Groupes fonctionnels d'eugénol   | 29 |
| Figure 1.34 : Structures de dérivés de l'eugénol   | 30 |
| Figure 1.35 : Synthèse d'acétate d'eugényle  | 31 |
| Figure 1.36 : Mécanisme réactionnel de synthèse de l'acétate d'eugényle  | 32 |
| Figure 1.37 : Spectre infrarouge de d'acétate d'eugényle <b>3A</b> (source : huile essentielle du clou de girofle) | 33 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1.38</b> : Spectre infrarouge de d'acétate d'eugényle <b>3B</b> (source : eugénol commercial) | 34 |
| <b>Figure 1.39</b> : Déplacements chimiques du proton d'acétate d'eugényle <b>3B</b>                    | 34 |
| <b>Figure 1.40</b> : Oxybromation de l'eugénol  | 35 |
| <b>Figure 1.41</b> : Mécanisme réactionnel de l'oxybromation  | 36 |
| <b>Figure 1.42</b> : Déplacements chimiques du proton du 6-bromoéugénol                                 | 37 |
| <b>Figure 1.43</b> : Déplacements chimiques du carbone 13 du 6-bromoéugénol                             | 37 |
| <b>Figure 1.44</b> : Formation du pic ion du 6-bromoéugénol   | 38 |
| <b>Figure 1.45</b> : Réactions de substitutions électrophiles aromatiques eugénol                       | 38 |

## **CHAPITRE 2 : Étude antioxydante et antibactérienne**

### **Partie I. Evaluation de l'activité antioxydante des dérivés de l'eugénol et études cinétiques.**

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 2.1</b> : Oxydation de l'acide L-ascorbique  | 53 |
| <b>Figure 2.2</b> : Structure chimique vitamine E (tocophérols)  | 55 |
| <b>Figure 2.3</b> : Structure des principaux caroténoïdes  | 56 |
| <b>Figure 2.4</b> : Structure de l'acide benzoïque   | 57 |
| <b>Figure 2.5</b> : Structure de l'acide cinnamique  | 57 |
| <b>Figure 2.6</b> : Structure des acides hydroxybenzoïques   | 58 |
| <b>Figure 2.7</b> : Structure des acides hydroxycinnamiques  | 58 |
| <b>Figure 2.8</b> : Structure de base des flavonoïdes  | 59 |
| <b>Figure 2.9</b> : Structure des acides hydroxycinnamiques du raisin  | 61 |
| <b>Figure 2.10</b> : Monomères du raisin   | 61 |
| <b>Figure 2.11</b> : Proanthocyanidols   | 62 |
| <b>Figure 2.12</b> : Structure de l'oleuropéine  | 63 |
| <b>Figure 2.13</b> : Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyrosol  | 64 |
| <b>Figure 2.14</b> : Structure du $\beta$ -carotène  | 68 |
| <b>Figure 2.15</b> : Structure du malondialdéhyde MDA  | 68 |
| <b>Figure 2.16</b> : Formation et piégeage du radical ABTS <sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de H <sup>•</sup> et la Structure du radical-cation ABTS <sup>•+</sup>   | 70 |
| <b>Figure 2.17</b> : Génération de radicaux peroxydes à partir de l'AAPH   | 71 |
| <b>Figure 2.18</b> : Structure du radical stable DPPH <sup>•</sup>   | 72 |
| <b>Figure 2.19</b> : Spectre d'absorption du radical DPPH <sup>•</sup>   | 73 |
| <b>Figure 2.20</b> : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH <sup>•</sup>   | 73 |
| <b>Figure 2.21</b> : Evolution du spectre du DPPH <sup>•</sup> lors de sa réduction par l'acide dihydrocافئique  | 74 |
| <b>Figure 2.22</b> : Mécanisme proposé pour la réaction de l'acide ascorbique et le DPPH <sup>•</sup>  | 77 |
| <b>Figure 2.23</b> : Mécanisme proposé pour la réaction entre le BHT et le DPPH <sup>•</sup>   | 78 |
| <b>Figure 2.24</b> : Mécanisme proposé pour la réaction entre l'eugénol et le DPPH <sup>•</sup> . Réaction [1] : donation de seconde hydrogène ; Réaction [2] : dimerisation ; Réaction [3] : complexation   | 79 |
| <b>Figure 2.25</b> : Plaques CCM des composés suivants. A : eugénol et 6-bromoéugénol. B : eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle du clou de girofle (sec) pulvérisées par DPPH <sup>•</sup> (0.004 %) et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10 %), (A/B : Toluène/ MeOH) | 83 |
| <b>Figure 2.26</b> : Réaction de piégeage des radicaux libres par DPPH <sup>•</sup>  | 83 |

**Figure 2.27 :** Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH• en fonction des concentrations pour : a) % DPPH1: acide ascorbique, % DPPH2: 6-bromoéugénol et % DPPH3: eugénol. b) AcEu : acétate d'eugényle, HE : huile essentielle du clou de girofle (sec) 85

**Figure 2.28 :** Histogrammes représentant les valeurs d'IC50 en fonction des antioxydants 86

**Figure 2.29 :** Courbe d'étalonnage de la solution de DPPH• 87

**Figure 2.30:** Cinétique de réduction du radical DPPH•. A : Acide ascorbique (vitamine C); B : 6-bromoéugénol; C : Eugénol et D : Acétate eugényle et E : Huile essentielle du clou de girofle (sec) 89

**Figure 2.31:** Etudes cinétiques de DPPH• par les antioxydants. a) Acide ascorbique, b) 6-bromoéugénol, c) Eugénol et d) Acétate d'eugényle et e) Huile essentielle du clou de girofle (sec) 93

**Figure 2.32:** Détermination d'EC50 de différents antioxydants utilisés. a) Acide ascorbique, b) 6-Bromoéugénol, c) Eugénol et d) Acétate d'eugényle 97

**Figure 2.33:** Stabilisation d'un radical phénoxy 98

#### Partie II. Evaluation de l'activité antibactérienne

**Figure 2.34 :** Valeurs moyennes des diamètres du test d'antibiogramme. Genta : gentamicine, Amp10 : ampicilline, P10 : pénicilline et C30 : chloramphénicol. S1: *P. aeruginosa*, S2: *E.coli*, S3: *S. aureus*. 123

**Figure 2.35:** Zones d'inhibitions obtenues par l'action des antibiotiques sur les souches testées. (1) : Gentamicine Genta, (2) : Ampicilline Amp10, (3) : Pénicilline P10 et (4) : Chloramphénicol C30. 124

**Figure 2.36:** Valeurs moyennes des diamètres de l'activité antibactérienne de : a) l'huile essentielle extraite du clou de girofle (sec), b) l'eugénol, c) l'acétate d'eugénol (source eugénol commercial), d) l'acétate d'eugénol (source huile essentielle extraite du clou de girofle) et e) le 6-bromoéugénol. S1: *P. aeruginosa*, S2: *E.coli*, S3: *S. aureus* 126

**Figure 2.37: a)** Zones d'inhibition obtenues par les trois témoins réalisés par la méthode de diffusion sur la gélose. A : *Staphylococcus aureus*, B : *Escherichia coli* et C : *Pseudomonas aeruginosa*. **b)** Effets des différents échantillons sur la *Pseudomonas aeruginosa* (S1) (Zone d'inhibition obtenue par méthode de diffusion sur gélose). A: Huile essentielle de clou de girofle (sec), B : Eugénol, C : Acétate d'eugényle (source eugénol commercial), D : Acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec) et E: 6-bromoéugénol. 129

**Figure 2.38 :** Principe de la méthode de diffusion par disque. 136

### CHAPITRE 3 : Propriétés de quelques huiles essentielles. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle.

**Figure 3.1.** Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. (A) : poil sécréteur de *Mentha pulegium*, (B) : trichome glandulaire de *Mentha pulegium*, (C) : trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* et (D) : structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris* 143

**Figure 3.2.** Structure de la molécule d'isoprène 146

**Figure 3.3.** Structure de quelques composés des huiles essentielles (A) : monoterpénoïdes, (B) : sesquiterpénoïdes et (C) : phénylpropanoïdes 146

**Figure 3.4 :** Montage de distillation par entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle 152

**Figure 3.5 :** Evolution des températures de distillation de l'eau et l'huile essentielle, et du mélange eau/huile essentielle en fonction de la pression du milieu 153

**Figure 3.6 :** Répartition de l'eau (E) et de l'huile essentielle (H) entre les phases liquide et vapeur en fonction de la pression lors de l'hydrodistillation 154

**Figure 3.7 :** Montages de l'hydrodistillation pour l'extraction de l'huile essentielle :a) réalisé au laboratoire ; b) pris littérature. 155

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 3.8 :</b> Schéma du procédé d'hydrodiffusion   | 156 |
| <b>Figure 3.9:</b> Montage d'extraction par fluide à l'état supercritique d'huile essentielle.   | 158 |
| <b>Figure 3.10:</b> Montage d'extraction assistée par micro-onde.  | 158 |
| <b>Figure 3.10:</b> Chromatographie en phase gazeuse(CPG).   | 160 |
| <b>Figure 3.12:</b> Illustrations du Giroflier et des clous de girofle. a) giroflier, b) fleurs fraîches de girofle, c) clou de girofle (sec), et d) graines de girofle                  | 161 |
| <b>Figure 3.13:</b> Composés principaux dans l'huile essentielle des clous de girofle  | 163 |
| <b>Figure 3.14.</b> Histogramme de la matière fraîche et sèche.  | 165 |
| <b>Figure 3.15 :</b> Effet du chlorure de sodium sur l'eugénol.  | 166 |
| <b>Figure 3.16 :</b> CCM. A droite : l'huile essentielle du clou de girofle, au milieu : l'eugénol, et à gauche : l'acétate d'eugényle. Rf acétate d'eugénol = 0.94 ; Rf eugénol = 0.66. | 167 |
| <b>Figure 3.17 :</b> CCM. A droite : l'huile essentielle du clou de girofle, au milieu : l'eugénol, et à gauche : l'acétate d'eugényle. Rf acétate d'eugénol = 0.94 ; Rf eugénol = 0.66. | 168 |
| <b>Figure 3.18:</b> Chromatogramme de l'huile essentielle extraite du clou de girofle obtenu par CG/ MS.   | 169 |

# INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION GENERALE

De nombreuses espèces chimiques présentes dans la nature sont importantes pour l'homme qui, au cours de son histoire, a cherché à les exploiter. C'est la raison d'être des approches expérimentale et historique de l'extraction. Les besoins et les impératifs économiques ont amené l'homme à ne pas se limiter aux ressources naturelles et à élaborer une chimie de synthèse. Que ce soit dans divers domaines comme l'agriculture, l'habillement, l'hygiène et la santé ou le sport. Les produits manufacturés sont élaborés le plus souvent à base de composés organiques synthétisés. Les exemples de synthèse présentés ou réalisés sont pris en chimie organique, par exemple : synthèse d'un polymère, d'un médicament, d'un colorant, d'un arôme ou d'un savon.

Dès le début du XIX<sup>e</sup> siècle, les chimistes avaient réussi à isoler des huiles moyennes du goudron de houille, agitées avec une solution concentrée de soude, un composé défini. La couche aqueuse, additionnée d'un acide minéral, laissait déposer une huile dont la distillation fractionnée fournissait en tête un composé bouillant à 175 °C et cristallisant par refroidissement pour fondre de nouveau aux environs de 40 °C. En raison de la nature du procédé d'extraction, on considérait ce composé comme un acide ; il fut appelé d'abord acide carbolique (F. F. Runge, 1834), puis acide phénique (A. Laurent, 1841) [1]. Lorsqu'il fut établi qu'il ne comportait pas, comme la plupart des acides organiques alors connus, un groupe carboxylique dans sa structure, C. F. Gerhardt proposa de l'appeler « phénol », nom qui a peu à peu détrôné celui d'acide phénique encore partiellement en usage en 1930. Le mot « phénol » est tout à fait conforme à la nomenclature officielle ; en effet, le phénol C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH, résulte du remplacement dans le benzène (dont le nom officiel, mais inusité, est « phène ») d'un hydrogène par un hydroxyle.

Le phénol est le plus simple des dérivés hydroxylés d'un noyau benzénoïde, et le nom générique de phénols désigne l'ensemble des composés portant un hydroxyle sur un tel noyau. En dehors du phénol lui-même, les huiles moyennes du goudron de houille renferment divers homologues, notamment les crésols et les xylénols ; les huiles lourdes contiennent de petites quantités de naphthols (phénols portant un hydroxyle sur le noyau naphthalénique).

D'autres phénols sont présents dans les huiles essentielles, par exemple le thymol de l'essence de thym. On rencontre aussi, dans les essences naturelles des éthers méthyliques de phénols (ArOCH<sub>3</sub>), dont la déméthylation conduit au phénol (ArOH). Le règne végétal fournit

également des phénols, des polyphénols et des composés portant à côté d'autres fonctions (acide salicylique, acide gallique), des hydroxyles nucléaires, qui sont parfois libres, mais le plus souvent engagés sous forme d'éther-oxydes ou d'hétérosides.

Les phénols et ses dérivés sont les constituants majoritaires des huiles essentielles de quelques plantes et sont à l'origine des aromes caractéristiques des condiments tels les clous de girofle, la cannelle et la vanille. Ils sont des métabolismes secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres. Ils sont présents dans toutes les parties supérieures des végétaux (elles sont souvent plus concentrées dans les brindilles, fleurs et les graines) [2]. Nous citons comme exemples l'acide salicylique, l'eugénol, la vanilline, etc... Actuellement, l'eugénol et ses dérivés présentent un intérêt considérable en synthèse organique du fait de leur présence dans certaines molécules, dont les applications sont nombreuses et variées (Pharmacologique, biologique, cosmétique, agriculture, etc.).

Le sujet de la thèse s'inscrit dans le cadre : synthèse, études cinétiques et évaluation de l'activité de dérivés de l'eugénol. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle.

Ce travail est structuré en trois chapitres importants :

Le premier chapitre est structuré en deux parties :

- La première partie est consacrée aux résultats de la littérature sur la synthèse et l'utilisation en synthèse de l'eugénol et ses dérivés.
- La deuxième partie illustre la préparation de l'eugénol et ses dérivés (le matériel et les méthodes utilisées ainsi que les résultats obtenus).

Le second chapitre est structuré en deux parties :

- La première partie est consacrée aux résultats de la littérature sur l'activité antioxydante et l'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle extraite du clou de girofle et de dérivés de l'eugénol par la méthode de piégeage du radical libre DPPH• ainsi que l'étude cinétique de cette activité.
- La deuxième partie illustre quelques résultats de la littérature sur l'activité antimicrobienne et l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite du clou de girofle et de dérivés de l'eugénol par la méthode de disque en

utilisant trois souches bactériennes: *Pseudomonas aeruginosa* (S1), *Escherichia coli* (S2) et *Staphylococcus aureus* (S3). Ces espèces sont procurées par le laboratoire de LAMMABE (Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'agroalimentaire, Au Biomédical et à l'Environnement) de l'Université de Tlemcen.

Le troisième chapitre est structuré en deux parties :

- La première partie est consacrée aux résultats de la littérature sur les huiles essentielles, leur localisation dans la plante, leurs rôles et leurs propriétés, leur composition chimique, les facteurs de variabilité, la toxicité, les activités biologiques et les principales méthodes de leur extraction et l'identification de leurs composants.
- La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés dans l'extraction de l'huile essentielle de clou de girofle ainsi que les résultats obtenus.

En ce qui concerne les principales techniques pour cette partie effectuées, elles ont porté sur:

-L'extraction de l'huile essentielle de clou de girofle par hydrodistillation ;

-L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse ;

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

Une partie des travaux relatés dans ce manuscrit de thèse a donné lieu à la publication de deux articles scientifiques dans des journaux internationaux à comité de lecture.

### ***Références bibliographiques***

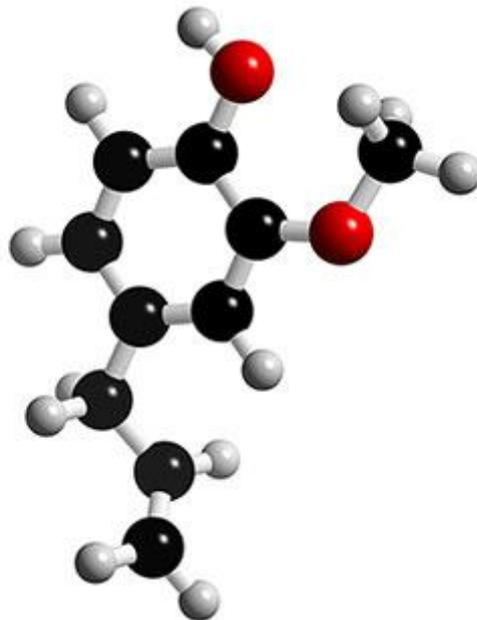
[1] F.A. Carey, R.J. Sandburg. *Advanced Organic Chemistry, "Parts A and Parts B"*, Plenum press, New York, 3<sup>rd</sup> ed. 1990. Parts A: Structure and Mechanisms, Parts B: Reactions and Synthesis.

[2] Colette, A. Staub. *Chimie Organique Moderne, "Travaux Pratiques "*Masson, Québec, 1975, p75.

# CHAPITRE 1

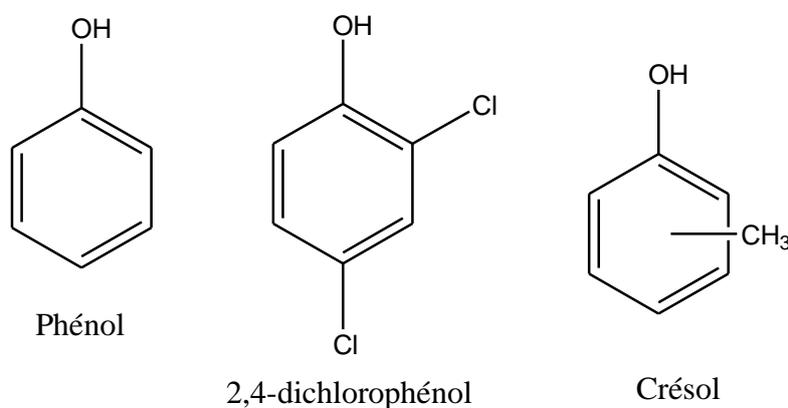
# CHAPITRE 1

Propriétés des dérivés phénoliques. Synthèse de dérivés du 1'eugénol.



## 1.1. Généralités sur les phénols

On appelle phénols les dérivés du benzène et des hydrocarbures aromatiques dans lesquels le groupe OH est lié à un atome de carbone du cycle benzénique. Le groupement hydroxyle joue un très grand rôle en biologique, tant par sa réactivité chimique que par son aptitude à donner des liaisons hydrogènes. Dans le rang des composés aromatiques on considère que les phénols constituent une catégorie à part avec des propriétés chimiques très différentes. Les analogues soufrés des phénols, qui portent un (des) groupe(s) –SH plutôt que –OH sur le cycle aromatique, appelés thiophénols et possèdent de nombreuses propriétés semblables à celles des phénols. Le membre le plus simple de la famille des phénols est le phénol ( $C_6H_5-OH$ ) (nom dérivé de la combinaison des termes phényle et alcool). La présence du suffixe –ol dans n'importe quel nom que ce soit dans la nomenclature IUPAC ou dans les noms historiques consacrés par l'usage, indique la présence d'un groupe hydroxyle. Le système habituel de nomenclature benzéniques s'applique aux phénols substitués, comme exemple le 2,4-dichlorophénol. Un certain nombre de noms historiques sont encore employés aujourd'hui comme le crésol [1].



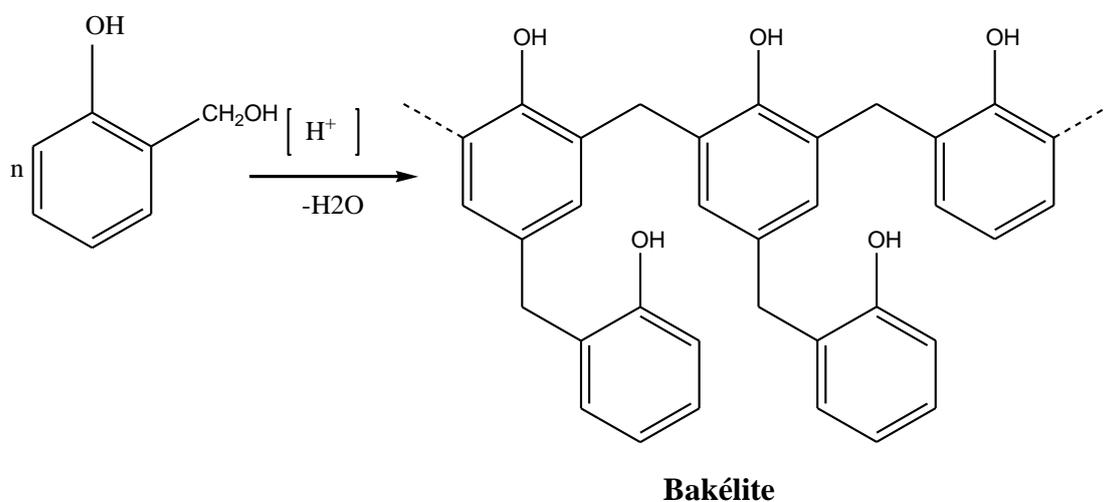
**Figure 1.1** : Structures de quelques phénols [1].

La chimie des phénols illustre l'effet particulier qu'exerce le cycle aromatique sur le groupe hydroxyle, ainsi que l'important effet réciproque que le groupe hydroxyle exerce sur le cycle benzénique. Cette section décrit quelques propriétés des phénols. La grande réactivité des phénols et les vastes possibilités d'applications qu'ils offrent ont attiré l'intérêt de nombreux chercheurs depuis bien longtemps [1].

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, JOSEPH LISTER utilisa le phénol lorsqu'il introduisit la méthode antiseptique en chirurgie, ce qui constituait un progrès important. Malheureusement, le phénol

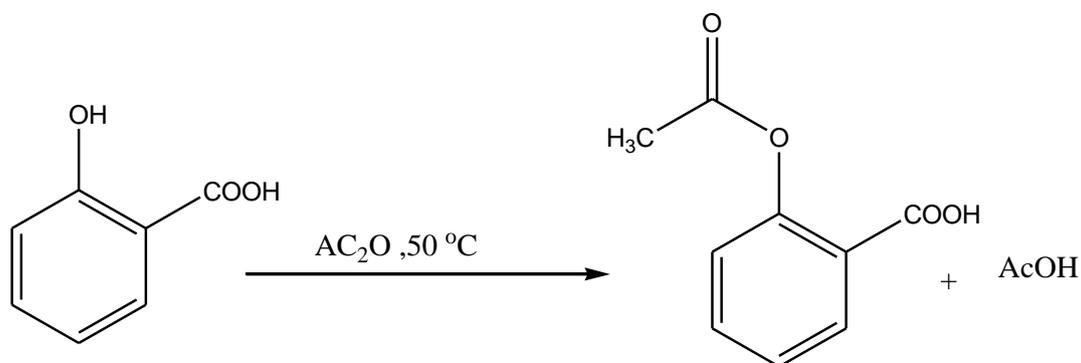
a aussi des effets indésirables et son usage en médecine est maintenant réduit, bien qu'il sert encore comme désinfectant [2].

Le phénol est utilisé pour la fabrication de produits tels que : les résines synthétiques, les colorants, les produits pharmaceutiques, les pesticides, les matières tannantes, les parfums, les lubrifiants et les solvants. La bakélite fut l'un des premiers polymères industriels. Ce composé a été préparé par le chimiste américain d'origine belge L.H Bakeland (1833-1944) qui fonda une usine de production (Bakélite corps). La bakélite possède des usages nombreux et variés : contreplaqués, plastiques moulés, revêtements de têtes de fusées (**Figure 1.2**) [3].



**Figure 1.2** : Obtention de la Bakélite [3].

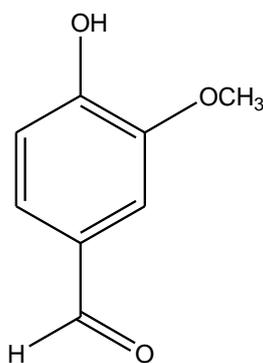
On connaît aussi les phénols doués d'activité physiologique, le plus connue est probablement le dérivé acétylé de l'acide acétylsalicylique commercialisé sous le nom d'aspirine (**Figure 1.3**) [4].



**Figure 1.3** : Synthèse de l'acide salicylique [4].

L'acide salicylique extrait de la plante appelée Reine des prés (*Spiraea ulmaria*) a été mis en évidence par le chimiste allemand K.J Lowing en 1835. Le strasbourgeois Gerhardt a préparé en 1853 le dérivé acétylé de l'acide salicylique que Felix Hoffmann utilisa comme médicament pour soulager les rhumatismes et les fièvres et plus récemment il a également été indiqué pour la prévention des attaques cardiaques [4]. Les phénols trouvent des applications en parfumerie, en pharmacie et dans l'industrie alimentaire en raison de leurs vertus antiseptiques.

La vanilline par exemple se trouve à l'état naturel dans la gousse de vanille et le benjoin de Siam [3]. Son parfum et son goût délicat en font le composé le plus utilisé comme arôme. La vanille doit sa saveur caractéristique à la molécule de vanilline. Actuellement, l'arôme de vanille est le plus utilisé dans l'industrie alimentaire dont 75% de la quantité mondiale est d'origine synthétique [5].



**Vanilline**

**Figure 1.4 :** Structure de la vanilline [5].

La vanilline est utilisée comme matière première dans la synthèse de la L-DOPA, le seul médicament dont on dispose à l'heure actuelle contre la maladie de Parkinson [3].

Comme l'eugénol est le composé principal de notre travail, nous passons en revue quelques unes de ses propriétés.

## 1.2. Réactivité chimique des dérivés phénoliques

La réactivité chimique des dérivés phénoliques peut être divisée en deux parties : celle liée aux propriétés du groupement OH et influencée par la présence du noyau aromatique et celle liée aux propriétés du noyau aromatique [3,6].

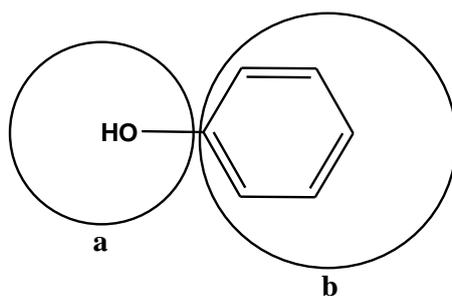


Figure 1.5 : Structure du phénol.

### 1.2.1. Réactivité liée aux propriétés de la liaison O-H

Les phénols sont beaucoup plus acides que les alcools aliphatiques (pKa phénol ~ 9.9 / pKa alcool ~ 16), car l'ion phénate formé lors de la rupture de la liaison O-H est stabilisé par la délocalisation des électrons  $\pi$  (mésoméries) sur le noyau aromatique (**Figure 1.6**). C'est donc cette propriété qui est exploitée dans la synthèse [3].

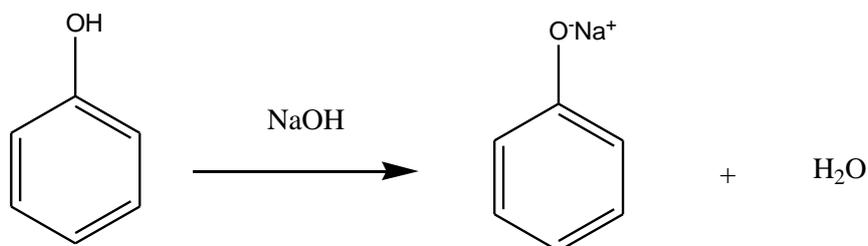


Figure 1.6 : Formation de l'ion phénate [3].

#### 1.2.1.1. Alkylation : Synthèse d'éthers aromatiques

Les ions phénolates sont de meilleurs nucléophiles que les ions alcoolates bien que de basicité plus faible car la présence du cycle aromatique les rend très polarisables. L'alkylation des ions phénolates sur l'oxygène est un cas particulier de la synthèse de Williamson des éthers selon la réaction générale [7-9].

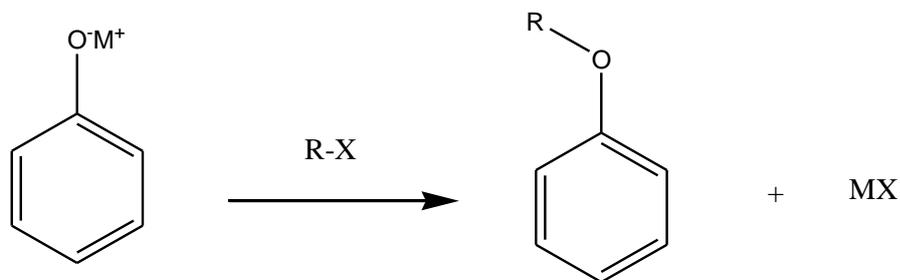


Figure 1.7 : Synthèse de Williamson [7-9].

Avec un halogénure d'alkyle primaire, le mécanisme est de type  $S_N2$  et dans ce cas, la réaction est accélérée dans un solvant dipolaire aprotique (DMSO, DMF) qui solvate le contre-ion et exalte le caractère nucléophile de l'oxygène [3].

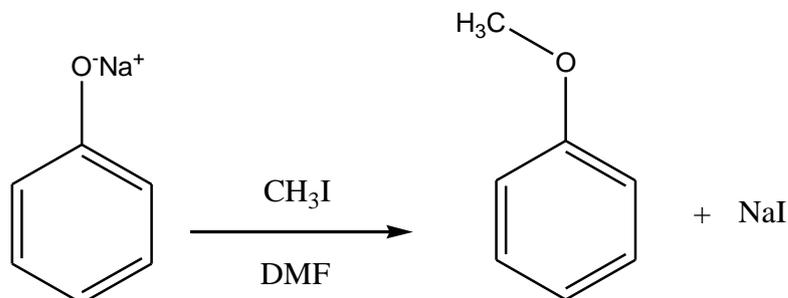


Figure 1.8 : Synthèse du méthylphényl éther [3].

Avec un halogénure tertiaire, le mécanisme est de type  $S_N1$  car le substrat forme facilement un carbocation [3].

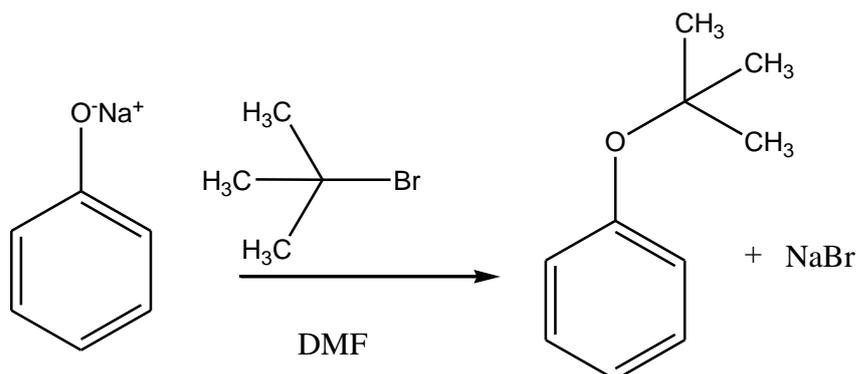
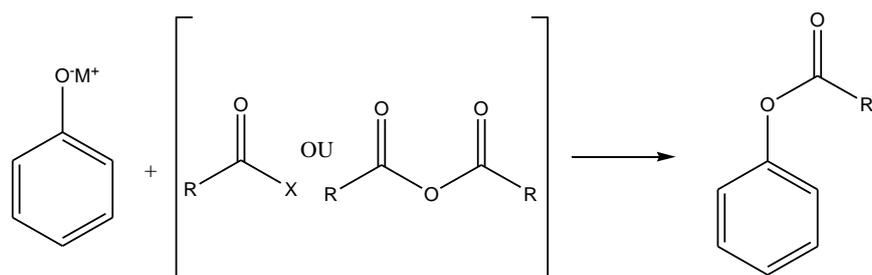


Figure 1.9 : Synthèse du *t*-butylphényl éther [3].

L'alkylation d'un halogénure d'allyle conduit à un éther de phényle et d'allyle.

### 1.2.1.2. Acylation : Synthèse d'esters aromatiques

La diminution du caractère nucléophile de l'oxygène, quand on passe des alcools aux phénols, apparait nettement dans la réaction d'acylation. Les phénols sont acylés par les halogénures d'acyles et par les anhydrides. Les phénols ne réagissent pas avec les acides carboxyliques. Rappelons qu'avec les alcools cette réaction conduit à un état d'équilibre selon la réaction générale suivante [4] :

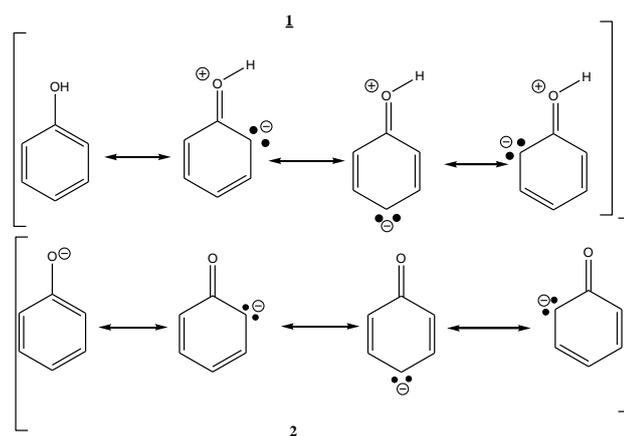


**Figure 1.10** : Synthèse d'esters aromatiques [4].

Le mécanisme de la réaction implique une addition nucléophile de l'oxygène du phénol sur le groupe carbonyle du chlorure d'acyle, suivie d'une fragmentation de l'intermédiaire tétraédrique formé. Il est donc du même type que les alcools [4].

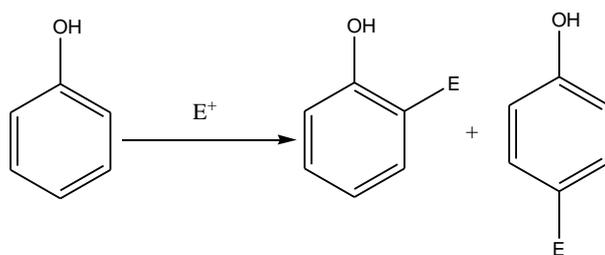
### 1.2.2. Réactivité liée aux propriétés du noyau aromatique et autres réactions

Considérant les formes résonantes du type 1 et 2 du phénol et de l'anion phénate et l'excès d'électrons de ces systèmes à orbitales  $\pi$ , on peut prévoir pour de tels composés une grande aptitude à la substitution électrophile. Cette situation rappelle celle d'aniline [10].



#### 1.2.2.1. Réaction de substitution électrophile aromatique

La réactivité du noyau est activée vis-à-vis de la substitution électrophile aromatique par la présence du groupement OH à effet mésomère donneur. Par conséquent, la substitution électrophile sur le noyau sera ainsi facilitée et orientée principalement en position *ortho* et *para* [3].

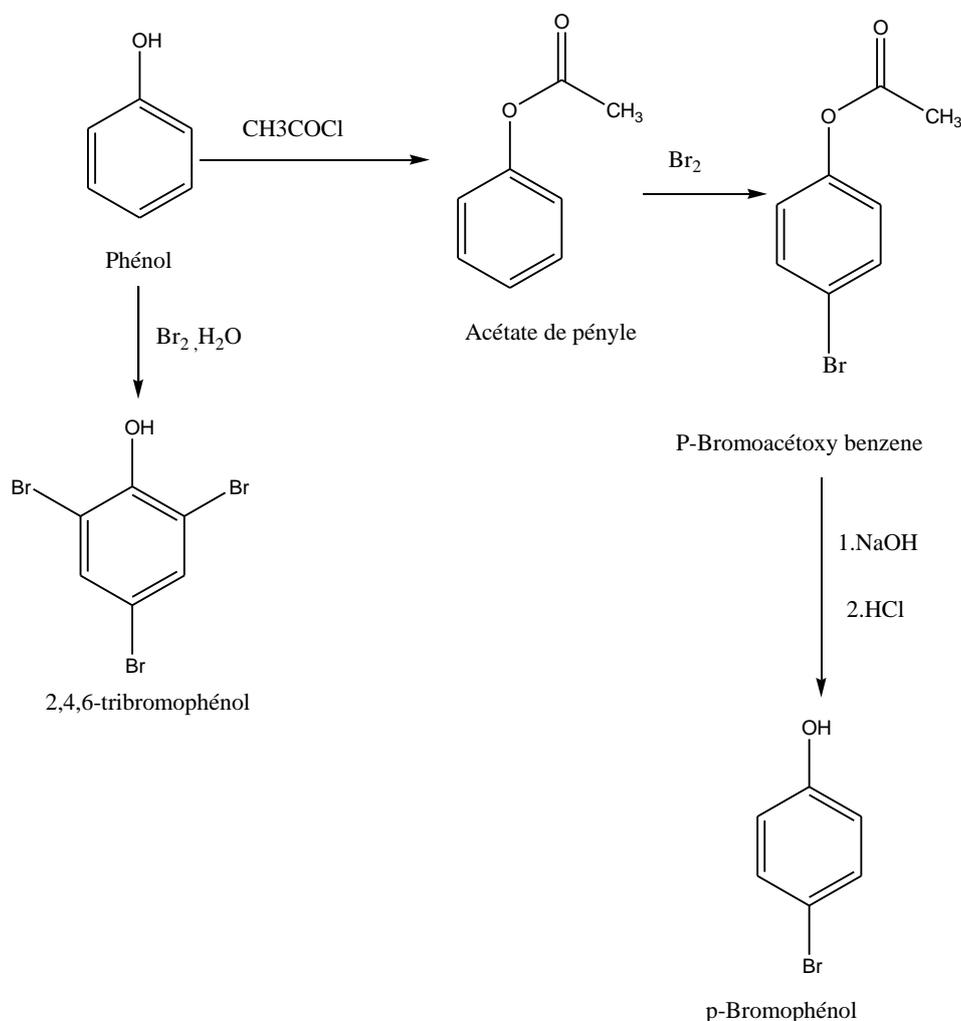


**Figure 1.11** : Schéma général de la SEAr [3].

### 1.2.2.2. Réaction de bromation

Elle est réalisable sans catalyseur par union directe des réactifs. A la température ordinaire, en milieu aqueux, on obtient directement le 2, 4,6-tribromophénol. Cette réaction témoigne la grande réactivité du phénol si on la compare à celle du benzène. Rappelons qu'avec le benzène un acide de Lewis comme  $\text{AlCl}_3$  est nécessaire. La réaction s'arrête au stade de la monobromation. La seule manière de monosubstitué le phénol est de le transformer d'abord en acétate (éthanoate) de phényle par acétylation à l'aide de chlorure d'acétyle. Donc le groupe acétyloxy orienteur en *ortho* et *para* est un activateur modéré de la substitution électrophile aromatique. La réaction s'arrête donc à la mono-substitution principalement en position *para* (moins gêne stérique).

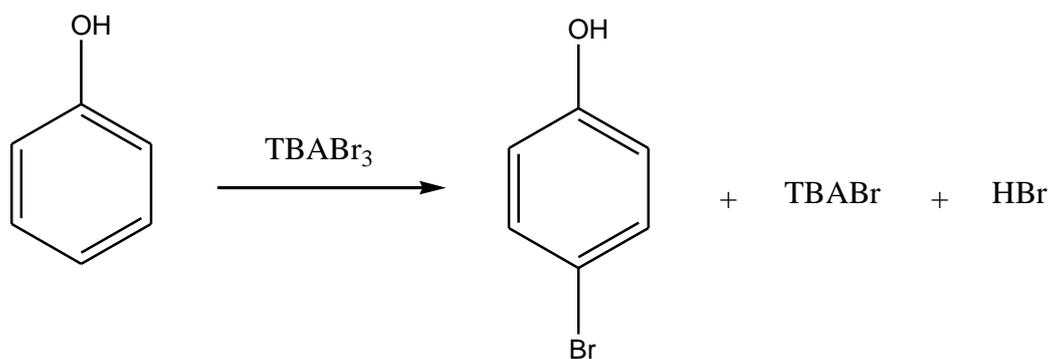
Le groupe acétyle est éliminé par une simple hydrolyse pour régénérer le groupe hydroxyle. Ce processus est illustré ci-dessous pour la préparation du *p*-bromophénol (**Figure 1.12**) [1].



**Figure 1.12** : Bromation du phényle [1].

### 1.2.2.2. a. Monobromation en position *para* du phénol

La monobromation régiosélective du noyau aromatique pose encore des problèmes. En effet, il reste difficile à contrôler le nombre et la position des atomes de brome introduits sur des composés aromatiques activés tels que les phénols. La bromation par les méthodes classiques conduit, le plus souvent, à un mélange de composés monobromés en *ortho* et *para* accompagnés de dérivés polybromés. Si la bromation effectuée à l'aide des réactifs tels que le bromure d'iode, le bromure cuivrique, le perbromure de dioxanne et le N-bromosuccinimide a permis de limiter le nombre d'atomes de brome introduits, par contre le contrôle de la régiosélectivité de la substitution n'est réalisé que dans des cas limités. Pour éviter les inconvénients d'emploi du brome, on a eu recours à des tribromures de pyridinium, de diamino-2,4 thiazole, de triméthylphénylammonium et de triméthylbenzylammonium. Ils conduisent souvent à une halogénéation sélective mais présentent toutefois l'inconvénient d'être soit instables soit faiblement solubles. L'action du tribromure de tétrabutylammonium (TBABr<sub>3</sub>) sur les phénols conduit exclusivement aux composés monobromés en *para* correspondants. Cette réaction est effectuée à température ambiante dans les solvants aprotiques non basiques. Les rendements en produits isolés et purs sont très élevés. Un mécanisme faisant appel à une substitution électrophile par l'anion Br<sub>3</sub><sup>-</sup> est postulé, permettant l'interprétation de cette réaction de bromation régiosélective (**Figure 1.13**) [11].



TBABr<sub>3</sub> : Tribromure de tétrabutylammonium

**Figure 1.13** : Monobromation en position *para* du phénol [11].

### 1.2.2.3. Réarrangement de Claisen

Lors de l'alkylation du phénol par le bromure d'allyle, deux produits peuvent se former, l'*ortho*-allyl-phénol (produit de la C-alkylation) et l'oxyde d'allyle et de phényle (produit de l'O-alkylation). Ce dernier se réarrange par chauffage en *ortho*-allylphénol (et

*para*-allylphénol si la position *ortho* est bloquée), au-dessus de 200°C. De telles transpositions sont appelées transpositions de Claisen [10, 12].

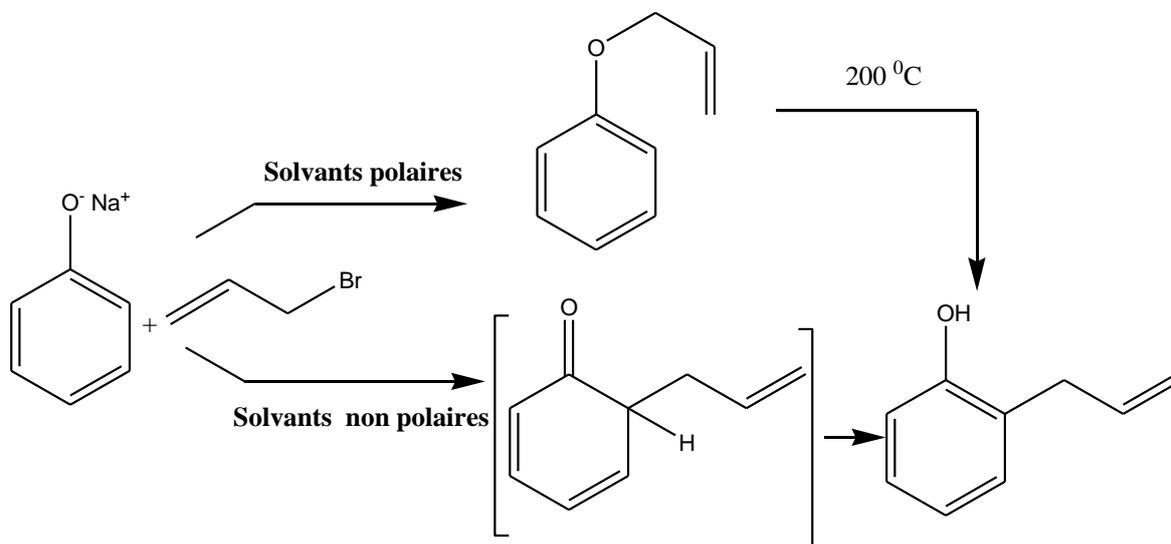


Figure 1.14 : Réarrangement de Claisen [10, 12].

### 1.3. Eugénol

#### 1.3.1. Présentation

L'eugénol, appelé aussi 4-allyl-2-méthoxyphénol est un composé aromatique de la famille des phénylpropènes, une sous-classe des phénylpropanoïdes. L'eugénol est un liquide pratiquement incolore, brunissant à l'air. C'est une molécule très lipophile et sa formule développée est :

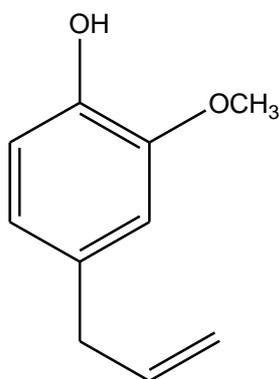


Figure 1.15 : Formule semi-développée de l'eugénol.

La molécule d'eugénol, principe actif de formule brute  $C_{10}H_{12}O_2$ , est présente dans le clou de girofle avec une proportion de 75-90 % [17-19].

### **1.3.2. Propriétés physico-chimiques**

L'eugénol a une température de fusion (à 1 bar) de  $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ , une température d'ébullition de  $253\text{ }^{\circ}\text{C}$ , et une densité 1,06 à  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Il est peu soluble dans l'eau et insoluble dans l'eau salée. Il est cependant très soluble dans l'éthanol et le dichlorométhane, et légèrement soluble dans le chloroforme.

### **1.3.3. Propriétés biologiques.**

L'huile essentielle extraite du clou de girofle connue pour ses actions antiseptiques a été mise à profit très tôt. Ainsi, l'eugénol a été préconisé dans le traitement de la tuberculose et de la gangrène pulmonaire. Son action anesthésique a été mise à profit dans le domaine dentaire. Par le mélange d'oxyde de zinc et d'eugénol, on obtient un ciment utilisé en tant que matériau de restauration temporaire permettant à la fois un excellent scellement et une anesthésie de la pulpe. En plus, ce ciment est en général très bien toléré par les patients. L'eugénol est ainsi toujours utilisé de nos jours, principalement dans les préparations dentaires : bains de bouche, pâte dentifrice, ciments, etc [13]. Depuis quelques années, de nouvelles propriétés et applications ont été découvertes : anti-oxydantes et anti-inflammatoires, conservateur (goût, valeur nutritive et développement microbien sur les grappes de raisins) et anesthésique [14].

### **1.3.4. Toxicité**

L'eugénol n'est que très faiblement toxique. Toutefois, en cas de surdosage, l'eugénol peut causer des atteintes plus ou moins graves du foie (ex : cirrhose du foie). Il entre ainsi dans la catégorie des substances hépatotoxiques [15, 16].

### **1.3.5. Sources**

#### **1.3.5.1. Sources naturelles de l'eugénol**

À l'état naturel, l'eugénol est un phénol qui forme la majeure partie de l'essence du clou de girofle (70-90 %) et trèfle (80%), mais aussi de celle des piments, des feuilles de compartiment, basilic, camphre, cannelle et autres [17-19].

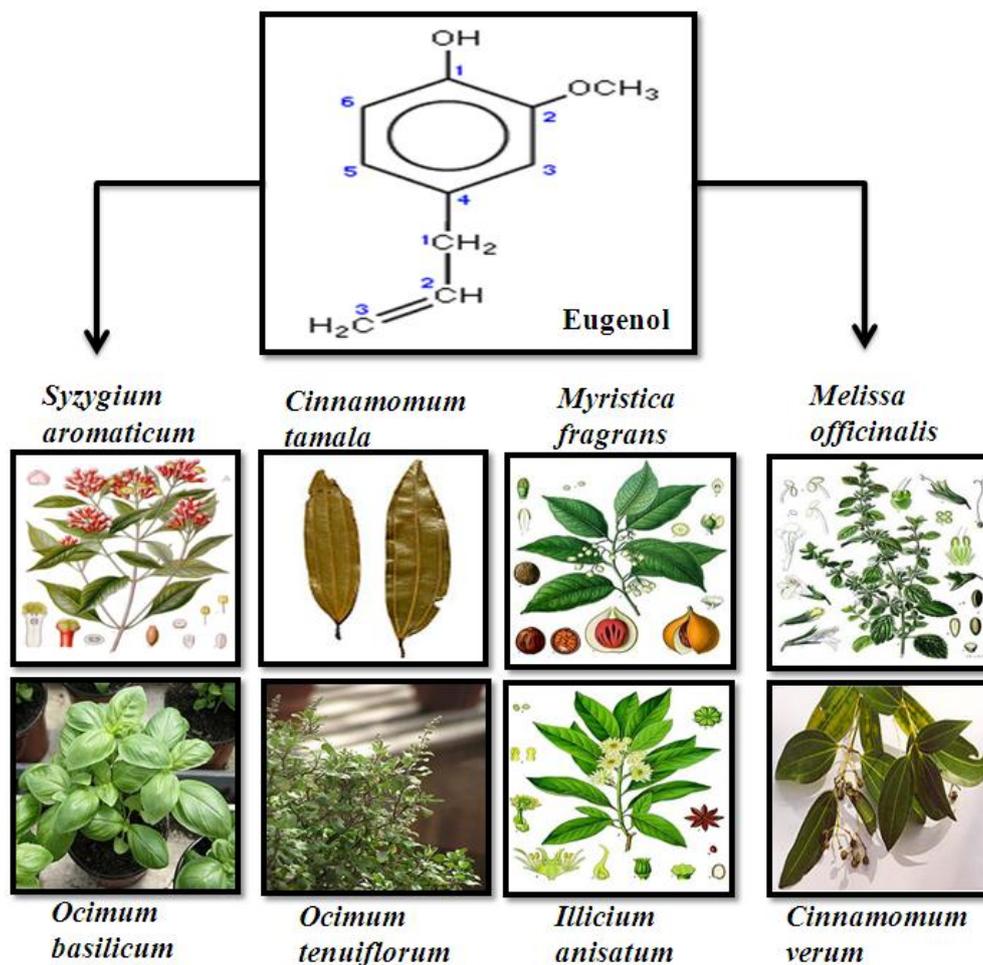


Figure 1.16 : Structure et sources de l'eugénol [17-19].

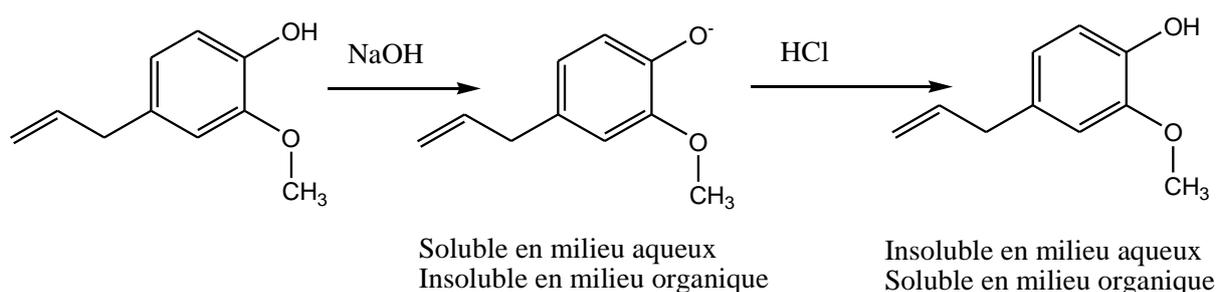
Les pourcentages de concentration de l'eugénol contenu dans l'huile essentielle des différentes plantes [20] sont résumés dans le **Tableau 1.1**.

**Tableau 1.1** : Pourcentages de l'eugénol dans l'huile essentielle de différentes plantes [20].

| Plante                          | Concentration de l'huile essentielle |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Eugenia caryophyllata</i>    | 70–90 %                              |
| <i>Cinnamomum cassia</i> (L.)   | 70–90 %                              |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i>    | 70–90 %                              |
| <i>Dianthus caryophyllus</i> L. | 30 %                                 |
| <i>Ocimum basilicum</i> L.      | 30–80 %                              |
| <i>Ocimum gratissimum</i> L.    | 50–90 %                              |
| <i>Ocimum sanctum</i> L.        | 70 %                                 |
| <i>Ocimum suave</i>             | 80 %                                 |
| <i>Pimenta acris</i>            | 40–60 %                              |
| <i>Pimenta officinalis</i>      | 65–90 %                              |

### 1.3.5.1. a. Extraction de l'eugénol

Dans le but de purifier et extraire l'eugénol et d'éliminer les impuretés ou autres composés parasites, l'huile du clou de girofle est traitée avec un excès d'hydroxyde de sodium afin de dissoudre l'eugénol. Le mélange résultant est ensuite extrait avec de l'éther pour enlever les autres constituants de l'huile (acétate de l'eugénol). Le solvant aqueux utilisé est la soude 1M qui rend non seulement le milieu plus basique mais qui rend l'eugénol ionique et lui permet d'être polaire donc soluble dans l'eau. Ce dernier a donc été extrait dans la phase aqueuse. Pour extraire le maximum d'eugénol dans la soude 1M, l'opération est répétée deux fois. Cela réduit la perte de matière et améliore notre rendement (**Figure 1.17**) [21].



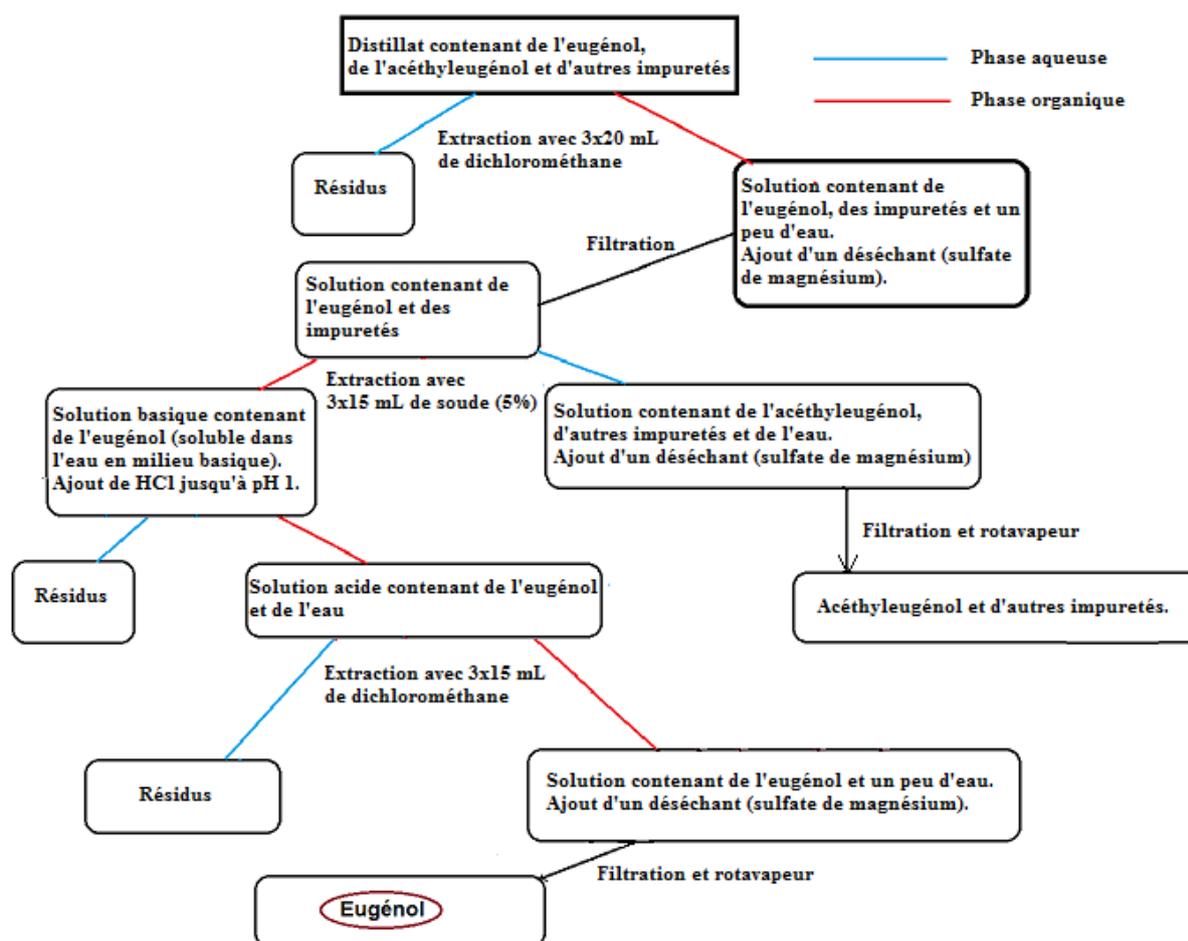
**Figure 1.17** : Couple eugénol/eugénate de sodium avec leur solubilité respective [21].

L'ajout d'acide chlorhydrique acidifie le milieu dont la vérification est faite au papier pH. La goutte à goutte de l'acide est effectuée jusqu'au saut de pH et l'équivalence de ce dosage acido-basique (pH-métrie) a été légèrement dépassée car le papier pH est passé de 14 (bleu foncé) à 6-7 (jaune) en l'espace de deux gouttes. Le passage de l'équivalence fait apparaître un

précipite jaunâtre qui correspond aux impuretés/composés parasites. Ces derniers précipitent en réaction de la baisse de pH. Cette propriété est ici essentielle à la purification de l'eugénol.

La phase aqueuse est reprise dans une ampoule à décanter avec un volume de dichlorométhane et sous sa forme basique, l'eugénol retrouve plus d'affinité avec le dichlorométhane apolaire alors que sa forme acide avait une affinité avec le solvant polaire. Tout le précipité obtenu contenant les impuretés est alors évacué et nous nous retrouvons avec un mélange eugénol-dichlorométhane dont il est facile d'extraire le solvant par la même technique. Une fois le solvant éliminé, le précipité sec il est résolubles avec de l'éthanol et filtre afin d'éliminer les éventuelles impuretés solides résiduelles (**Figure 1.18**) [21].

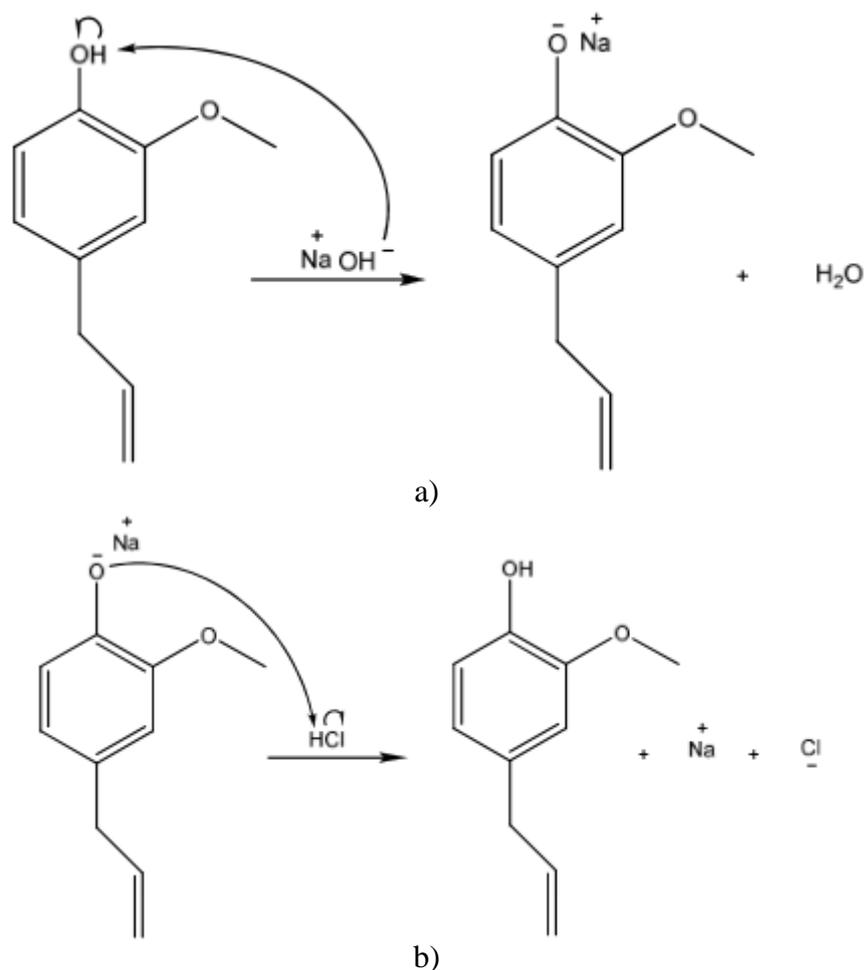
Le solvant d'extraction (dichlorométhane) est de nature apolaire et extrait l'eugénol peu polaire ainsi que d'autres composés à partir des clous de girofle pilés. La faible polarité de l'eugénol s'explique par la présence d'une fonction alcène et d'un cycle phénolique.



**Figure 1.18** : Extraction de l'eugénol [21].

### 1.3.5.1.b. Mécanisme de réaction

L'eugénole se solubilise en milieu basique suivant la réaction ci-dessous durant laquelle il perd son proton. Une fois le milieu redevenu acide, l'eugénole récupère à nouveau son proton. Nous proposons les deux mécanismes suivants (**Figures 1.19**) [21].



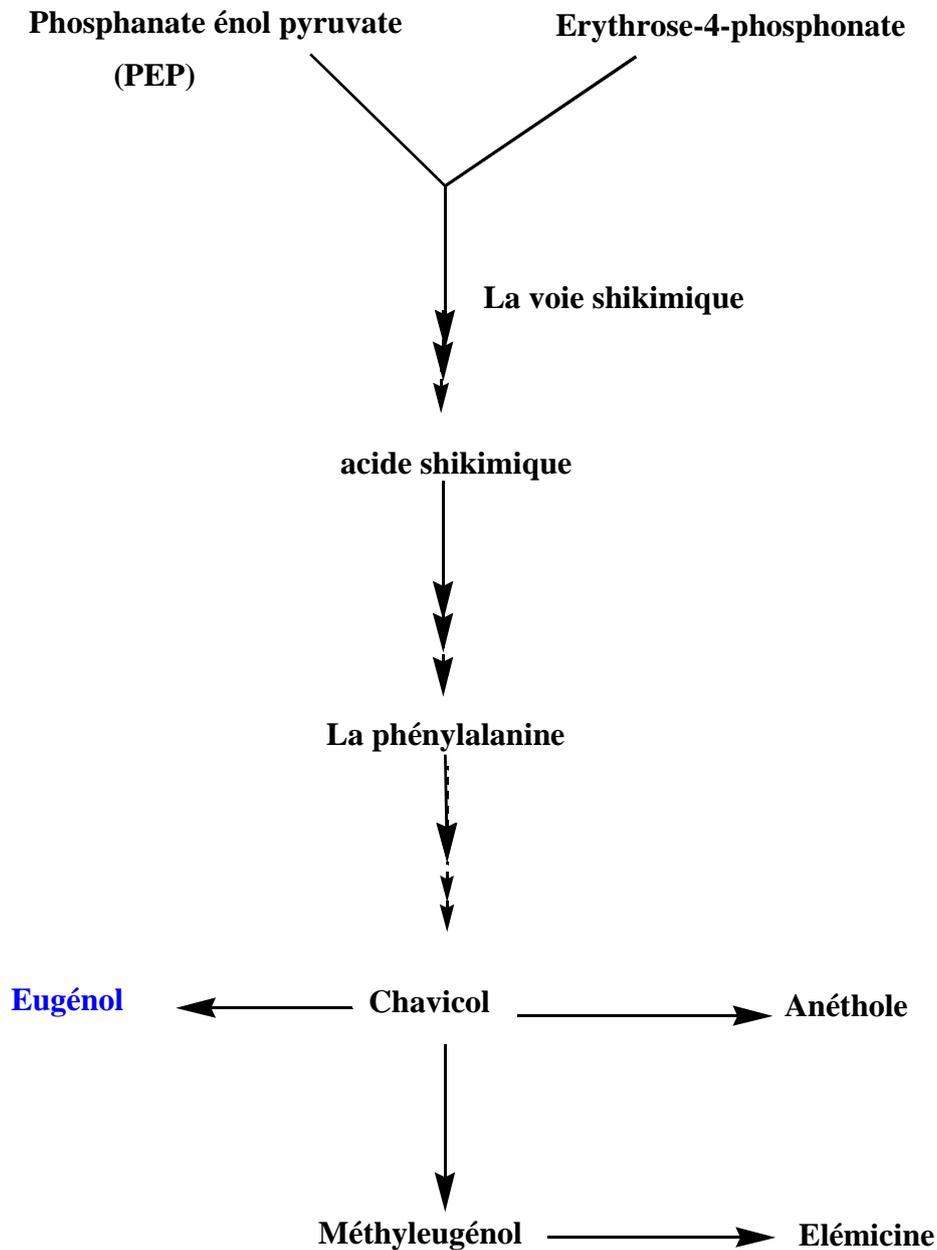
**Figure 1.19** : Solubilisation de l'eugénole. a) milieu basique, b) milieu acide [21].

### 1.3.5.1.c. Biosynthèse des phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes étant des constituants caractéristiques et importants de la plupart des huiles essentielles, nous allons indiquer la biosynthèse de cette famille de produits naturels.

Le métabolisme des phénylpropanoïdes implique des séries de réactions. La voie chimique représente le chemin biosynthétique des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, et le tryptophane) [22, 23]. Les phénylpropanoïdes des huiles essentielles proviennent le plus souvent de la phénylalanine. Ainsi la phénylalanine lyase (PAL)

transforme la phénylalanine en acide cinnamique qui joue un rôle prédominant dans le métabolisme de la plupart des composés phénoliques tels que le chavicol, l'eugénol, l'anéthol, etc. (**Figure 1.20**) [22-25].

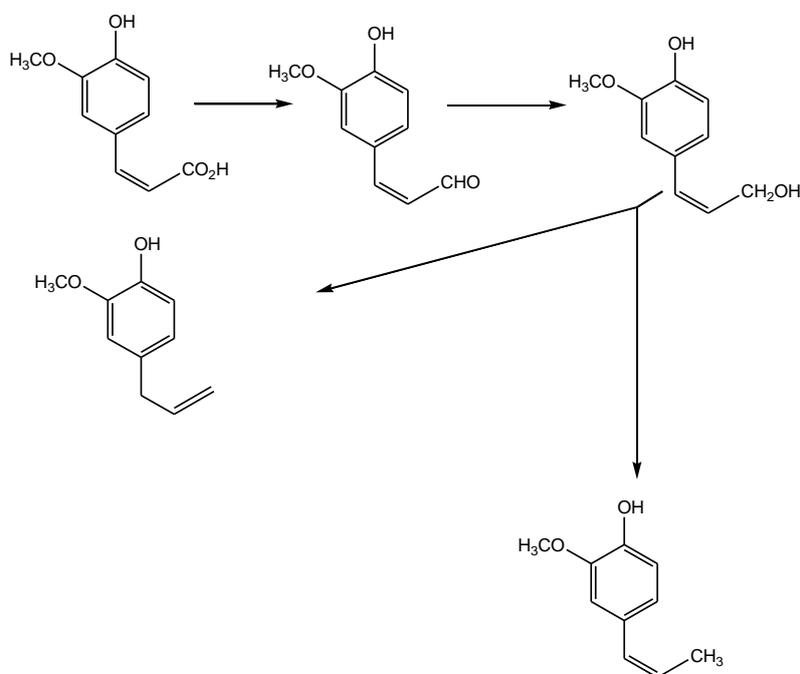


**Figure 1. 20** : Voie biosynthétique des principaux phénylpropanoïdes [22-25].

#### 1.3.5.1.d. Biosynthèse de l'allylphénol dans *Ocimum basilicum* L. : eugénon et méthyleugénon

Les allylphénols : eugénon et méthyleugénon sont synthétisés dans *O. basilicum* à partir de l'acide férulique qui est transformé par réduction du carboxylique en son aldéhyde

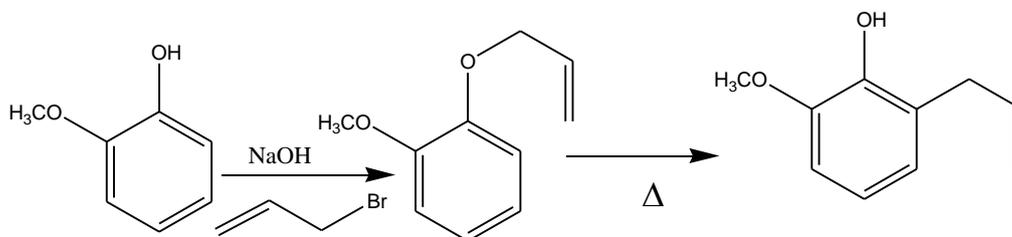
correspondant puis en alcool coniférylique. Ce dernier est converti soit en groupe allyle soit en groupe méthylvinyle par réduction du groupe hydroxyle. Dans ces composés ; seule la chaîne latérale a subi ces transformations sans affecter le noyau aromatique et ses substituants (**Figure 1.21**) [26].



**Figure 1.21:** Biosynthèse de l'eugénol et le méthyleugénol dans *Ocimum basilicum* L [26].

### 1.3.5. 2. Sources industrielles ou synthétiques de l'eugénol

La synthèse industrielle de l'eugénol n'est pas significative car on peut isoler des quantités suffisantes à partir d'huiles essentielles bon marché. Ainsi nous proposons la méthode suivante pour la synthèse du (6-allyl-2-méthoxyphénol) à partir de gaiacol (**Figure 1.22**).



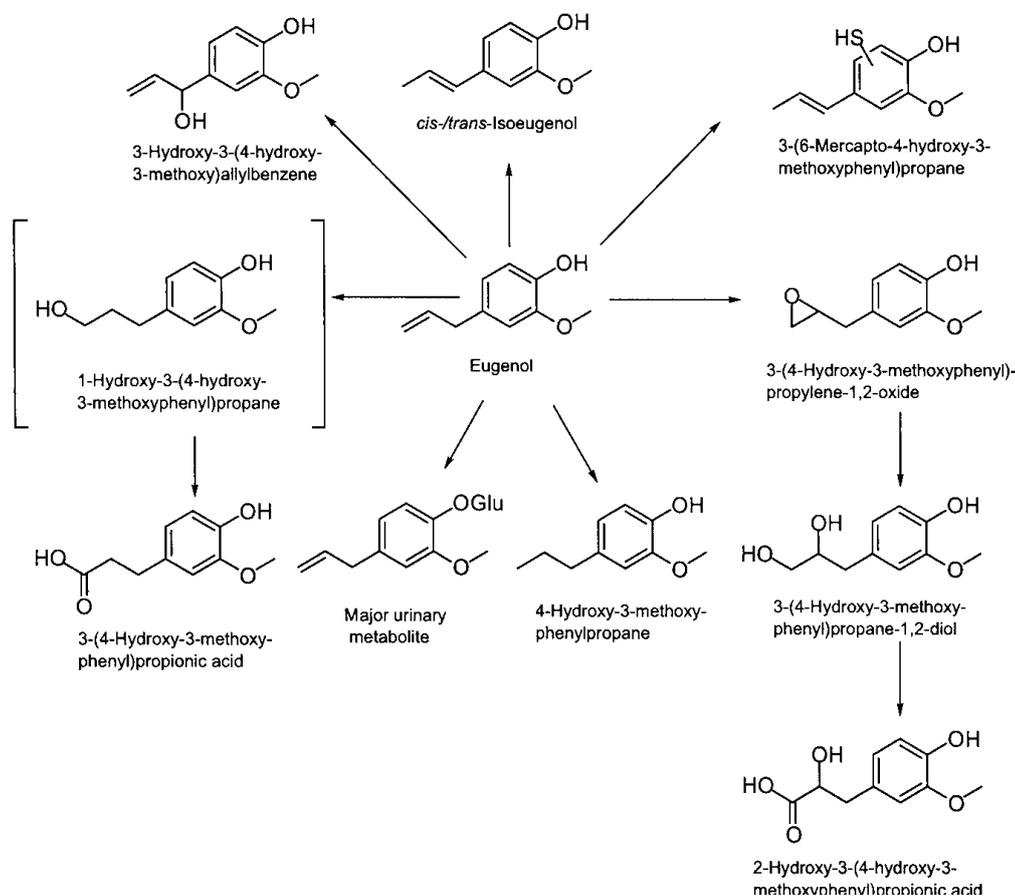
**Figure 1.22 :** Synthèse du (6-allyl-2-méthoxyphénol) à partir du gaiacol.

### 1.3.6. Médicaments contenant de l'eugénol

L'eugénol, en associations avec d'autres substances, se trouve dans les médicaments suivants : Alodont ®, Alvogyl, Post-Pengha, Purparthrol, Pulperyl, Yranol Eugenol, Pectoderme et True Test [27].

### 1.3.7. Réactivité chimique de l'eugénol et ses dérivés

De nombreuses méthodes de synthèse de dérivés de l'eugénol ont été décrites dans la littérature (**Figure 1.23**) [28]. Nous proposons quelques unes des plus importantes.

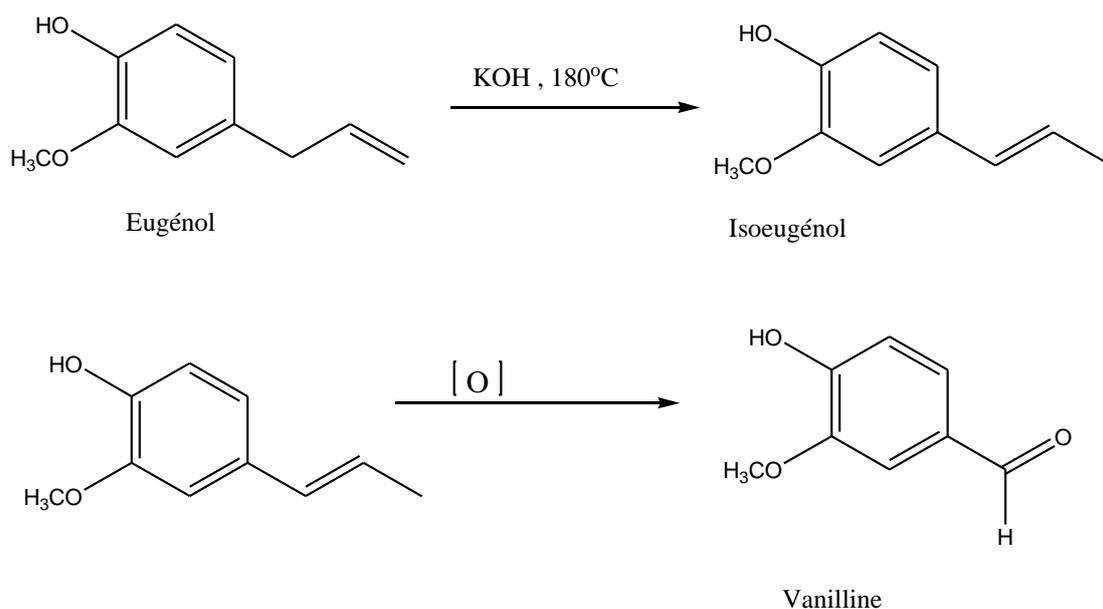


**Figure 1.23:** Synthèse de quelques dérivés de l'eugénol [28].

#### 1.3.7.1. Synthèse de la vanilline

La vanilline, identifiée en 1816 par Bucholtz et Dont., la structure a été déterminée en 1874 par Tiemann et Hermann., a été synthétisée pour la première fois par Erlenmeyer en 1876 à partir de l'eugénol (extrait de clous de girofles) et par Reimer à partir de gaïacol

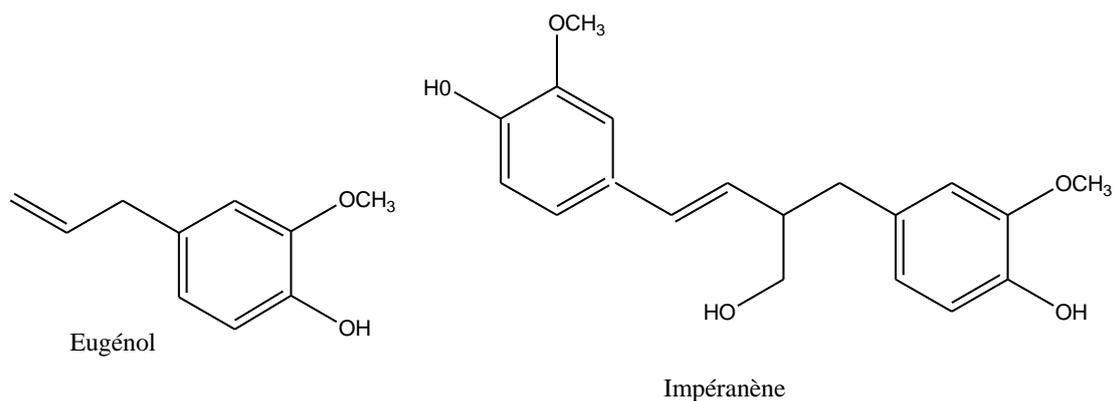
(extrait de goudrons de hêtres). Il s'agit donc d'hémisynthèses (synthèses réalisées à partir de composés naturels possédant déjà une partie de la molécule visée). L'extraction naturelle de l'eugénol étant plus rentable que l'extraction du gaïacol, les premières synthèses ne furent réalisées qu'à partir d'eugénol et ceci pendant plus de 50 ans. Donc par action de l'hydroxyde de potassium à chaud, l'eugénol est isomérisé en isoeugénol. La coupure oxydante de la chaîne latérale de l'isoeugénol conduit à la vanilline selon la réaction suivante (**Figure 1.24**) [29].



**Figure 1.24** : Synthèse de vanilline [29].

### 1.3.7.2. Synthèse de l'impéranène

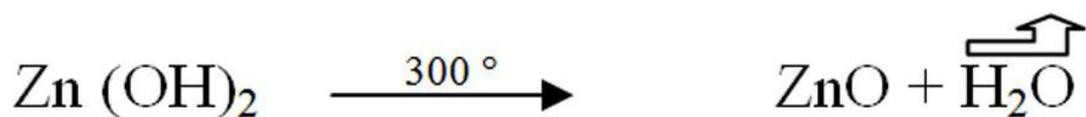
L'impéranène est un composé phénolique qui a été isolé en 1995 des rhizomes d'une plante *Imperata cylindrica* utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour ses propriétés anti-inflammatoires et diurétiques. L'impéranène naturel a été isolé sous la forme d'un seul énantiomère dont la configuration absolue n'a pas été déterminée. En 2001, une équipe de chercheurs américains a réalisé la synthèse énantiosélective de chacun des deux énantiomères de l'impéranène à partir de l'eugénol, à l'aide d'une réaction d'alkylation stéréosélective comme étape clé (**Figure 1.25**) [30].



**Figure 1.25:** Synthèse de l'impéranène [30].

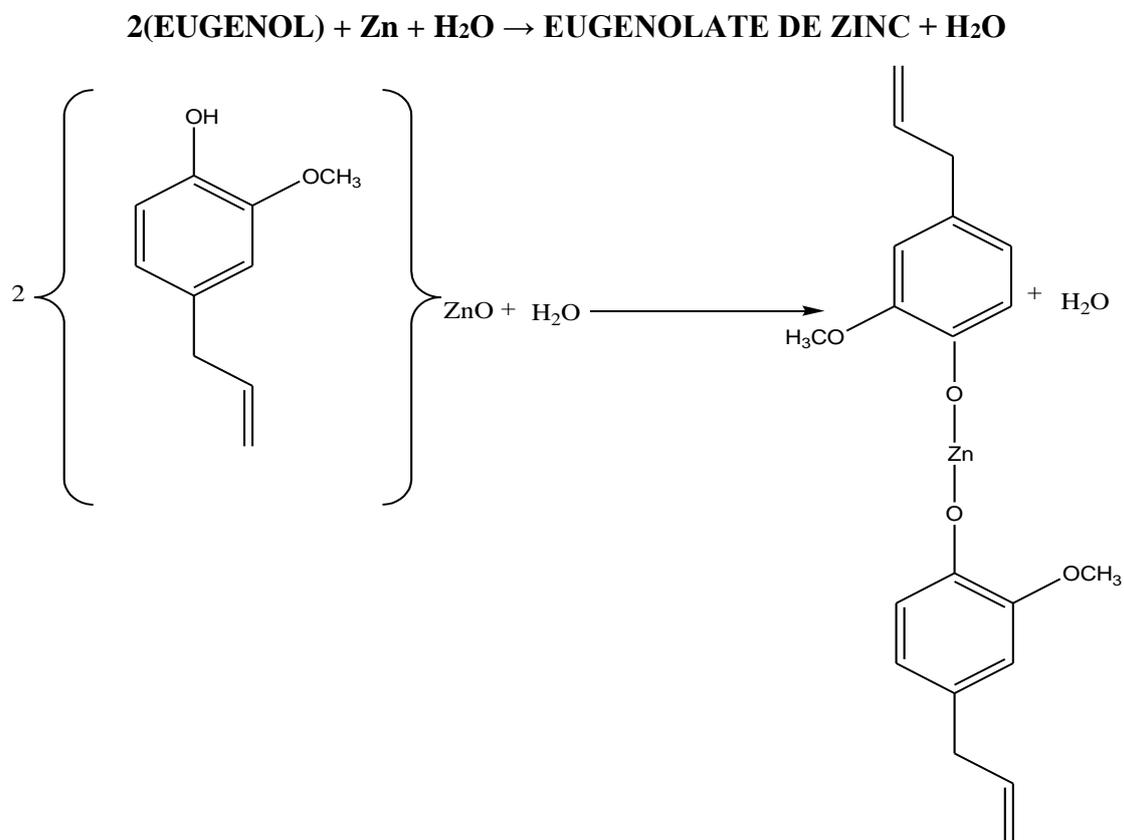
### 1.3.7.3. Synthèse des ciments dentaires

Depuis des décennies, le clou de girofle est utilisé pour ses vertus culinaires et médicinales. Il est beaucoup utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique local [31, 32]. Autrefois nos grands-mères soignaient leurs maux de dents en mâchant un ou deux clous de girofle. Aujourd'hui les techniques se sont améliorées : par le mélange d'oxyde de zinc et d'eugénol on obtient un ciment utilisé en tant que matériel de restauration temporaire permettant à la fois un excellent scellement et une anesthésie de la pulpe dentaire. L'eugénol est aussi utilisé pour soulager la douleur associée à la pose de prothèses dentaires [33]. L'eugénol est un sédatif pulpaire, il est germicide par la fonction phénol de l'eugénol libre. Il est agressif sur la gencive. L'oxyde de zinc – eugénol peut être modifié également par du polyméthacrylate de méthyle, du polystyrène et des polycarbonates. L'oxyde de zinc doit être préparé à basse température, il est d'autant plus réactif que la température de préparation est basse. La déshydratation de l'hydrate de zinc se fait avec une température de l'ordre de 300 °C, en utilisant la réaction suivante (**Figure 1.26**).



**Figure 1.26:** Déshydratation de l'hydrate de zinc [33].

Le ciment obtenu par la réaction de chélation qui se produit entre les deux groupements méthoxy et l'atome de zinc central (**Figure 1.27**) [34].

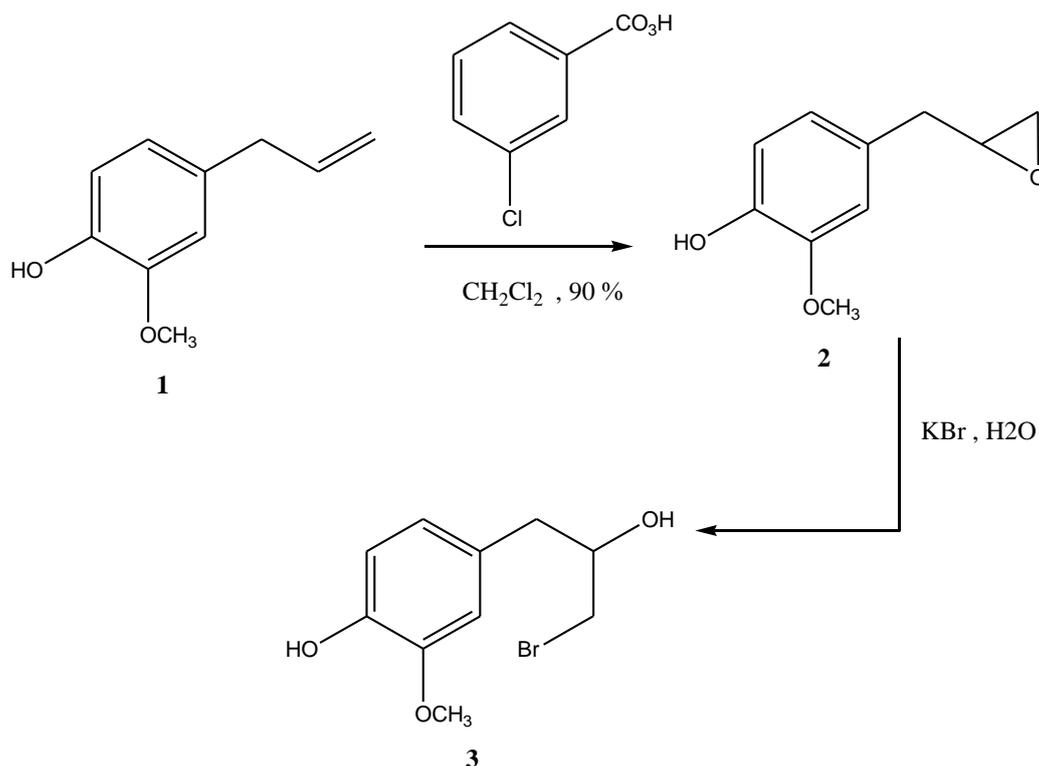


**Figure 1.27** : Préparation de ciment [34].

En clinique, le rapport liquide/poudre est de 4/1 ou 6/1. La résistance mécanique varie avec la quantité de poudre incorporée, selon un facteur de 1 à 6.

#### 1.3.7.4. Synthèse de l'époxyde d'eugénol

L'époxyde d'eugénol a été trouvé être l'agent antibiotique le plus puissant. L'époxyde d'eugénol a été obtenu par conversion du groupe vinyl d'eugénol en époxyde par agitation d'une solution d'eugénol dans du dichlorométhane et de l'acide 3-chloroperbenzoïque. Aucune isomérisation de la double liaison n'a été détectée dans ces conditions. L'époxyde (2) peut être transformé en milieu aqueux par une solution de KBr en donnant le dérivé bromoalcool correspondant (3) (**Figure 1.28**) [35].

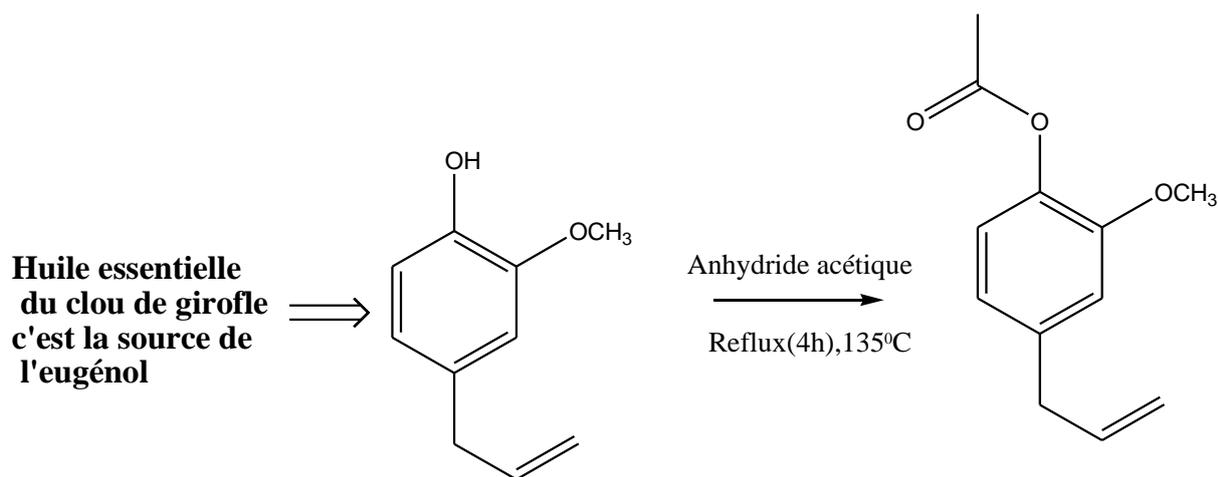


**Figure 1.28** : Synthèse de l'époxyde d'eugénol [35].

### 1.3.7.5. Synthèse d'acétate d'eugényle ou éthanoate d'eugényle

Les esters sont responsables du goût et de l'odeur agréable de nombreux fruits et fleurs, et de parfums artificiels. Les parfums naturels et les senteurs doivent leur délicatesse à des mélanges complexes, souvent plus de cent substances. Les parfums artificiels peu coûteux sont souvent constitués d'un seul composé ou d'un mélange très simple. Comme exemples, nous citons : l'acétate de linalyle contenu dans l'odeur de lavande, l'acétate de pentyle contenu dans l'odeur de poire, l'acétate de benzyle contenu dans l'odeur du jasmin.

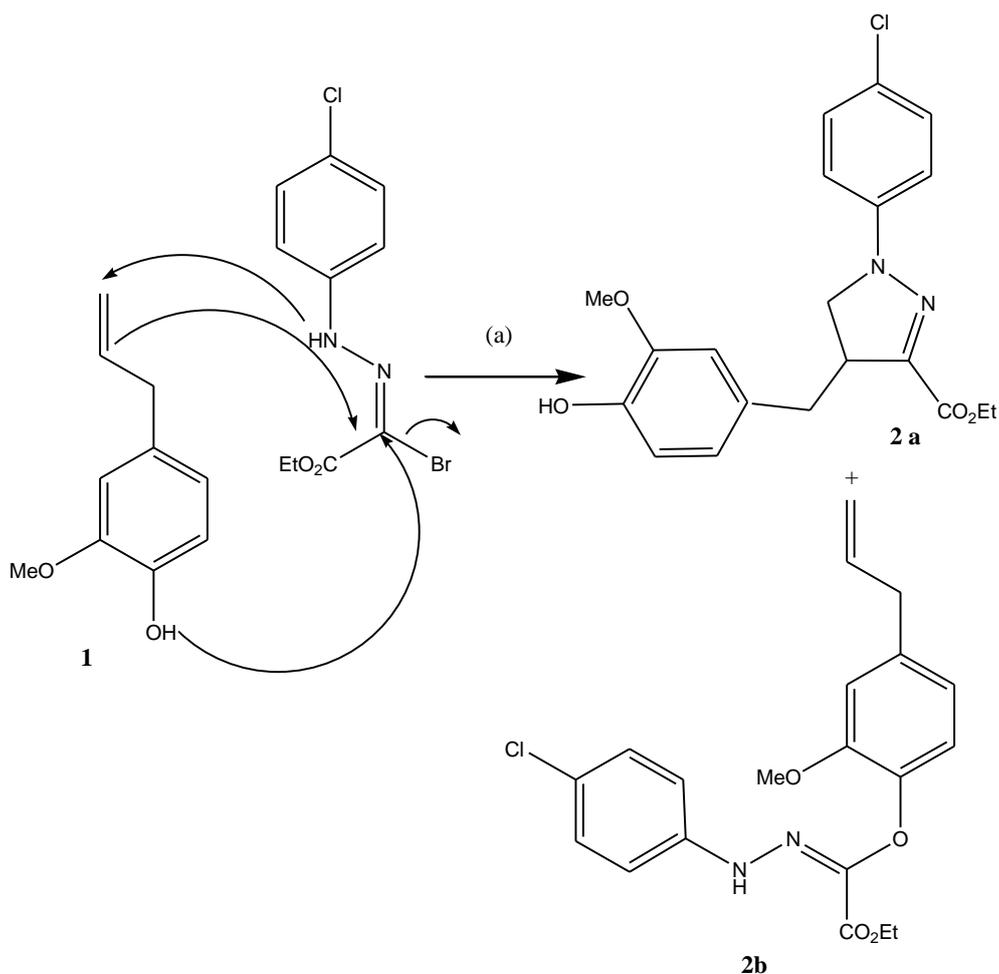
L'acétate d'eugényle ou éthanoate d'eugényle ; cette substance est ce que l'on appelle un ester et se trouve à l'état naturel dans le clou de girofle. L'acétate d'eugényle n'est pas un produit commercialisé. Donc la synthèse de l'ester est une réaction de transformation réalisée par action de l'anhydride acétique sur l'huile essentielle du clou de girofle. La transformation est rapide et peut être considérée comme totale avec l'objectif de protéger le groupe hydroxyle (huile essentielle) et en le transformant en ester (**Figure 1.29**). La cristallisation de l'acétate d'eugényle est dépendante de la qualité d'huile essentielle utilisée et le degré de pureté [36].



**Figure 1.29** : Synthèse d'acétate d'eugényle.

### 1.3.7.6. Synthèse de dérivés du pyrazole

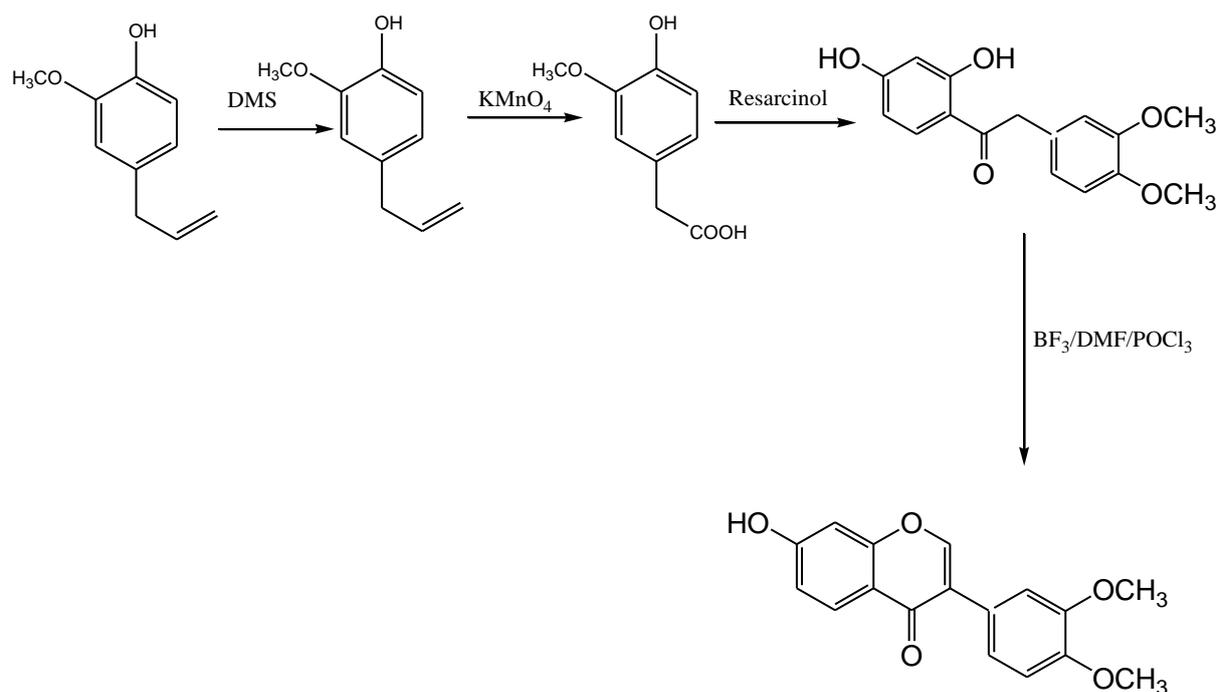
HAMRI et Coll décrivent un procédé efficace pour la préparation de nouveaux 1,3,4-tri-substitués de 4,5-dihydro-1-H-pyrazoles par cycloaddition 1,3-dipolaire. Cette méthode utilisée pour synthétiser des différents pyrazoles à partir de l'eugénol, un constituant phénolique majeur de girofle huile essentielle, et le N-aryl-C-ethoxycarbonitrilimine: le (Z)-éthyl-2-bromo-2-(2-(4-chlorophényl)hydrazono) acétate d'éthyle comme système dipolarophile (**Figure 1.30**) [37].



**Figure 1.30** : Synthèse de dérivés du pyrazole. (a) Et<sub>3</sub>N, solvant, reflux, 48h [37].

### 1.3.7.7. Synthèse 7-hydroxy-3',4'-diméthoxyisoflavone

L'eugénol extrait de l'huile du clou de girofle avait été utilisé dans la synthèse de 7-hydroxy-3',4'-diméthoxyisoflavone sur la base d'intermédiaire de désoxybenzoïne. La matière première est d'abord convertie en méthyleugénol utilisant le DMS (89,87%). Ensuite, le méthyleugénol a été oxydé par KMnO<sub>4</sub> pour produire l'acide carboxylique 3,4-diméthoxybenzyle (21%). La réaction de Friedel-Craft avec du résorcinol a produit le 3,4-diméthoxybenzyle-2',4'-dihydroxyphényl cétone avec un rendement de 78%. Finalement, la cyclisation de la cétone avec les réactifs suivants : BF<sub>3</sub>.OEt<sub>2</sub> / DMF / POCl<sub>3</sub> a donné la 7-hydroxy-3',4'-isoflavone avec un rendement de 85% (**Figure 1.31**) [38].



**Figure 1.31** : Synthèse du 7-hydroxy-3',4'-diméthoxyisoflavon [38].

### 1.3.7.8. Synthèse du phtalocyanines

La première étape dans la synthèse était d'obtenir des dérivés de phtalonitriles contenant le groupe 4-allyl-2-méthoxyphénoxy. Ce composé a été obtenu par une substitution nucléophile aromatique entre le 4-nitrophthalonitrile avec l'eugénol. Cette réaction est effectuée à température ambiante dans du diméthylsulfoxyde en présence du K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> avec un rendement modéré. La cyclotétramérisation de phtalonitrile en présence des sels métalliques donne lieu aux complexes métalliques phtalocyanines (M = Cu(II), Ni(II), Co(II), Zn(II) et Fe(II)) (**Figure 1.32**) [39].

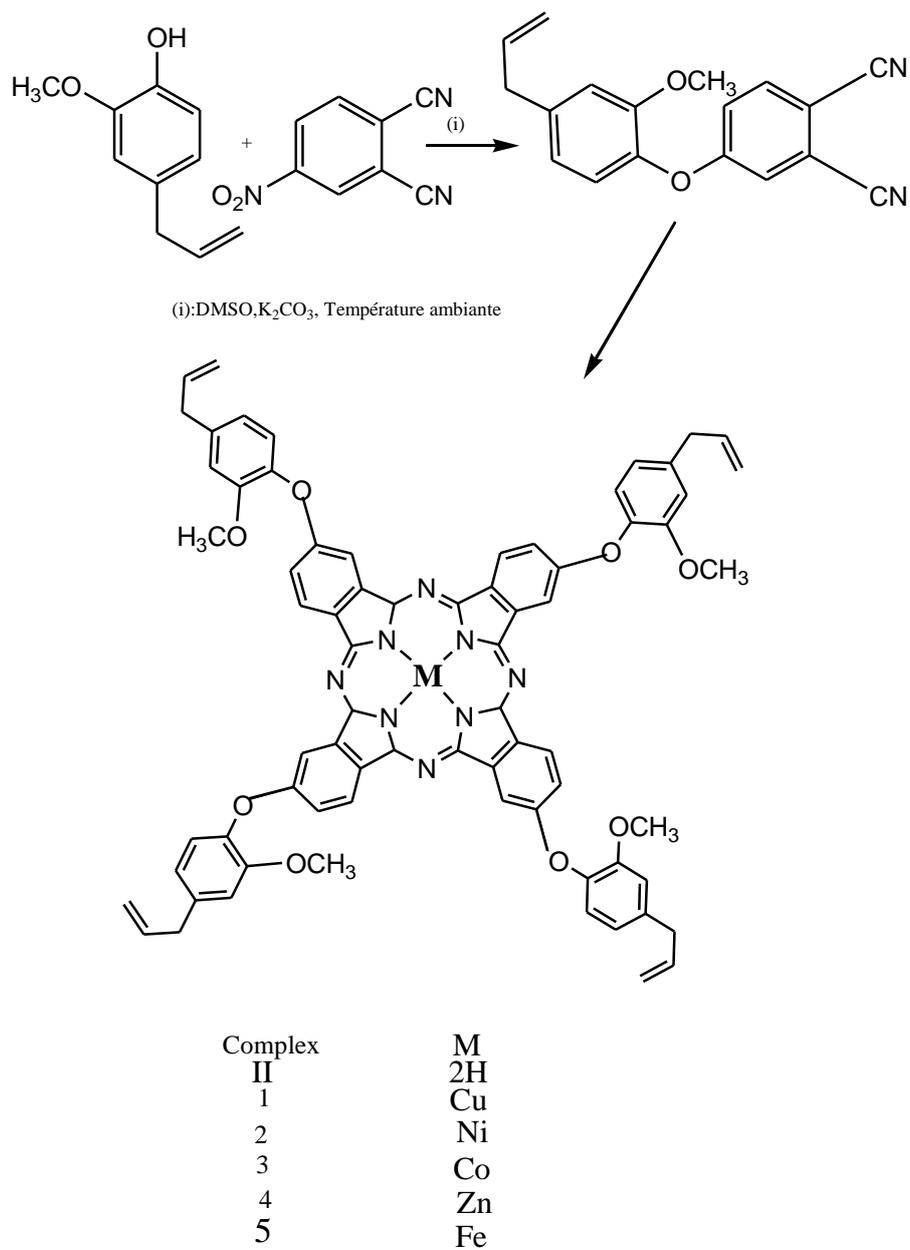


Figure 1.32 : Synthèse du phthalocyanines [39].

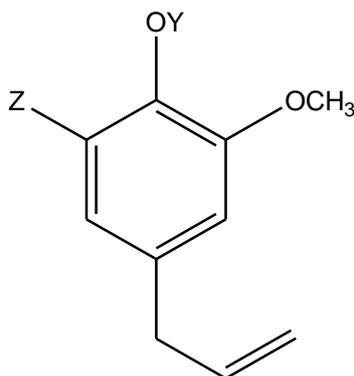
### ***Conclusion***

D'après les recherches bibliographiques l'eugénol, qui a une formule brute  $C_{10}H_{12}O_2$ , est une molécule possédant un cycle aromatique, ce qui est caractéristique des composés d'origine naturelle. C'est pourquoi cette molécule peut être obtenue au moyen d'extraction à partir d'huile essentielle de clou de girofle. L'eugénol et ses dérivés sont l'une des classes les plus intéressantes. Elles subissent une gamme diverse de réactions et donc, on trouve beaucoup d'applications synthétiques utiles. Ainsi, la grande variété d'utilisation de l'eugénol et ses dérivés aussi bien en synthèse de réactifs intermédiaires que de produits naturels montre la place importante qu'occupent ces composés en chimie organique.

## 1.4. Résultats et discussions

### 1.4.1. Eugénol et ses dérivés

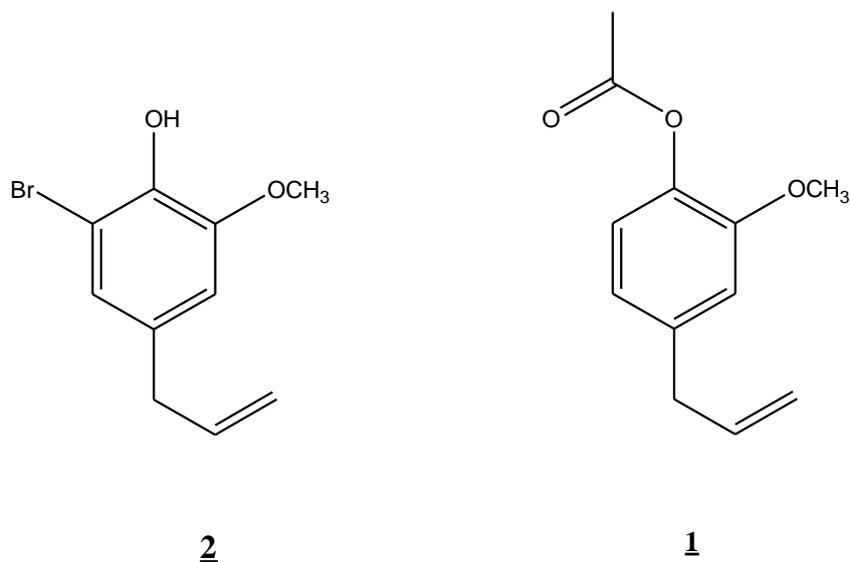
De nombreuses méthodes de synthèse des dérivés de l'eugénol ont été décrites dans la littérature ; l'adjonction de groupes fonctionnels variés (Y, Z) sur le composé eugénol (**Figure 1.33**) a fait apparaître de nouvelles possibilités d'applications dans les différents domaines : biologique, pharmaceutique, etc.



**Figure 1.33** : Groupes fonctionnels de l'eugénol.

La réactivité chimique de l'eugénol peut être divisée en deux parties : celle liée aux propriétés du groupement OH et influencée par la présence du noyau aromatique (Acylation : Synthèse d'esters aromatiques) et celle liée aux propriétés du noyau aromatique (réactivité du noyau est activée vis-à-vis de la substitution électrophile aromatique par la présence du groupement OH à effet mésomère donneur).

Dans ce chapitre nous avons étudié une autre voie d'accès aux eugénols fonctionnels **1** et **2** (**Figure 1.34**). L'originalité de notre travail, réside dans l'utilisation de l'eugénol en comparaison aux phénols qui ont été très utilisés.



**Figure 1.34** : Structures de dérivés de l'eugénol

Nous justifions le choix de l'utilisation de l'eugénol, d'abord parce qu'ils sont l'une des familles de composés les plus importantes dans la chimie organique de synthèse. Puisqu'on les retrouve dans les domaines tels que l'alimentation, l'agriculture et la médecine; et d'autre part, ils n'ont pas été, ou très peu utilisés, à notre connaissance, dans ce type de réaction.

D'un autre côté, ils nous permettent d'introduire deux ou plusieurs fonctionnalités en même temps.

Ce chapitre comprend deux voies:

- ✓ La première voie vise à obtenir les produits de type **1** par acylation (synthèse d'esters aromatiques) de l'eugénol.
- ✓ La deuxième voie permet d'accéder aux produits de type **2**. Elle concernera la substitution électrophile aromatique : bromation et des tests d'alkylation.

#### 1.4.2. Synthèse d'acétate d'eugényle ou éthanoate d'eugényle

Pour effectuer des transformations chimiques satisfaisantes avec l'eugénol, il est souvent nécessaire de protéger une ou plusieurs fonctions réactives présentes sur la molécule. La fonction concernée dans notre cas, est la fonction alcool. Dans ce cas le problème ne se pose pas, nous avons réalisé cette protection avec l'anhydride acétique.

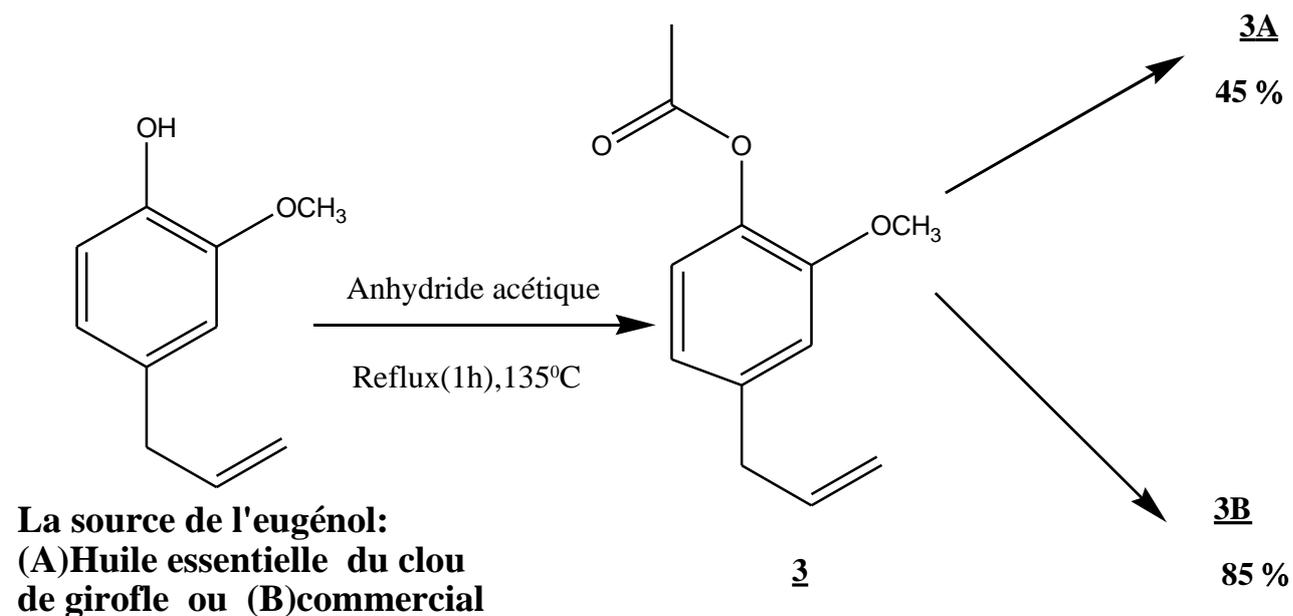
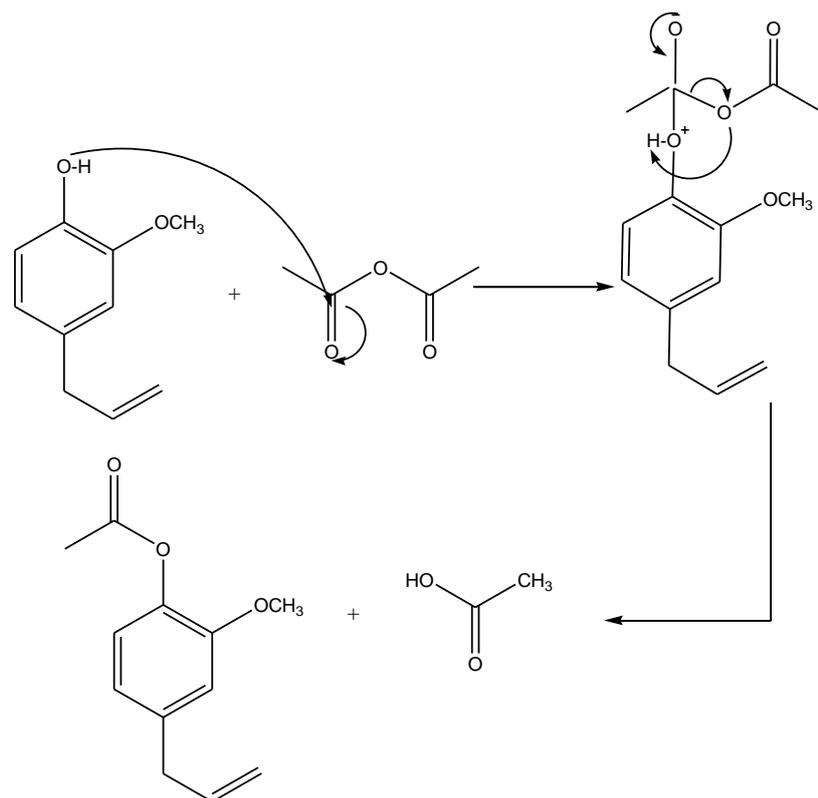


Figure 1.35 : Synthèse d'acétate d'eugényle.

Pour cela, nous proposons le mécanisme réactionnel suivant :



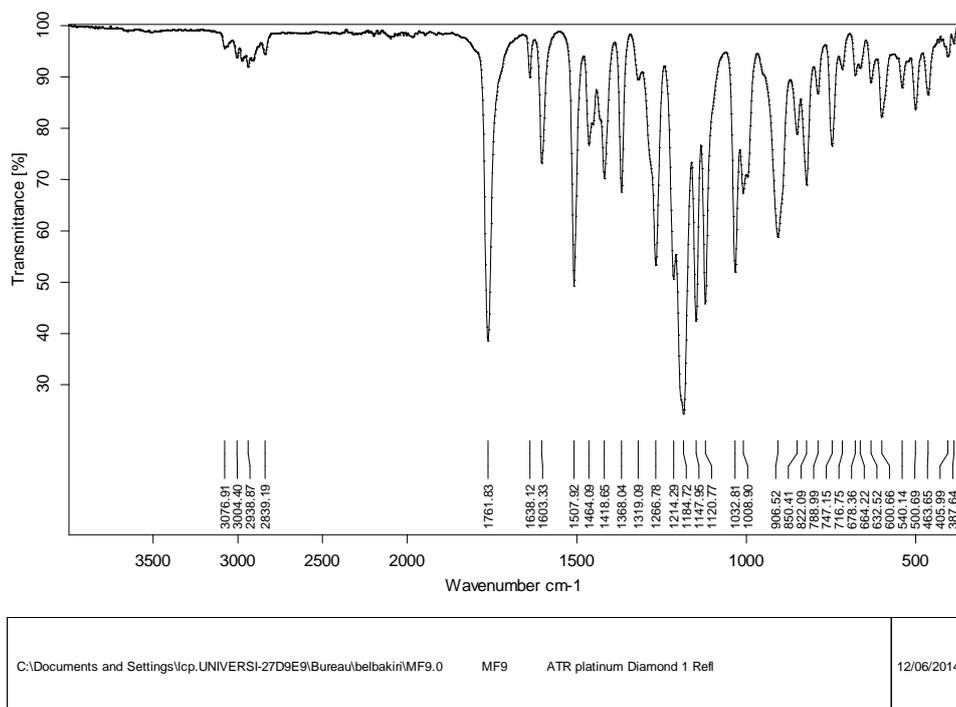
**Figure 1.36** : Mécanisme réactionnel de synthèse de l'acétate d'eugényle.

Les produits **3** ont été isolés après 1h de reflux et refroidissement, avec des rendements élevés pour le composé **3B** et des rendements moyens pour le composé **3A** (**Figure 1.35**). Ils sont obtenus suite à la condensation des huiles essentielles de clou de girofle ou l'eugénol avec l'anhydride acétique et se présentent tous, sous forme de solides. Ils ont été identifiés par la chromatographie sur une couche mince (CCM), (toluène /méthanol ; 95 :05,  $R_f=0.94$ ), et caractérisés par leurs spectres IR. Ils présentent tous des bandes IR à 1750 et 1735  $\text{cm}^{-1}$  caractéristiques du groupe carbonyle d'ester. D'un autre côté, le groupe ( $\text{CH}_3\text{-CO-}$ ) de l'acétate d'eugényle absorbe entre 3004 et 2900  $\text{cm}^{-1}$ . La cristallisation de l'acétate d'eugényle dépendante de la qualité d'huile essentielle utilisée et le degré de pureté. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau suivant.

**Tableau 1.2 :** Caractéristiques des composés **3A** et **3B**.

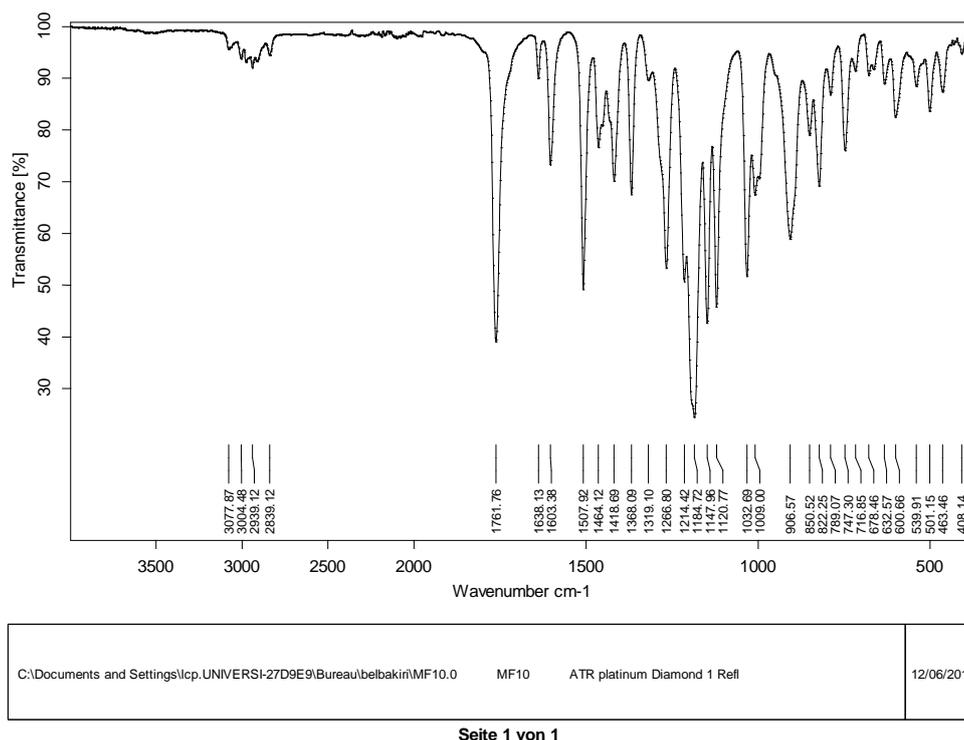
| Composé   | Pf   | Rdt% | $\nu$ (cm <sup>-1</sup> ) C=O | $\nu$ (cm <sup>-1</sup> ) CH <sub>3</sub> -CO- |
|-----------|------|------|-------------------------------|--|
| <b>3A</b> | 25   | 45   | 1761                          | 3004   |
| <b>3B</b> | 26.9 | 85   | 1761                          | 3004   |

Comme les produits formés sont des solides, la cristallisation de ces produits dépendante de la qualité d'huile essentielle et les produits de synthèse utilisée et leur degré de pureté. Même si le pourcentage de l'impureté est très petit, il influe sur la cristallisation en changeant les propriétés physico-chimiques et sur la température de fusion. Ceci explique les résultats dans le tableau 1.2 et la variation entre la température de fusion des deux produits **3A** et **3B**. Nous notons des petites particularités sur les spectres IR (**Figures 1.37 et 1.38**).



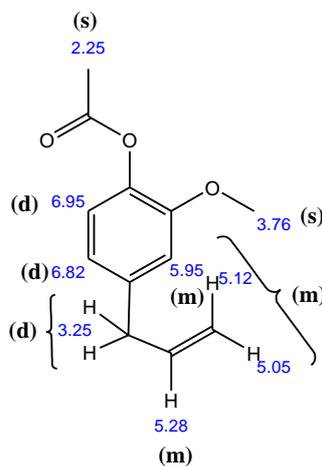
Seite 1 von 1

**Figure 1.37 :** Spectre infrarouge de d'acétate d'eugényle **3A** (source : huile essentielle du clou de girofle).



**Figure 1.38** : Spectre infrarouge de d'acétate d'eugényle **3B** (source : eugénol commercial).

Pour l'analyse RMN du proton, le spectre du composé **3B** montre bien la formation de l'acétate d'eugényle (**Figure 1.39**).



**Figure 1.39** : Déplacements chimiques du proton de l'acétate d'eugényle.

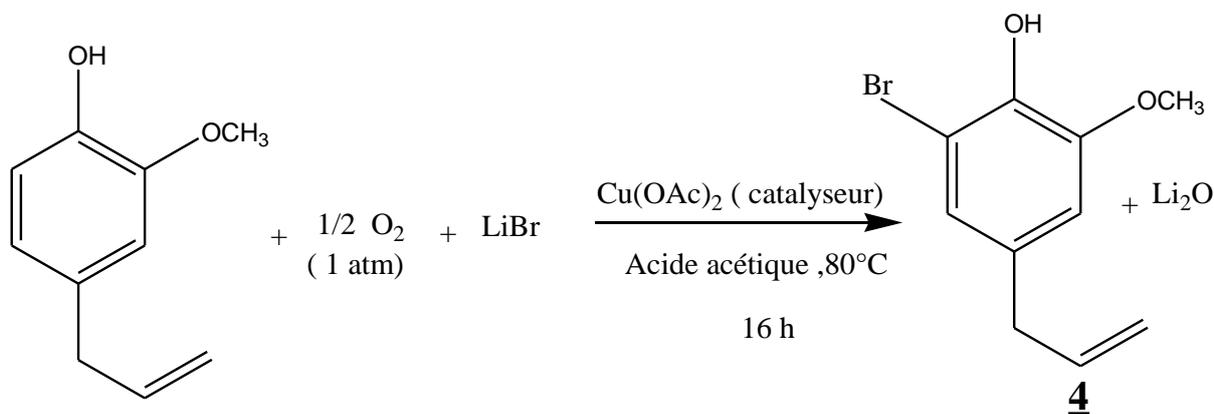
### 1.4.3. Synthèse du 6-bromoéugénol

Notre travail concerne la réaction de monobromation régiosélective du noyau aromatique. Il existe deux types de protocoles de synthèse du 6-bromoéugénol. Pour chacune

des synthèses, il faudra simplement se rapporter à l'un des deux protocoles A ou B explicités ci-dessous.

Dans le protocole **A**, les auteurs proposent une *ortho*-bromation sélective de l'eugénol basé sur l'emploi de *i*-PrMgCl comme base et la DBDMH (1,3-dibromo-5,5-diméthylhydantoin) comme électrophile dans le THF anhydre à -70°C [40].

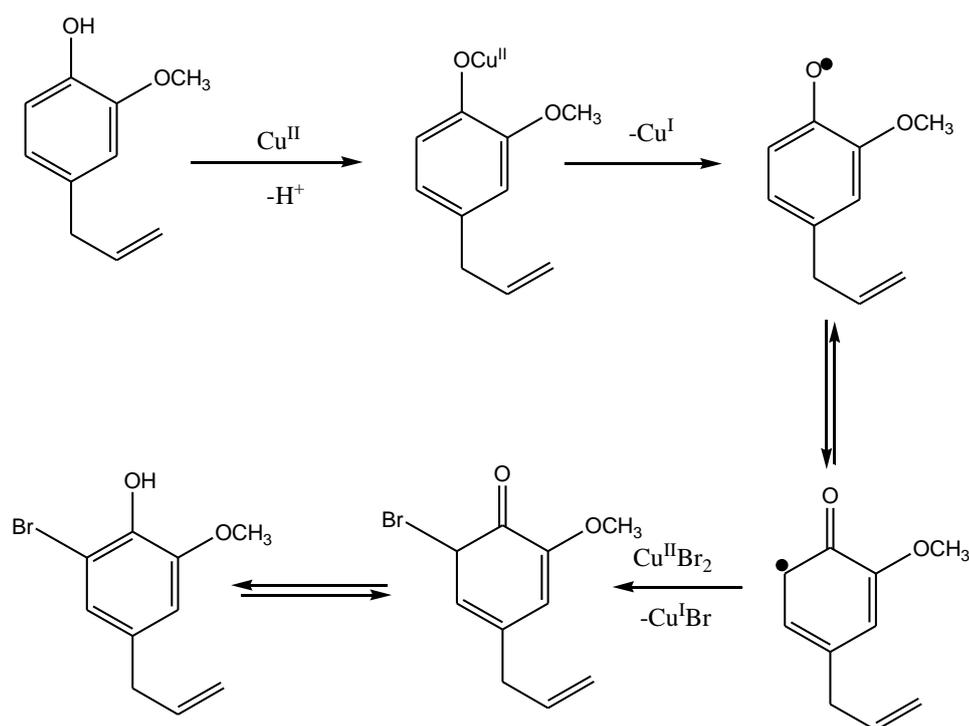
Dans le protocole **B**, les auteurs proposent une oxy-bromation sélective de l'eugénol en *ortho* basé sur l'emploi de LiBr en présence de l'oxygène atmosphérique et le Cu(OAc)<sub>2</sub> comme catalyseur dans l'acide acétique à 80°C [41]. Ainsi, nous avons utilisé ce dernier protocole. Nous représentons la synthèse du 6-bromo-eugénol dans la figure suivante (**Figure 1.40**).



**Figure 1.40:** Oxybromation de l'eugénol [41].

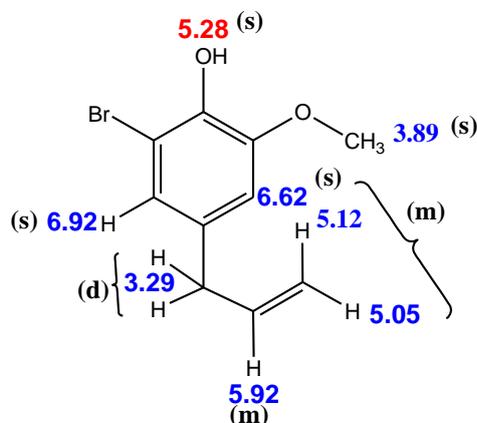
Le 6-bromo-eugénol **4** a été préparé comme décrit dans la littérature par la réaction oxybromation régiosélective : Monobromation en position *ortho* de l'eugénol par le dioxygène [41]. Pour cette synthèse ; la réaction a été réalisée à 80°C et sous oxygène atmosphérique (1 atm) en présence de **LiBr** comme électrophile et de **Cu(OAc)<sub>2</sub>** comme catalyseur dans l'acide acétique.

Nous proposons le mécanisme réactionnel de cette réaction.



**Figure 1.41** : Mécanisme réactionnel de l'oxybromation [42].

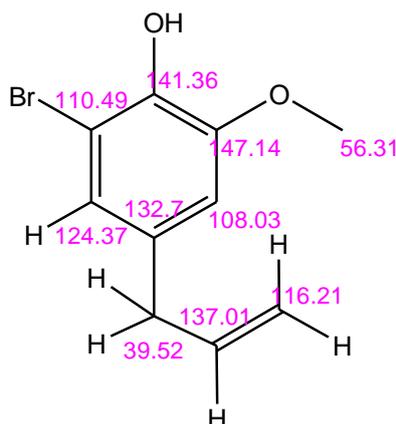
Le 6-bromoéugénole **4** a été obtenu, après la purification par chromatographie sur colonne de silice (EtOAc/EP) (2:98), et identification par chromatographie sur couche mince (CCM), (EtOAc/EP ; 10:90,  $R_f = 0.27$ ). La purification donne 74% d'huile de couleur jaune à l'odeur parfumée. Le produit obtenu détecté par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) et caractérisé par les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$ . Concernant l'analyse RMN du proton, le spectre du composé **5** montre bien la formation du 6-bromoéugénole (**Figure 1.42**).



**Figure 1.42**: Déplacements chimiques du proton du 6-bromoéugénole.

Les signaux des deux protons aromatiques dans les deux positions *mé*ta apparaissent respectivement 6.92 et 6.62 ppm sous forme de deux singulets. Ceci explique bien que la position *ortho* de l'eugénol est occupée par le substituant brome. Le proton du groupe hydroxyle apparaît à 5.28 ppm sous forme d'un singulet.

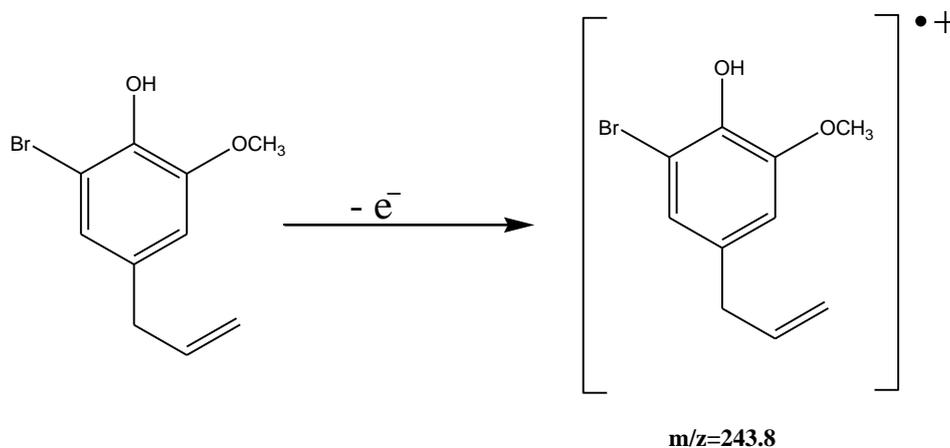
Le spectre RMN carbone 13 du produit **4** confirme les résultats de l'analyse de RMN du proton (**Figure 1.43**).



**Figure 1.43** : Déplacements chimiques en carbone 13 du 6-bromoéugénol.

L'analyse du produit **4** par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) a permis d'identifier un seul composé : le 6-bromoéugénol **4** (temps de rétention : 19.5 min).

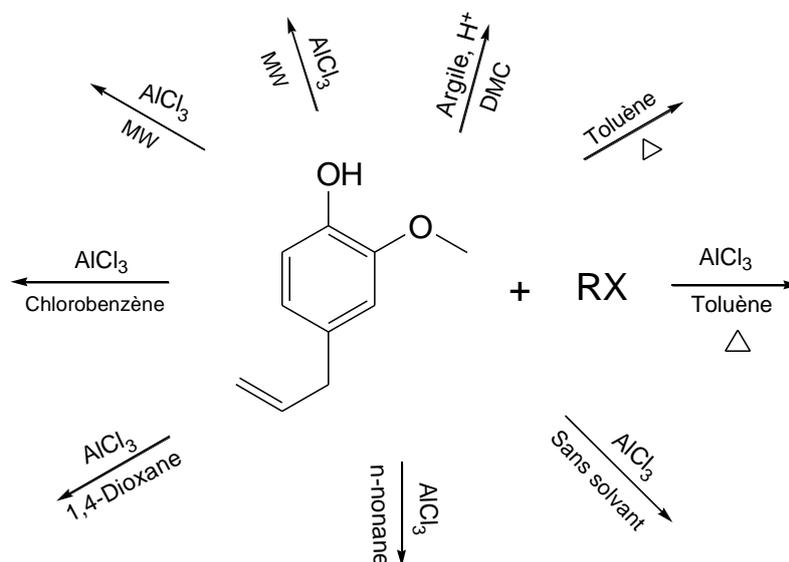
Nous donnons ci-dessous la formation du pic ion du 6-bromoéugénol **4** (**Figure 1.44**).



**Figure 1.44** : Formation du pic ion du 6-bromoéugénol.

#### 1.4.4. Essais de réactions de substitutions électrophiles aromatiques

Nous avons également effectué des essais de la réaction de substitutions électrophiles aromatiques. Ainsi, nous avons fait réagir l'eugénol sur des halogénures d'alkyles (IIaires et IIIaires) dans différentes conditions. Nous illustrons les résultats par la (**Figure 1.45**).



**Figure 1.45** : réactions de substitutions électrophiles aromatiques de l'eugénol.

A la lumière de toutes ces réactions avec ou sans catalyseur et solvant, nous avons récupéré nos produits de départ ou nous notons une dégradation totale. Nous ne pensons que le chauffage prolongé à causer la dégradation du catalyseur et des produits. Suite à ces résultats, nous avons pensé à réduire la température et à varier la polarité des solvants. Avec le chlorobenzène, l'analyse CG nous a permis de détecter en plus d'autres produits (produits de départ et sous produits) un seul produit résultant de la SEAr : 4-alkylchlorobenzène.

Ainsi, l'emploi de ce dernier solvant pourra être efficace pour l'activation de l'halogénure d'alkyle.

#### 1.4.5. Conclusion

L'ensemble des réactions ont été appliquées pour préparer différents dérivés de l'eugénol avec des rendements élevés ou moyens et par la suite d'évaluer leurs performances antioxydante et antibactérienne et d'établir -si possible- la relation structure-activité.

## **1.5. PARTIE EXPERIMENTALE**

### **1.5.1. Généralités**

#### **1.5.1.1. Produits chimiques**

Les produits commerciaux utilisés proviennent presque exclusivement de la société Sigma-Aldrich et sont employés sans aucune purification (qualité > 98 %).

#### **1.5.1.2. Solvants**

Pour les synthèses organiques, les solvants utilisés au cours des différentes réactions ont été distillés ou séchés à pression atmosphérique, sur chlorure de calcium pour le chloroforme ; sur pentoxyde de phosphore pour le dichlorométhane. L'éther éthylique distillé puis stocké sur sodium.

### **1.5.2. Techniques d'analyse**

#### **1.5.2.1. Température de fusion**

Les points de fusion mesurés par l'appareil sur Banc-Köffler.

#### **1.5.2.2. Chromatographies**

##### **1.5.2.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Le suivi des réactions par analyse CCM a été effectué sur plaque de gel de silice 60 Merck déposé sur des feuilles d'aluminium (indicateur de fluorescence à 254 nm, épaisseur 0,25 mm). L'évolution des réactions, ainsi que la pureté des produits sont contrôlés par chromatographie sur couche mince. Divers éluant ont été utilisés tels que les mélanges. Les composés sont révélés sous irradiations UV et/ou dans une solution d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%) ou dans une solution de KMnO<sub>4</sub>.

##### **1.5.2.2.2 Chromatographie sur colonne de silice**

Les produits synthétisés ont été purifiés par chromatographie sur colonne préparés en utilisant du gel de silice 60 (gel de silice de granulométrie 230 à 400, Merck) avec du solvant tels que l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'éther de pétrole.

##### **1.5.2.2.3. Chromatographie GC-MS**

Les analyses de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont été effectuées sur un appareil de chromatographie en phase gazeuse GC « Finnigan Trace Ultra Gas » équipé d'un injecteur PTV en mode splitless, l'hélium servant de gaz vecteur, d'une colonne capillaire en silice fondue RTX-5MS (longueur : 15 m ; diamètre : 0,25 mm ; phase stationnaire 5 % de phényl-silicone ; épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ), couplé à un spectromètre de masse « Finnigan Trace » (EI 70eV), la ligne de transfert étant portée à 250°C. La programmation du four est la suivante : 70°C lors de la première minute puis montée en température de 70 °C à 210°C à une vitesse de 15°C par minute. La température finale est maintenue pendant 15 minutes.

L'appareil CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectre de masse correspondant à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

### **1.5.3. Spectrométries**

#### **1.5.3.1. Spectrométrie Infra -Rouges (IR)**

Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre FT-IR Perkin-Elmer Paragon 1000 à transformée de Fourier à partir de pastilles de KBr pour les composés solides ou entre deux plaques de NaCl pour les composés huileux. Les fréquences principales sont données en nombres d'onde  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **1.5.3.2. Spectrométrie d'absorption UV-visible**

Les spectres UV-Visible ont été enregistrés sur un spectromètre (UV/VIS 1700 pharma Spectrophotomètre, SHIMADZU) avec des cuves en quartz de 1 et 10 mm d'épaisseur. Pour les études de l'activité antioxydante, le spectromètre est thermostaté à 23°C.

Les courbes ont été tracées à partir des données simulées en utilisant la fonction linéaire et le processus d'ajustement non-linéaire basée sur la Levenberg-Marquardt (Marquardt, 1963) algorithme implémenté dans le logiciel Origin v. 6.0.

#### **1.5.3.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker DPS300 fonctionnant respectivement à 300 MHz pour RMN  $^1\text{H}$  et 76 MHz pour RMN  $^{13}\text{C}$ .

Les produits ont été mis en solution dans le deutérochloroforme ( $\text{CDCl}_3$ ). Les déplacements chimiques sont rapportés en valeurs  $\delta$  par rapport à (TMS) ( $\delta$  7,26 pour la RMN du proton et 77,0  $\delta$  pour la RMN du carbone. Les données spectrales en RMN  $^1\text{H}$  sont présentées dans l'ordre : déplacement chimique, multiplicité, nombre de protons et attribution. Les déplacements chimiques sont exprimés en  $\delta$  ppm par rapport au pic du solvant utilisé, pris comme référence interne (le tétraméthylsilane (TMS) étant pris comme référence interne). Les abréviations utilisées sont les suivantes : (s) singulet, (d) doublet, (t) triplet, (m) multiplet ou massif et (c) complexe.

#### 1.5.3.4. Spectrométrie de masse (SM)

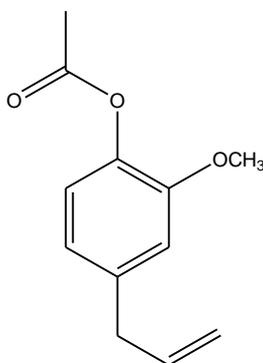
Les spectres de masse ont été obtenus avec Finnigan Thermo Quête avec une colonne capillaire en silice fondue (RTX 5MS) instrument.

### 1.5.4. Synthèse

#### 1.5.4.1. Synthèse d'acétate d'eugényle

On introduit dans un ballon de 250 ml, 6 ml d'eugénol ou 6 ml huile essentielle du clou de girofle et un excès d'anhydride acétique (6.5 ml). On ajoute quelques grains de pierre-ponce. On porte le mélange à reflux pendant 1 heure. Après refroidissement du mélange réactionnel, on ajoute 30ml d'eau distillée glacée. Après cristallisation le produit est filtré, rincé avec l'eau distillée glacée, et séché à l'air libre. Après avoir pris sa masse, on calcule le rendement de synthèse et on prend sa température de fusion. La réaction est contrôlée par CCM, en utilisant le mélange d'éluant : Toluène /Méthanol : 95 /05. Les produits isolés sont des solides blancs.

*Acétate d'eugényle* **3A** (source : huile essentielle du clou de girofle).



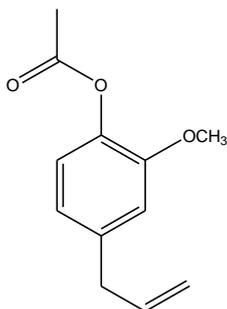
**3A**

**Formule brute : C<sub>12</sub> H<sub>14</sub> O<sub>3</sub>**

Rdt = 45%; M=206g/mole; t<sub>f</sub> = 25°C

**I.R (cm<sup>-1</sup>):** 3077(-CH=CH<sub>2</sub>); 3004(CH<sub>3</sub>-CO-); 2930 (C-H); 2839 (CH<sub>3</sub>-O); 1761 (C=O ester); 1680-1625 (C=C non conjugué); 1650-1505 (C=C aromatique); 1214(C-O phénolique).

**Acétate d'eugényle 3B** (source : eugénol commercial).



**3B**

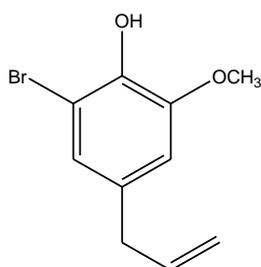
**Formule brute : C<sub>12</sub> H<sub>14</sub> O<sub>3</sub>**

Rdt= 85%; M=206g/mole; t<sub>f</sub>= 26.9°C

**I.R (cm<sup>-1</sup>):** 3077(-CH=CH<sub>2</sub>); 3004-2900(CH<sub>3</sub>-CO-); 2930 (C-H); 2839 (CH<sub>3</sub>-O); 1761 (C=O ester); 1680-1625 (C=C non conjugué); 1650-1505 (C=C aromatique); 1214(C-O phénolique).

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), δ (ppm):** 6.95 (d, 1H, J = 7.88 Hz), 6.82-6.670 (d, 2H, J = 3 Hz), 5.95 (m, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.12-5.05 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.25 (d, 2H, J = 6.73 Hz), 2.25 (s, 3H).

#### 1.5.4.2. Synthèse du 6-bromoéugénol



**4**

A une solution de l'eugénol (13 mmol) dans de l'acide acétique (32,6 ml) est ajouté du  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  (0,05 M) et du LiBr (0,08 M). La solution résultante a été agitée intensément sous atmosphère d'oxygène à 80 ° C pendant 16 h. Le mélange réactionnel a été laissé à refroidir à la température ambiante, puis désactivé par addition d'une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . Le mélange a été extrait avec de l'EtOAc et les phases organiques combinées ont été lavées avec de la saumure, séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et concentrée sous vide. La réaction est contrôlée par CCM, en utilisant le mélange (EtOAc/PE) (10 :90) de  $R_f = 0.27$ . Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice (EtOAc/ PE) (2 :98). La purification donne 74% d'huile de couleur jaune à l'odeur parfumée.

**Formule brute :  $\text{C}_{10} \text{H}_{11} \text{O}_2\text{Br}$**

Rdt= 74%; M=243.8g/mole;  $R_f = 0.27$  (EtOAc/PE) (10/90).

**RMN  $^1\text{H}$ :** ( $\delta$  ppm, J: Hz,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz): 6.92 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 5.92 (m, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.12-5.05 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.29 (d, 2H,  $J = 5\text{Hz}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$ :** ( $\delta$  ppm,  $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz): 147.14, 141.36, 137.01, 132.73, 124.37, 116.21, 110.49, 108.03, 56.31 et 39.52.

**MS (m/z): 243 (M $^+$ ).**

## Références bibliographiques

- [1] A. William- Johnson. Invitation to organic chemistry. **1999**.
- [2] J.H. Richards, D.J. Cram, G.S. Hammond .Eléments de chimie organique, *4ème tirage*, **1984**, p64.
- [3] a) P. Laszlo. Logique de la synthèse organique. Cours de l'Ecole Polytechniques, *Ellipses*, **1993**.b) G.Dupuis.Cours de chimie générale et organique.Lycée Faidherbe de LILLE ,**2001**.
- [4] A. Streitwieser, Jr. CH. Heathcok. Introduction to organic. *Macmillan publishing CO*. **1999**, 48(55), 44.
- [5] J. Koolman, K.H. Rohm. Atlas de biochimie (Médecine –Sciences Flammarion). **1999**, 55.
- [6] P. Ribereau-Gayon. Les composés phénoliques des végétaux: Ed *Dunod*, **1968**, Paris.
- [7] I. Zemmermann. Element of Organic Chemistry: Ed *Millan publishing Co*, 2<sup>ième</sup> edition, 1983.
- [8] N. Allinger. Chimie Organique: Ed *McGrew Hill*, 6<sup>ième</sup> edition, **1983**.
- [9] K. Vatsouro. Réaction Organiques. *Edition Mir*. **1982**.
- [10] J. D. Roberts, M. C. Caserio. Chimie organique moderne. *Inter Edition*. **1977**, p 637-641.
- [11] J. Berthelot, C. Guette, P. L. Desbène, J. J. Basselier, P. Chaquin et D. Masure. *Can J Chem*. **1989**, 67, 2061.
- [12] I. Finar. Organic chemistry. *Longman Scientific & technical*, 5<sup>ième</sup> edition, **1996**, 5.
- [13] a)M. Chanseau, S. Bosc, E. Galiay, G. Oules. L'utilisation De L'huile De Clou De Girofle Comme Anesthésiques Pour Les Smolts De Saumon Atlantique (Salmo Salar L.) Et Comparaison De Ses Effets Avec Ceux Du 2-Phnoxyethanol. *Bull. Fr. Pêche Piscic*. **2002**, 579-589.b) M.C.Raja,V.Srinivasan ,S.Selvaraf,S.K.Mahapatra. Eugenol: Aversatrle phytomedicine *.Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*.**2015**, 7(1), 35-40.
- [14] a) L.G. Lee, T. Shibamoto. *Food Chem*. **2001**, 74, 443-448. b) R. Mahboub.Structural conformational study of eugenol derivatives using semiempirical method's *.Advances in chemistry*.**2014**, 1-5. c) M.R. Charan Raja. Versatile and synergistic potential of eugenol. *Pharmaceutica analytica*.**2015**,6(5).
- [15] D.C. Thompson, R. Barhoumi, R.C. Burghardt. Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays. *Toxicology and applied pharmacology*. **1998**, 149, n° 1, 55–63.

- [16] S. Fujisawa, T. Atsumi, Y. Kadoma, H. Sakagami. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*. **2002**, 177, n° 1, 3.
- [17] J. Usta, R. Copti, R. Effect of cinnamon, clove and some of their constituents on the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity and alanine absorption in the rat jejunum. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, 38, 755–762.
- [18] A.A. Gursale, R.T. Sane, S. Menon, P.H. Patel. Quantitative determination of eugenol from *Cinnamomum tamala* nees and eberm. Leaf powder and polyherbal formulation using reverse phase liquid chromatography. *Chromatographia*. **2005**, 61, 443–446.
- [19] I.F. Stamford, I.A. Tavares, S. Jacobs, F. Capasso, N. Mascolo, G. Autore, V. Romano. The biological activity of eugenol, a major constituent of nutmeg (*Myristica fragrans*): Studies on prostaglandins, the intestine and other tissues. *Phytother. Res.* **1988**, 2, 124–130.
- [20] Y.S. Bajaj. Medicinal and Aromatic Plants V: Ed *Springer*, 5<sup>ième</sup> édition. **1993**, 5, 391.
- [21] A. Strugala, A. Paoli. Rapport de Phytochimie Extraction de l'Eugénol dans le clou de girofle Dosage UV et CPG. Université de Strasbourg. **2011**. R. Laverrière. TP Organique de 1ère année, Université de Genève, Science II, Laboratoire G. 12 mai **2011**.
- [22] J. Memelink. The use of genetics to dissect plant secondary pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. **2005**, 8, 230-235.
- [23] N.L. Paiva. An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant –microbe communication. *J Plant Growth Regul.* **2000**, 19, 131-143.
- [24] N.S. Sangwan, A.H. Farooqi, F.H. Shabi, R.S. Sangwan. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. **2001**, 34, 3-21.
- [25] M. Ya. Lovkova, G. Buzuk, S.M. Sokolova, N.I. Klimentéva. Chemical Features of Medicinal Plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **2001**, 3, n° 3, 229-237.
- [26] M. Klischies, J. Stöckigt, M.H. Zenk. Biosynthesis of the Allylphenols Eugenol and Methyleugenol in *Ocimum basilicum* L. *J.C.S Chem Comm.* **1976**, 2, 879-880.
- [27] Ce document intitulé « Eugénol - Indications, posologie et effets secondaires » issu de Sante-Medecine (santemedecine. commentcamarche.net) Juin **2014**.
- [28] I.U. Fischer, G.E. Von Unruh et H. J. Dengle. The metabolism of eugenol in man. *Xenobiotica*. **1999**, 20, 209-222.
- [29] J. C. Chottard, J.C. Depezay, J. P. Leroux –Chimie fondamentale, *Hermann*. **1999**.

- [30] J. C. Shattuck , Ch. M. Shreve , and S.E. Solomon. Enantioselective Synthesis of Imperanene, a Platelet Aggregation Inhibitor. *Organic Letters*. **2001**, 3 (19), 3021.
- [31] G. Kozam .The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. **1977**, 44, 799-805.
- [32] T. Ohkubo, M. Shibata. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *J Dent Res*. **1995**, 76, 848-851.
- [33] J.A. Garibaldi, J. Greenlaw, J. Choi , M. Fotovatjah. Treatment of postoperative pain. *CDA Journal*.**1995**, 23, 71-72.
- [34] J. Colat-Parros, F. Jorrdana, P.H. Choussat. Société Francophone de Biomatériaux Dentaires. Date de création du document **2010-2011**.
- [35] G. Eyambe, L. Canales. B.K. Banik. Antimicrobial Activity of Eugenol Derivatives. *heteroletters.org*. **2011**, 1(2), 154-157.
- [36] L. Amanda, S. Dos, O.Ch. Gilberto, A. Kenneth, R. Alan. Crystal Structure Determination for Eugenol Acetate. *J Chem Crystalloger*. **2009**, 39, 655-661.
- [37] S. Hamri, K. Rhazri, A. Hafid, H. Ouchetto, Y. Hajbi. M. Khouili. Clove (*Eugenia Caryophyllata*) Extraction and Synthesis of New Pyrazole Derivatives from Eugenol. *Global Journals Inc*. **2013**, 13.
- [38] A.H. Alimuddin, M.I.D. Mardjan, S. Matsjeh, Ch. Anwar, Mustofa, E.N. Sholikhah. Synthesis 7-Hydroxy-3', 4'- Dimethoxyisoflavon From Eugenol. *Indo J Chem*. **2011**, 11 (2), 163-168.
- [39] E. Agar, S. Sasmaz, A. Agar. Synthesis and Properties of the Phthalocyanines Containing Eugenol (4-Allyl-2-Methoxyphenol). *Turk J Chem*.**1999**, 23, 131-137.
- [40] J.H. Kwak , J.K. In, M.S. Lee, E.H. Choi, H. Lee, J.T. Hong, Y.P. Yun, S.J. Lee, S.Y. Seo, Y.G. Suh, J.K.Jung. Concise Synthesis of Obovatol: Chemoselective *ortho*-Bromination of Phenol and Survey of Cu-Catalyzed Diaryl Ether Couplin. *Arch Pharm Res*. **2008**, 31 (12), 1559-1563.
- [41] L. Menini, L.A Parreira, E.V Gusevskaya. A practical highly selective oxybromination of phenols with dioxygen. *Tetrahedron Lett*. **2007**, 48, 6401-6404.

# CHAPITRE 2

# Chapitre 2

Etude antioxydante et antibactérienne :

Partie I. Evaluation de l'activité antioxydante des dérivés de l'eugénol et études cinétiques.

Partie II. Evaluation de l'activité antibactérienne

## **Première partie**

Activité antioxydante des dérivés de l'eugénol et études cinétiques.

## 2. Activité antioxydante

### 2.1. Introduction

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme.

### 2.2. Les radicaux libres et le stress oxydant

#### 2.2.1. Le stress oxydant

##### 2.2.1.1. Introduction

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux [1, 2]. Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies [3]. C'est le facteur potentiel du à l'apparition des maladies plurifactorielles telles que les maladies cardiovasculaires [4] cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète [5, 6].

Vu la diversité et la gravité des maladies qu'induit le stress oxydant, plusieurs équipes de chercheurs se sont investis dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre le stress oxydant et ses pathologies associées.

##### 2.2.1.2. Définition

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des Espèces Réactives dérivées de l'Oxygène (ERO) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [4].

#### 2.2.2. Radicaux libres

##### 2.2.2.1. Définition

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres

atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses, Il existe deux grandes voies de formation de ces derniers [7] :

- La première voie consiste en un transfert d'électrons catalysé par les métaux de transition (Fe, Cu). Ils transforment  $\text{H}_2\text{O}_2$  en radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique.
- La deuxième voie se fait au niveau de la scission homolytique des liaisons covalentes des molécules. Cette voie nécessite de l'énergie qui pourra être fournie par les radiations ionisantes, par la lumière, la chaleur et les ultrasons.

### 2.2.2.2. Nature des radicaux libres

#### 2.2.2.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

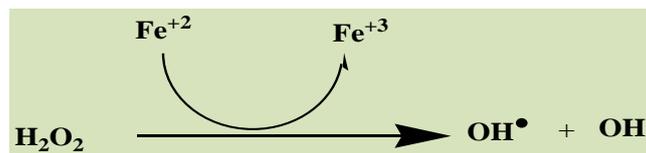
L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme.

##### 2.2.2.2.1.a. Ion superoxyde

L'ion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.

##### 2.2.2.2.1.b. Radical libre hydroxyle: $\text{HO}^\bullet$

Le radical libre hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons une réaction à titre d'exemple: la réaction de Fenton [8]. Elle est basée sur la production des radicaux hydroxyles à partir de la décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par des sels ferreux selon l'équation suivante:



Dans l'oxydation des lipides, la réaction de Fenton peut s'écrire de la manière suivante [9] :



#### 2.2.2.2.1.c. Oxygène singulet: $^1\text{O}_2$

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



#### 2.2.2.2.2. Espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO). Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs.

Nous citons à titre d'exemple, les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques. Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO pour générer des molécules réactives et nocives.

### 2.3. Antioxydants

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

#### 2.3.1. Définition

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par HALLIWELL comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat » [10]. C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

### 2.3.2. Utilisation des antioxydants

- ❖ Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation ;
- ❖ Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras ;
- ❖ Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture.

### 2.3.3. Additifs alimentaires

La définition des additifs retenue par la réglementation européenne selon la Directive 89/107/CEE du 21 décembre 1988, et reprise dans les textes français est la suivante : "On attend par additif alimentaire toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi, habituellement non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive ; son adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires est faite dans un but technologique, au stade de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage : elle a pour effet de devenir elle-même, ou ses dérivés, un composant des denrées alimentaires"[11]. Les additifs alimentaires sont classés en catégories et doivent répondre à un besoin : avoir un rôle d'amélioration sur la conservation et la stabilisation, aider à la fabrication, l'emballage et le transport, n'avoir aucun danger pour la santé aux doses utilisées, être soumis à des essais toxicologiques permanents, répondre à des critères de pureté spécifiques (**Tableau 2.1**) [12].

**Tableau 2.1:** Classification des additifs alimentaires [12].

| Nom          | Numérotation conventionnelle | Définition   | Exemples                                 |
|--------------|------------------------------|--|--|
| Colorant     | E 100                        | Substance qui ajoute ou redonne de la couleur aux aliments   | Curcumine (E 100)                        |
| Conservateur | E 200                        | Substance qui prolonge la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations dues aux micro-organismes | Acide benzoïque et dérivés (E210-E219)   |
| Anti-oxygène | E 300                        | Substance qui prolonge la durée de conservation des aliments en les protégeant des altérations provoquées par oxydation              | Vitamine C (E 300)<br>Vitamine E (E 306) |

### 2.4. Classification des antioxydants

Les antioxygènes sont classés dans trois catégories différentes :

- 1-Les antioxygènes de synthèse.
- 2-Les substances synergiques.
- 3-Les antioxygènes d'origine végétale.

### 2.4.1. Antioxygènes de synthèse

Les antioxydants de synthèse sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases. Leur concentration d'utilisation est généralement dix fois plus faible que celle des conservateurs et se situe entre 0,02 et 0,05 % [13,114]. Ce sont :

- le butylhydroxytoluène (BHT),
- le butylhydroxyanisole (BHA),
- les gallates de propyle, octyle et de dodécyle.

Le **tableau 2.2** montre quelques limites d'utilisation des antioxydants de synthèse.

**Tableau 2.2:** Quelques exemples d'utilisation réglementée des antioxydants de synthèse [13,14].

| Nature de l'aliment  | Antioxydant                         | Concentration Maximale (ppm) |
|--|-------------------------------------|------------------------------|
| Saindoux, graisse de bœuf, de volaille et de mouton, Huile de poisson. | Gallates et BHA seuls ou en mélange | 200                          |
|  | BHT                                 | 100                          |
| Complément alimentaire   | Gallates, BHT et BHA                | 400                          |
| Soupes et viandes déshydratées, lait en poudre                         | Gallates et BHA seuls ou en mélange | 200                          |

### 2.4.2. Substances synergiques

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants. Ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection. Parmi eux se trouvent : les acides lactique, tartrique et orthophosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants [15,14]. Le temps mesuré en jours mis pour atteindre un indice en peroxyde de 20 meq/kg pour un saindoux stocké à 65 °C en récipients ouverts est donné dans le **tableau 2.3**.

**Tableau 2.3:** Effet synergique de l'association de plusieurs antioxydants [15,14].

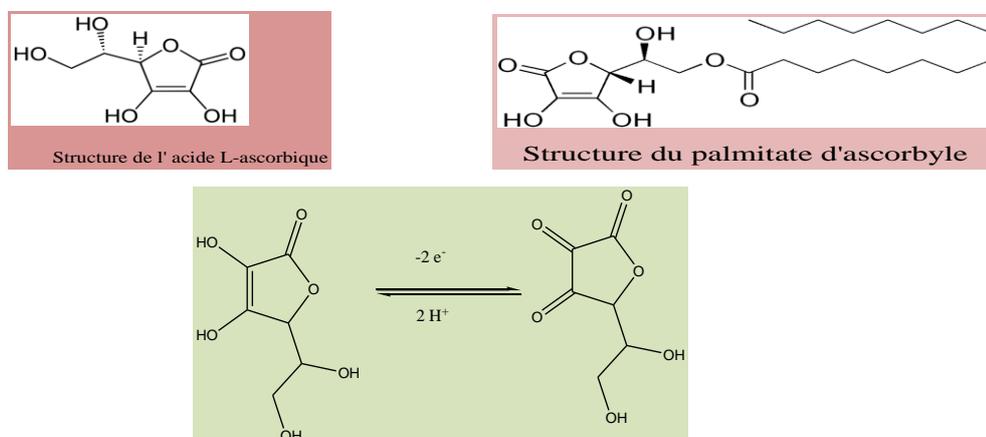
| Antioxygènes et synergistes (mg/kg de saindoux) |                       |                          |           |               |
|---|-----------------------|--------------------------|-----------|---------------|
| Echelle   | Palmitate d'ascorbyte | dl- $\alpha$ -tocophérol | Lécithine | Durée (jours) |
| Témoin  | 0                     | 0                        | 0         | 1             |
| 1   | 250                   | 0                        | 0         | 4             |
| 2   | 0                     | 50                       | 0         | 4             |
| 3   | 0                     | 0                        | 700       | 1             |
| 4   | 250                   | 50                       | 0         | 17            |
| 5   | 250                   | 50                       | 700       | 30            |

### 2.4.3. Antioxygènes d'origine végétale

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols [16].

#### 2.4.3.1. Acide ascorbique ou vitamine C et ses dérivés:(SIN300)

Il peut être d'origine naturelle (fruits et légumes) ou synthétique. L'acide L-ascorbique (vitamine C) et son dérivé le palmitate d'ascorbyle sont des antioxydants utilisés en synergie. La vitamine C fut découverte en 1924 par Szent-Györgyi et sa synthèse fut réalisée en 1934, à partir du glucose. Il possède un caractère acide et intervient dans les échanges d'oxydoréduction grâce à sa fonction ène-diol comme le montre la **Figure 2.1**. L'acide L-ascorbique s'oxyde en acide déshydroascorbique, prévenant ainsi l'oxydation d'autres substances moins réactives [12].



**Figure 2.1:** Oxydation de l'acide L-ascorbique [12].

### 2.4.3.2. Tocophérols

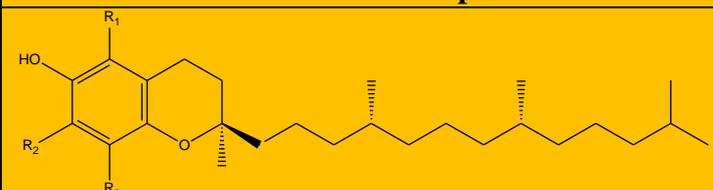
La grande stabilité des huiles végétales, dans les conditions d'oxydation, est due à la présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels dont les plus importants sont les tocophérols qui se présentent sous quatre formes isométriques:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ . Les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI). Sebie.K et *al.* ont signalé qu'une molécule de tocophérol peut protéger 103 à 106 molécules d'AGPI [17]. Son activité anti-oxydante repose principalement sur l'existence du système de réduction tocophérol - tocophérylquinone. En effet, une molécule de tocophérol peut réduire deux radicaux lipidiques en formant une molécule de l' $\alpha$ -tocophérylquinone, en revanche, deux radicaux tocophéryls peuvent s'associer entre eux pour former des dimères qui peuvent avoir des propriétés antioxydantes.

Certains auteurs ont démontré, en utilisant des analyses statistiques appropriées, que pour les huiles végétales, il y a une corrélation positive entre l' $\alpha$ -tocophérol et l'acide linoléique (C18:2) et probablement entre le  $\gamma$ -tocophérol et l'acide linoléique (C18:3). Il y a une indépendance complète entre les teneurs en tocophérols et les taux des acides gras saturés (C16:0 et C18:0) et monoinsaturés (C16:1 et C18:1) [17].

### 2.4.3.3. Exemple : Vitamine E

La chimie de la vitamine E est relativement complexe. Le terme vitamine E correspond à 2 grands groupes de molécules : les tocophérols et les tocotriénols, comprenant chacun 32 stéréoisomères. La biosynthèse de la vitamine E s'effectue dans les plantes, les algues et les champignons mais pas chez les animaux. La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols. Cette famille comprend 4 substances : l' $\alpha$ -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le  $\beta$ -tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol et le  $\delta$ -tocophérol. Ces composés ont, par ailleurs, beaucoup de similitudes structurelles avec 4 autres molécules appartenant à la famille des tocotriénols : l' $\alpha$ -tocotriénol, le  $\beta$ -tocotriénol, le  $\gamma$ -tocotriénol et le  $\delta$ -tocotriénol.

La structure chimique des tocophérols se compose d'un cycle chromanol mono-, di-, ou tri méthylé auquel se trouve rattachée une chaîne carbonée latérale (chaîne phytyle) saturée de 16 carbones. Les tocophérols diffèrent entre eux seulement par le nombre et l'arrangement des groupements méthyles autour du cycle benzène du noyau chromanol . La structure chimique des tocotriénols se compose également d'un cycle chromanol mono-, di- ou triméthylé avec chaîne carbonée latérale, mais celle-ci contient 3 doubles liaisons en position 3', 7' et 11' [18]. **La figure 2.2** montre la structure chimique de la Vitamine E.

| Substituants des tocophérols  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | Nom                 |
|---|----------------|----------------|----------------|---------------------|
|  | Me             | Me             | Me             | <b>α-tocophérol</b> |
|   | Me             | H              | Me             | <b>β-tocophérol</b> |
|   | H              | Me             | Me             | <b>γ-tocophérol</b> |
|   | H              | H              | Me             | <b>δ-tocophérol</b> |

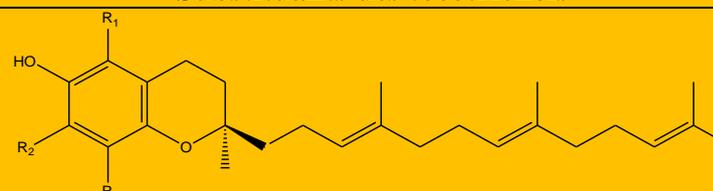
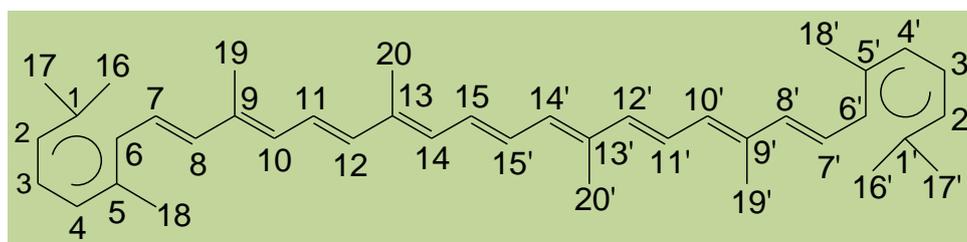
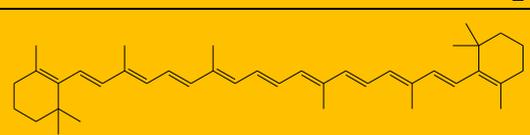
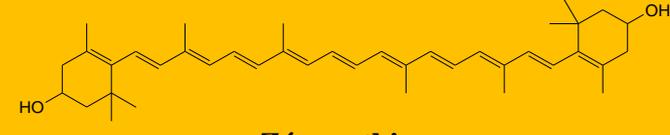
| Substituants des tocotriénols   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | Nom                  |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------------|
|  | Me             | Me             | Me             | <b>α-tocotriénol</b> |
|   | Me             | H              | Me             | <b>β-tocotriénol</b> |
|   | H              | Me             | Me             | <b>γ-tocotriénol</b> |
|   | H              | H              | Me             | <b>δ-tocotriénol</b> |

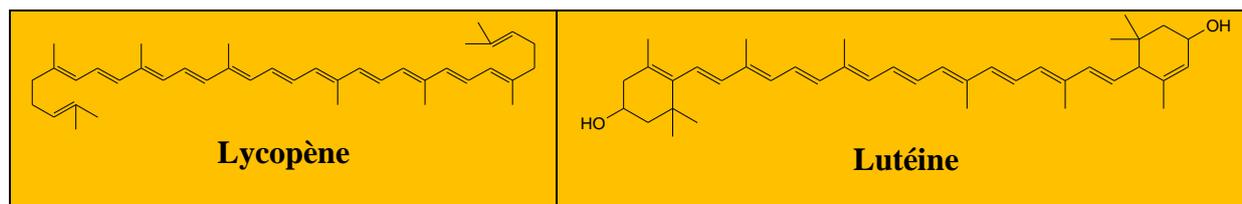
Figure 2.2: Structure chimique de la Vitamine E [18].

#### 2.4.3.4. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont, avec la chlorophylle et les anthocyanes, les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seule une quarantaine est retrouvée régulièrement dans l'alimentation humaine. Une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée dans le plasma et les tissus humains, mais 6 caroténoïdes sont majoritaires : le β-carotène, l'α-carotène, le lycopène, la β-cryptoxanthine, la zéaxanthine et la lutéine [17]. Dans la figure 2.3 sont données les structures des principaux caroténoïdes [19].



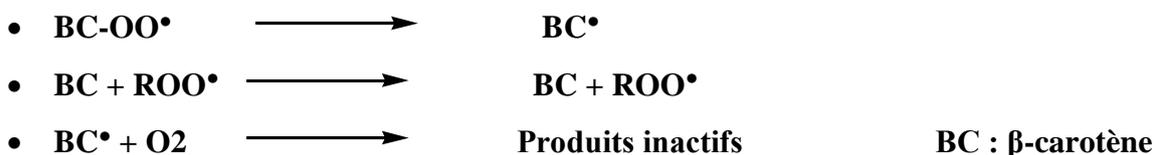
| Polyène en C40   |   |
|--|---|
|  <p><b>β-Carotène</b></p> |  <p><b>β-Cryptoxanthine</b></p> |
|  <p><b>α-Carotène</b></p> |  <p><b>Zéaxanthine</b></p>      |



**Figure 2.3:** Structure des principaux caroténoïdes [19].

Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le  $\beta$ -carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertis en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A. Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes [20,14]:

- Ils sont capables de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes :



- Ils empêchent l'initiation des réactions radicalaires en neutralisant l'oxygène singulet. Néanmoins, tous les caroténoïdes n'ont pas la même efficacité pour inactiver l'oxygène singulet. Par ordre décroissant d'efficacité on classe : le lycopène, puis le  $\beta$ -carotène et enfin la lutéine [20,14].

#### 2.4.3.5. Composés phénoliques

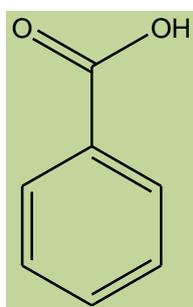
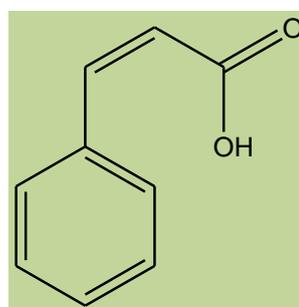
Les composés phénoliques ou les polyphénols sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins [21]. Ils ne se rencontrent pas dans la nature à l'état libre mais sous forme d'esters ou plus généralement sous forme d'hétérosides [22]. Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées) (Tableau 2.4). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) [23].

**Tableau 2.4:** Les principales classes de composés phénoliques [24,14].

| Squelette carboné                              | Classe   | Exemple  | Origine  |
|--|--|--|--|
| C <sub>6</sub>                                 | Phénols simples  | Catéchol   |  |
| C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>                 | Acides hydroxybenzoïques   | p-Hydroxybenzoïque   | Epices, fraise   |
| C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                 | Acides hydroxycinnamiques<br>Coumarines  | Acides caféique,<br>fêrulique scopolétine,<br>esculétine   | Citrus<br>Citrus   |
| C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>                 | Naphtoquinones   | Juglone  | Noix   |
| C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> | Stilbènes  | Resvératrol  | Vigne  |
| C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> | Flavonoïdes, Flavonols<br>Anthocyanes, -Flavanols<br>Flavanones,<br>Isoflavonoïdes | Kaempférol, quercétine,<br>pélargonidine, Cyanidine<br>Catéchine, épicatechine<br>Naringénine, Déidzéine | Fruits, légumes, fleurs<br>fruits rouges, Pomme,<br>raisin Citrus, Soja,<br>pois |
| (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | Lignanes   | pénorésinol  | Pin  |
| (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> | Lignines   |  | Bois, noyau des fruits   |
| (C <sub>15</sub> ) <sub>n</sub>                | tannins  |  | Raisins rouges, kaki   |

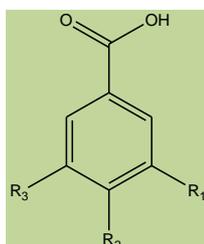
#### 2.4.3.5.a. Acides phénoliques (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> ou C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique [25]. Les deux groupes essentiels des acides phénoliques sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ces derniers sont des dérivés des molécules non phénoliques qui sont respectivement l'acide benzoïque (**Figure 2.4**) et l'acide cinnamique (**Figure 2.5**) [26].

**Figure 2.4:** Structure de l'acide benzoïque**Figure 2.5:** Structure de l'acide cinnamique

### 2.4.3.5.a1. Acides hydroxybenzoïques C6-C1

Les acides phénoliques en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque sont très commun aussi bien sous forme libre que combiné, à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère sont les éléments constitutifs des tanins hydrolysables [27]. La **figure 2.6** montre quelques structures de ce type d'acide phénolique [17,14].

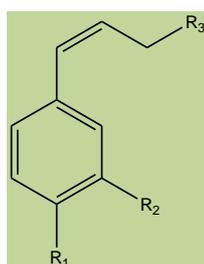


| Nom                       | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub> |
|---------------------------|------------------|------------------|----------------|
| Acide benzoïque           | H                | H                | H              |
| Acide hydroxy-4-benzoïque | H                | OH               | H              |
| Acide méthoxy-4-benzoïque | H                | OCH <sub>3</sub> | H              |
| Acide protocatéchique     | OH               | OH               | H              |
| Acide gallique            | OH               | OH               | OH             |
| Acide vanillique          | OCH <sub>3</sub> | OH               | H              |

**Figure 2.6:** Structure des acides hydroxybenzoïques [17,14].

### 2.4.3.5.a2. Acides hydroxycinnamiques C6-C3

Pluspart des acides phénoliques en C6-C3 dérivés de l'acide cinnamique (**Figure 2.7**) comme l'acide *p*-coumarique, caféique et férulique ont une distribution très large [22]; les autres (Ex : acide 2-coumarique) sont peu fréquents. Rarement libres, ou alors sont des artefacts, ils sont souvent estérifiés [25,14].



| Nom                        | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub> |
|----------------------------|------------------|------------------|----------------|
| Acide cinnamique           | H                | H                | COOH           |
| Acide <i>p</i> -coumarique | H                | OH               | COOH           |
| Acide caféique             | OH               | OH               | COOH           |
| Acide Férulique            | OCH <sub>3</sub> | OH               | COOH           |
| Acide Isoférulique         | OH               | OCH <sub>3</sub> | COOH           |

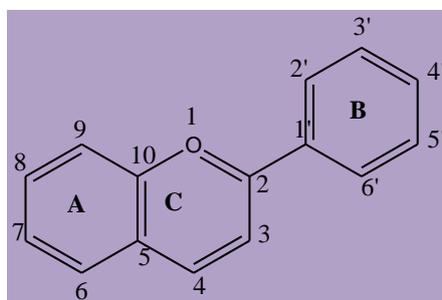
**Figure 2.7:** Structure des acides hydroxycinnamiques [25,14].

#### 2.4.3.5.b. Flavonoïdes C6-C3-C6

D'après Jeremy Paul Edwards, les flavonoïdes constituent le groupe le plus important de substances naturelles polyphénoliques de notre alimentation [27]. Ils se trouvent dans le règne végétal. Les sources alimentaires principales incluent les jus de fruits, les légumes, les céréales, le thé, le vin et les fruits. Leur structure se compose de deux cycles aromatiques de carbone formant un noyau benzopyranique (cycles A et C) et d'un noyau benzénique (cycle B) (**Figure 2.8**). Basé sur le nombre, la position et la nature des substituants des deux cycles aromatiques et sur le degré d'oxydation et de substitution de la position 3 du cycle C, les flavonoïdes peuvent être divisés en six sous-groupes. Parmi ceux-ci nous trouvons :

- ✿ Les flavonols (kaempferol, quercétine), qui sont abondants dans les oignons, les poireaux, le brocoli.
- ✿ Les flavones (apigénine, lutéoline), qui sont retrouvés dans le persil et le céleri.
- ✿ Les isoflavones (daïdzéine, génistéine), majoritaires dans les produits issus du soja.
- ✿ Les flavanones (hespéretine, naringénine), qui sont particulièrement abondants dans les agrumes et les tomates.
- ✿ Les flavanols ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine, épigallocatechine, épigallocatechine gallate (EGCG), qui sont retrouvés dans le thé vert, le vin rouge, le chocolat.
- ✿ Les anthocyanes (pélagonidine, cyanidine, malvidine), dont les sources incluent le vin rouge et les baies [14].

Les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. De plus, ils ont une activité chélatante due aux métaux tels que le cuivre et le fer, qui à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss [28]. Ils sont des substances liposolubles et hydrosolubles.



**Figure 2.8** : Structure de base des flavonoïdes [27].

#### 2.4.3.5.c. Coumarines C6-C3

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Ce sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux. Cependant, leur voie de biosynthèse peut varier d'une espèce à l'autre. En effet, la scopolétine de tabac dérive de l'acide férulique, tandis que des expériences d'apport de précurseurs marqués semblent montrer que ce n'est pas le cas chez le tournesol [29].

#### 2.4.3.5.d. Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

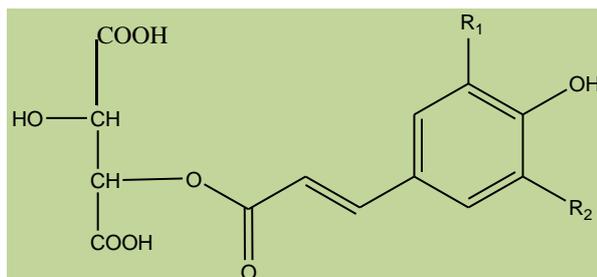
Très répandu dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue: les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

- ✿ Les pyrogalliques (ou hydrolysables).
- ✿ Les catéchiques (ou condensés non hydrolysables).

Les tanins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tannins sont le vin et le thé [30].

#### 2.4.3.6. Composés phénoliques des raisins

Le raisin renferme trois dérivés hydroxycinnamiques, sous forme d'esters tartriques: acides caféoyltartrique (caftarique), *p*-coumaroyltartrique (coutarique) et féruloyltartrique (fertarique) (**Figure 2.9**) [31,14]. La forme naturelle est le *trans* (E) mais les isomères *cis* (Z), existent en faible quantité.

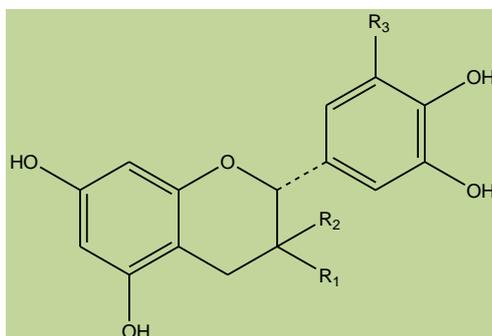


| Nom  | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>   |
|--|----------------|------------------|
| Acide <i>trans</i> - <i>p</i> -coumarocyltartrique | H              | H                |
| Acide <i>trans</i> -Caféoyltartrique               | OH             | H                |
| Acide <i>trans</i> -féuloytartrique                | OH             | OCH <sub>3</sub> |

**Figure 2.9:** Structure des acides hydroxycinnamiques du raisin [31,14].

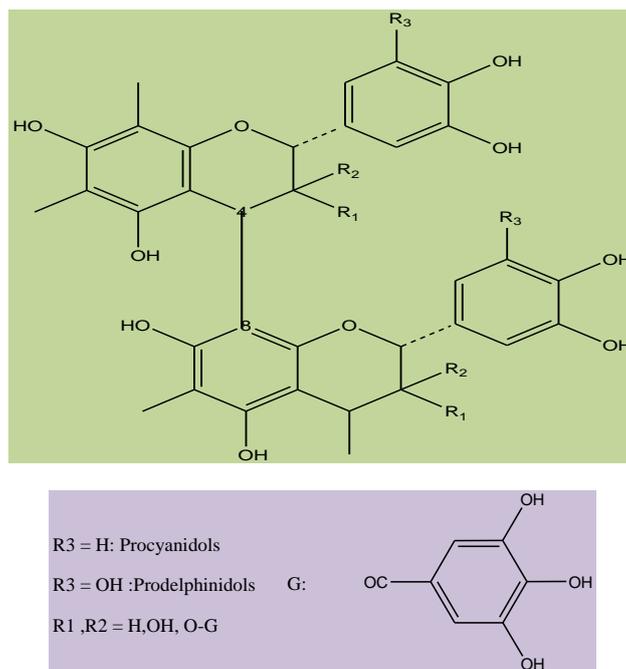
Les tannins du pépin sont des procyanidines, partiellement galloylés, basés sur des unités catéchine, épicatechine et 3-o-gallate d'épicatéchine, liées entre elles par des liaisons C4-C6 ou C4-C8. Les tannins de pellicule comprennent aussi des prodelphinidines et présentent des proportions de gallates inférieures à ceux des tannins de pépins.

Les **figures 2.10** et **2.11** représentent les structures des tannins du raisin.



| Nom                   | R1 | R2 | R3 |
|-----------------------|----|----|----|
| (+)-catéchine         | OH | H  | H  |
| (-)-épicatechine      | H  | OH | H  |
| (+)-gallocatéchine    | OH | H  | OH |
| (-)-épigallocatéchine | H  | OH | OH |

**Figure 2.10 :** Monomères du raisin [31,14].



**Figure 2.11:** Proanthocyanidols [31,14].

#### 2.4.3.7. Composés phénoliques des margines

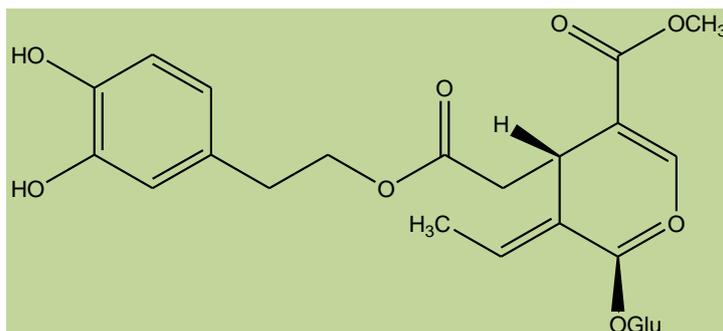
A l'origine, la margine est un liquide de couleur brune rougeâtre, qui se transforme en margine de couleur noir, d'aspect trouble et d'une odeur spécifique d'huile d'olive [14].

Elle est caractérisée par un pH acide entre 4,2 et 5,9 et une très grande conductivité électrique entre 18 et 50 ms.cm<sup>-1</sup> [32]. Sa couleur noir est dû à la présence des polyphénols.

La margine peut être considérée comme un complexe chargé en matières organique et minérale. Sa composition massique est de 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matières organiques et 0,4 à 2,5% de sels minéraux [33].

#### 2.4.3.8. Composés phénoliques des feuilles d'olivier

Les feuilles représentent une source naturelle de plusieurs antioxydants qui peuvent avoir diverses applications dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire. Les analyses montrent que l'oleuropéine est le composé majoritaire, elle atteint un pourcentage de 14,2% de la matière sèche et l'hydrolyse acide de l'extrait des feuilles produit une concentration élevée en hydroxytyrosol (2,3g d'hydroxytyrosol / 100g de feuilles fraîches) (Figure 2.12) [34,14].



**Figure 2.12:** Structure de l'oleuropéine [34,14].

L'effet antioxydant des extraits phénoliques des feuilles d'olivier pour empêcher l'oxydation de l'huile d'olive et celle de tournesol est supérieur à celui du BHT et BHA [35].

#### 2.4.3.9. Composés phénoliques extraits de végétaux (épices)

Ces composés ne sont pas reconnus comme additifs car ils sont étiquetés comme « épices ». Leur statut pourrait évoluer de par leurs propriétés antioxydantes [12]. La première étude des pouvoirs antioxydants des épices remonte à 1952-1955 (Chipault) [36, 37]. Les principaux végétaux riches en composés phénoliques sont répertoriés dans le **tableau 2.5**.

**Tableau 2.5 :** Quelques composés phénoliques à activité antioxydante dans les épices [12].

| Végétaux  | Composé phénolique présent      | Structure |  |  |
|-----------|---------------------------------|-----------|--|--|
| Gingembre | Gingérol / Shogaol<br>Zingérone |           |  |  |
| Muscade   | Isoeugénol /Eugénol             |           |  |  |
| Vanille   | Vanilline                       |           |  |  |
| Curcuma   | Curcumine                       |           |  |  |

## 2.5. Mécanismes d'action des antioxydants

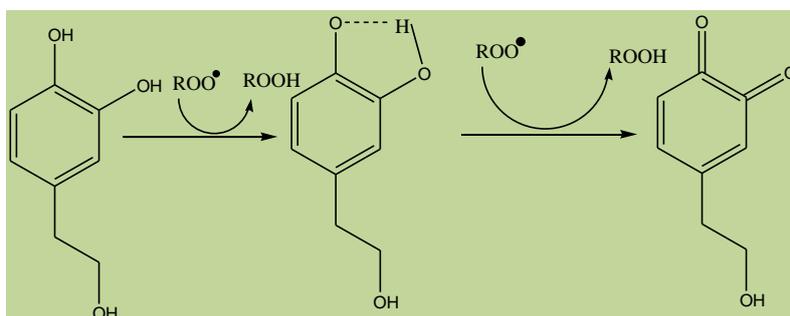
Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation [38] :

- Soit intercepter les radicaux libres responsables de la réaction en chaîne.
- Soit éviter la décomposition des hydroperoxydes dans les radicaux libres.

Ces deux options fournissent la base de classification des antioxydants sous forme primaire ou secondaire selon leur mécanisme d'action [14].

### 2.5.1. Antioxydants primaires ou distributeurs de chaîne

Ils sont caractérisés par la possession d'atomes d'hydrogènes faibles à soustraire. Ces antioxydants jouent le rôle d'évacuateurs de radicaux. Dès lors qu'ils fonctionnent au stade de la propagation, leur action est essentiellement palliative. On notera bien que les antioxydants primaires sont consommés au cours de la transformation. Les phénols, dont l'activité stérique est réduite, et les amines aromatiques secondaires constituent les deux classes chimiques les plus importantes dans cette catégorie. La **figure 2.13** montre une stabilisation d'un radical hydroperoxyde ( $\text{ROO}^\bullet$ ) par un phénol qui est l'hydroxytyrosol [14].



**Figure 2.13:** Stabilisation de radicaux par l'hydroxytyrosol [14].

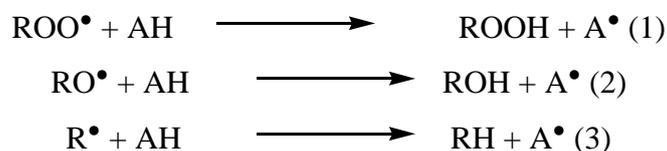
### 2.5.2. Antioxydants secondaires

Ils fonctionnent au moyen de la décomposition des hydroperoxydes en produits inertes, et évitent ainsi ou ralentissent le taux d'initiation de la chaîne. Pour cette raison, on fait parfois référence aux antioxydants secondaires sous le nom d'antioxydants préventifs. Les antioxydants secondaires sont presque toujours utilisés en conjonction avec les antioxydants primaires, ils sont connus également sous le nom d'agents synergiques. Les phosphites et les thioesters constituent les deux types chimiques les plus importants au sein de cette catégorie [14].

## 2.6. Différents types d'antioxydants

### 2.6.1. Antioxydants de type I

Il s'agit de substances capables d'interrompre la chaîne radicalaire en cédant un radical d'hydrogène ( $H^\bullet$ ) à un radical libre lipidique présent.



AH : antioxydant et  $A^\bullet$  : radical de l'antioxydant.

Les radicaux  $A^\bullet$  qui se forment sont relativement stables et ne possèdent pas d'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux lipides. Ils subissent une réaction d'arrêt aboutissant à la formation de produits non radicalaires [39].

### 2.6.2. Antioxydants de type II

Les antioxydants de cette catégorie sont les composés qui agissent en empêchant ou en diminuant la formation de radicaux libres. Les plus utilisés sont des agents complexant les ions métalliques réduisant l'effet prooxydant des ions, c'est le cas des acides phosphorique, citrique et les ascorbates. Ils agissent en stabilisant la forme bivalente du métal dont l'action catalysante est plus faible que celle de la forme trivalent [40].

### 2.6.3. Antioxydants de type III

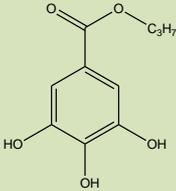
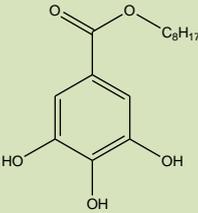
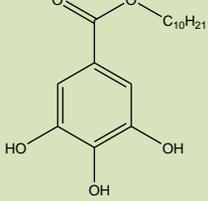
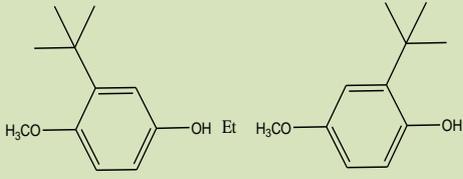
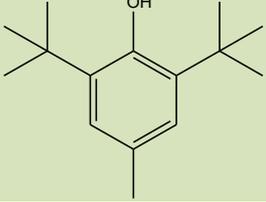
Ils regroupent les facteurs de l'environnement qui ont une action antioxydante, en agissant sur le potentiel redox du milieu, la température, la pression en oxygène, la lumière. L'emballage des produits permet ainsi de minimiser l'exposition à l'air et à la lumière. La mise sous vide permet de limiter les réactions de l'oxydation et de prolonger la durée de vie des produits. L'emballage peut également être réalisé sous atmosphère modifiée ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ) [40].

### 2.6.4. Antioxydants synthétiques

L'anhydride sulfureux (ou dioxyde de soufre  $SO_2$ ) et ses combinaisons minérales ont été utilisés comme premiers antioxydants des vins et des bières, mais ces composés possèdent un caractère fortement allergisant [41]. On trouve aussi d'autres composés synthétiques et parmi les : les antioxydants phénoliques qui sont autorisés dans certains aliments: le BHT 321 (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), BHA 320 (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), sont l'un et l'autre soluble dans les lipides et résistent bien à la chaleur. Ils ont une action synergique, ils présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évapore rapidement. Le TBHQ

(tertiobutyl-hydroxyquinone) est moins soluble dans les graisses et le PG (gallate de propyle) à l'avantage d'être relativement soluble dans l'eau, mais l'inconvénient d'être peu soluble dans les lipides, peu résistant à la chaleur et de donner avec le fer des sels de couleur foncée. Le nitrite présente des propriétés antioxydantes. Il peut aussi former des nitrosamines cancérigènes. Les chélateurs de métaux utilisés et plus efficaces sont les polyphosphates et les dérivés d'acide citrique [42, 40,12]. Les formules antioxydantes synthétiques sont répertoriées dans le **tableau 2.6**.

**Tableau 2.6** : Structures de quelques antioxydants synthétiques [12].

| Nom   | Structure  |
|---|--|
| <b>Gallate de propyle (E310)</b>                    |    |
| <b>Gallate d'octyle (E311)</b>                      |   |
| <b>Gallate de dodécyle (E312)</b>                   |  |
| <b>Butylhydroxyanisole ou BHA (E320) 2 isomères</b> |  |
| <b>Butylhydroxytoluène ou BHT (E321)</b>            |  |

L'utilisation du BHA et du BHT est actuellement remise en question en raison des risques toxicologiques de ces deux composés.

## **2.7. Efficacité des antioxydants**

Les antioxydants les plus efficaces sont ceux qui ont les énergies de liaison les plus faibles au niveau du groupe donneur d'hydrogène. L'efficacité des antioxydants phénoliques est due en particulier à la stabilisation des radicaux phénoxyliques par la délocalisation des électrons autour du cycle aromatique. L'efficacité d'un composé phénolique dépend également du nombre de fonction OH à hydrogène labile [43,14].

### **2.7.1. Evaluation de la capacité antioxydante par des tests *in vitro***

Il existe une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Plusieurs méthodes s'intéressent à l'analyse des étapes distinctes du processus d'oxydation comme par exemple la mesure : a) affaiblissement du substrat, et /ou la consommation de l'oxygène au cours de l'oxydation ; b) la formation des produits d'oxydation ; c) la capacité à piéger les radicaux libres en différentes phases. Dans un premier temps, nous allons les lister avant de comparer les tests qui sont les moins utilisés puis ceux les plus couramment utilisés [40].

Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant d'un produit ont été rassemblées selon leurs principes.

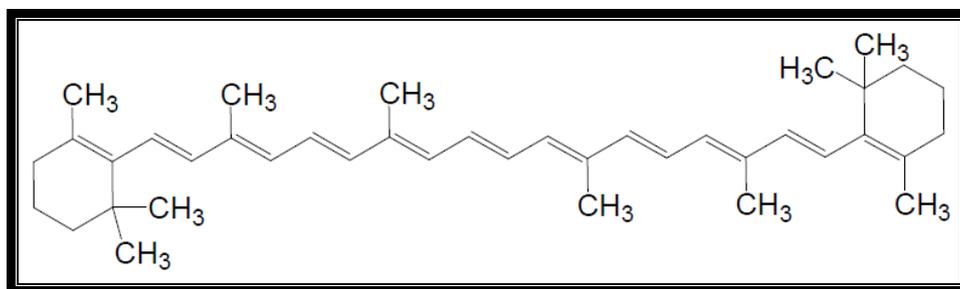
### **2.7.2. Tests les moins fréquemment cités dans la littérature**

#### **2.7.2.1. Test Rancimat**

Ce test consiste à mesurer la dégradation d'un corps gras face à une autooxydation accélérée, dans un appareil automatisé qui chauffe les solutions à 100°C avec un apport d'air constant de 20 L.h<sup>-1</sup>. Cet appareil détecte les composés volatils libérés qui indiquent indirectement le degré d'oxydation du corps gras. Un temps de latence (d'induction ou d'inhibition) pendant lequel le corps gras n'est pas altéré est évalué. A titre d'exemple, les huiles d'olive non raffinées sont testées sans addition de phénols pour comparer leurs résistances face à la dégradation thermique. D'autre part, des antioxydants peuvent aussi être ajoutés. Les corps gras typiquement testés sont les huiles végétales (olive plus ou moins raffinée, tournesol) voire les graisses animales [44,12].

#### **2.7.2.2. $\beta$ -carotène comme indicateur d'oxydation**

Le  $\beta$ -carotène est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation ; l'ajout d'un deuxième antioxydant va permettre sa préservation. L'absorbance du  $\beta$ -carotène est mesurée à 470 nm avec et sans antioxydant (**Figure 2.14**) [6].



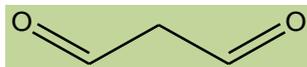
**Figure 2.14:** Structure du  $\beta$ -carotène [6].

### 2.7.2.3. Test de crocine

Les crocines sont des caroténoïdes localisées dans les stigmates du *Crocus salivus* (safran) solubles dans l'eau. Le dosage de la crocine est basé sur l'oxydation d'une solution de crocine par entraînement de la perte de couleur par la présence d'un radical libre comme ABAP (azodiisobutyramidine dichlorohydrate). Le suivi de la décoloration de la crocine se fait par les mesures de l'absorbance à 450 nm [45,12].

### 2.7.2.4. Dosage des TBARS

Ce test dose les TBARS, "thiobarbituric acid reactive substances". Il permet de quantifier la peroxydation lipidique, dans le plasma, dans les aliments, en mesurant la libération du malondialdéhyde, MDA (**figure 2.15**), un des produits majeurs de dégradation des lipides [46,12].

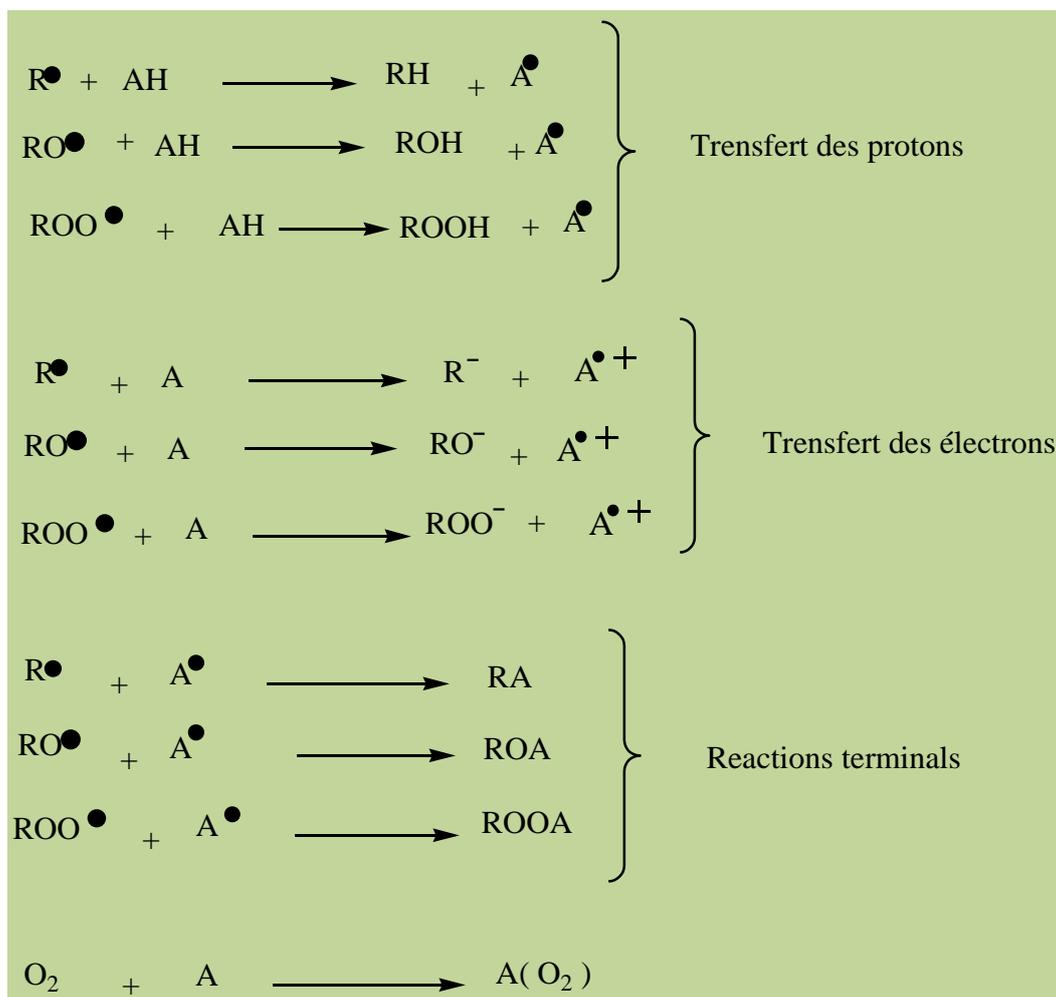


**Figure 2.15 :** Structure du malondialdéhyde MDA [46,12].

### 2.7.3. Tests les plus utilisés

L'activité antioxydante est considérée comme la capacité à piéger les radicaux libres, par l'apport d'un atome hydrogène ou d'un électron et la stabilisation des espèces formées. Une molécule antioxydante est une espèce chimique réductrice à bas potentiel d'oxydation,

comportant des éléments tels que des hydrogènes phénoliques, des cycles aromatiques et des liaisons multiples. Les équations des antioxydants (A) sont données ci-dessus [16]:



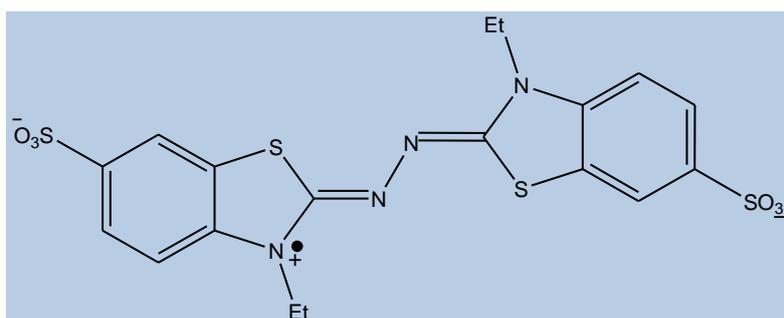
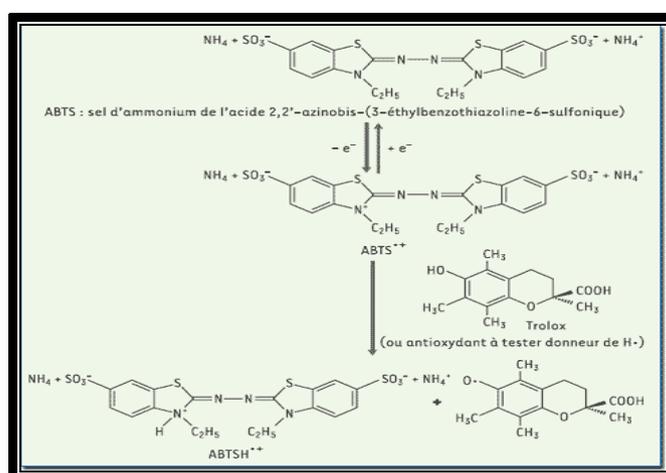
Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : par transfert d'électron singulet ou par transfert d'atome d'hydrogène. Les méthodes ABTS<sup>•+</sup> Decolorization Assay (ou TEAC) et DPPH jouent sur le transfert l'électron singulet, alors que la méthode ORAC joue sur le transfert d'un atome d'hydrogène.

Les méthodes ABTS et DPPH sont couramment utilisés pour analyser les extraits de plantes et de fruits. La méthode ORAC est plus récente et est applicable sur quasiment toutes les matrices (extraits végétaux, aliments, plasma sanguin, ...)

### 2.7.3.1. Test de réduction du radical-cation ABTS<sup>•+</sup> ou TEAC

Cette méthode a été décrite pour la première fois par MILLER & RICE-EVANS(1993) [47] puis améliorée en 1999. Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation ABTS<sup>•+</sup>, acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) qui présente

une bande d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm (**Figure 2.16**). Le radical est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le dioxyde de manganèse (MnO<sub>2</sub>) [47], la metmyoglobine [48], le peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [49] ou le persulfate de potassium [50]. Le composé à tester est ajouté au radical pré-formé et, 1 minute après, l'absorbance résiduelle du radical ABTS<sup>•+</sup> est mesurée à 734 nm. L'activité des composés est alors exprimée par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1 mM du composé testé. Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace [51]. La littérature fournit TEAC de certains antioxydants, respectivement pour la vitamine C et le β- carotène : 0,99 mM et 1,9 mM [52,12].

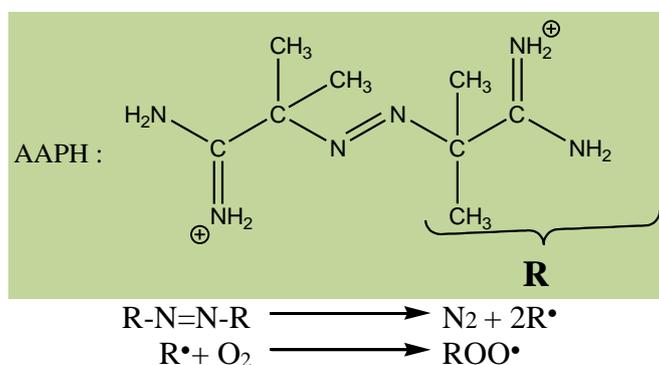


**Figure 2.16:** Formation et piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> par un antioxydant donneur de H<sup>•</sup> et la structure du radical-cation ABTS<sup>•+</sup> [51, 52,12].

### 2.7.3.2. Test de capture des radicaux peroxydes : TRAP et ORAC

Dans des modèles d'oxydation comme la peroxydation lipidique la génération de radicaux libres à taux constant est idéale. Le 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochlorure (AAPH) (**Figure 2.17**) est un générateur hydrophile de radicaux libres, tandis que le 2,2'-

azobis-(2,4-methylvaleronitrile) (AMVN) est lipophile. Ils ont l'avantage de se décomposer à vitesse constante en fonction de la température appliquée. A l'air, les radicaux  $R^\bullet$  se combinent très rapidement avec  $O_2$  pour former les radicaux peroxyles  $ROO^\bullet$  [52].



**Figure 2.17:** Génération de radicaux peroxyles à partir de l'AAPH [52].

L'AMVN n'étant plus disponible commercialement, seul l'AAPH est utilisé dans les tests qui suivent : **ORAC** et **TRAP**.

Dans le test **TRAP** (total radical trapping antioxidative potential), l'AAPH est solubilisé en milieu aqueux avec l'antioxydant et un indicateur qui devient luminescent lorsqu'il est oxydé à 37°C, comme le luminol, la R-phycoérythrine et la dichlorofluorescéine. Les radicaux peroxyles issus de l'APPH oxydent l'indicateur donnant des radicaux qui émettent de la fluorescence. La capacité des antioxydants à empêcher l'oxydation de l'indicateur est comparée à celle du Trolox donnant une valeur TRAP. Ce test est souvent utilisé pour déterminer la capacité antioxydante du plasma et du sérum sanguin [53].

La particularité de ce test **ORAC** (*oxygen radical absorbance capacity*) est de mesurer séparément à partir d'une même solution biologique la capacité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles qui la composent. Les deux types d'antioxydants de l'échantillon aqueux sont séparés par une extraction à l'hexane. Puis les antioxydants hydrophiles et lipophiles sont analysés en utilisant le même générateur de radicaux peroxyles l'AAPH à 37°C. Les composés sont évalués pour leur capacité à empêcher l'oxydation de la fluorescéine par les radicaux peroxyles pendant 30 min. La lecture de la fluorescence de la solution est faite toutes les minutes et permet d'obtenir une cinétique de dégradation de la fluorescéine en fonction du temps qui sera stoppée (temps de latence) ou juste ralentie par les antioxydants

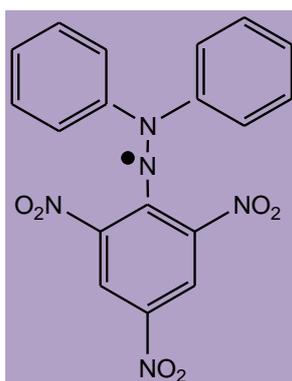
présents. Ce test est applicable aux solutions biologiques comme le plasma sanguin et aux extraits de fruits et légumes [54].

### 2.7.3.3. Test FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*):

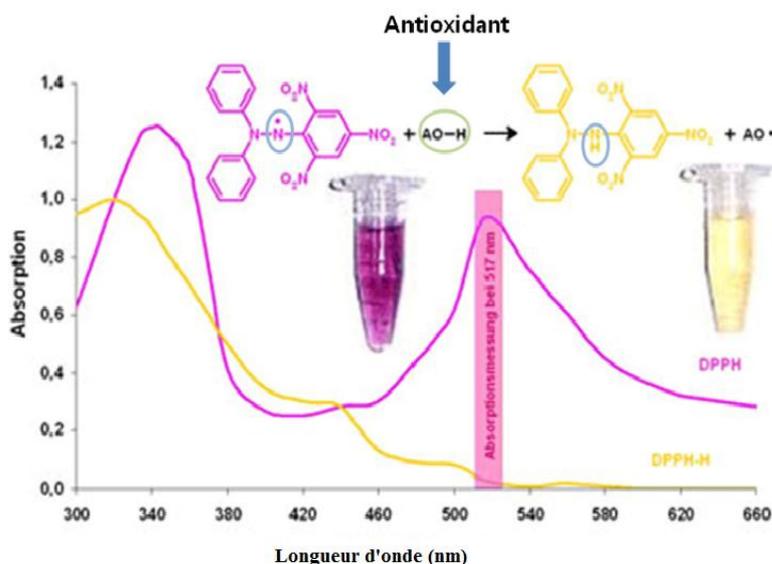
Le pouvoir antioxydant d'une solution comme le plasma est déterminé par le test **FRAP** ou Ferric reducing ability of plasma. A faible pH et à 37°C, le complexe tripyridyltriazine ferrique (**TPTZ-Fe<sup>3+</sup>**) est ajouté à l'échantillon. Les antioxydants présents réduisent le complexe en sa forme **Fe<sup>2+</sup>** et son absorbance est lue à 700 nm toutes les 15 s durant une période de mesure. Ce test est rapide et donne des résultats reproductibles pour des solutions biologiques ainsi que pour des solutions pures d'antioxydants où la réaction est indépendante de la concentration car la réponse est linéaire [54, 55].

### 2.7.3.4. Test de réduction du radical stable, DPPH<sup>•</sup> (2, 2-Diphényl-1- picrylhydrazyle)

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) est stable, coloré et centré sur l'azote (**figure 2.18**) [56,52].

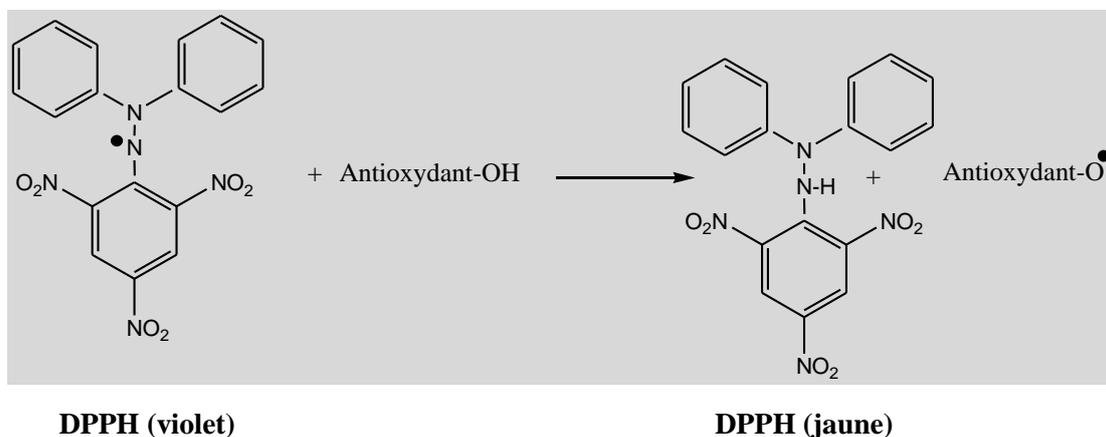
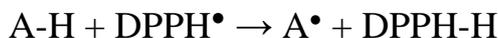


**Figure 2.18** : Structure du radical stable DPPH<sup>•</sup> [56].



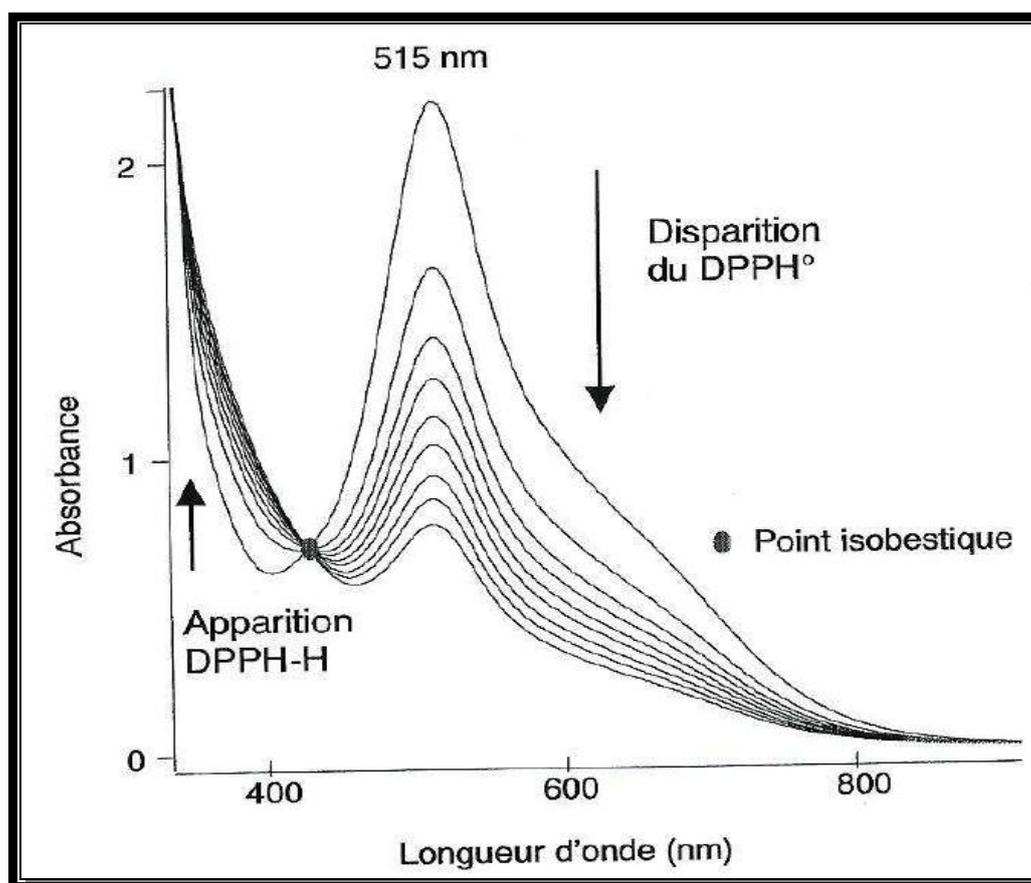
**Figure 2.19** : Spectre d'absorption du radical DPPH<sup>•</sup> [57].

Le maximum de son absorption se situe vers 515-517 nm dans le méthanol et l'éthanol (**Figure 2.19**) [57]. La réduction du radical libre DPPH<sup>•</sup> (violet foncé) par un donneur d'atome H (AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine jaune pale ou incolore (DPPH-H) et au radical A<sup>•</sup> [58].



**Figure 2.20** : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH<sup>•</sup> [58].

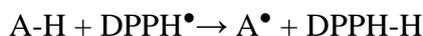
Le composé à doser est ajouté à une solution de DPPH<sup>•</sup> (méthanol ou éthanol). La solution est placée à l'obscurité entre 10 à 30 minutes. La réaction de transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le DPPH<sup>•</sup> est suivie par spectroscopie UV-visible en enregistrant la décroissance de la bande d'absorption du DPPH<sup>•</sup> à 515 nm (**figure 2.21**) [52].



**Figure 2.21:** Evolution du spectre du DPPH• lors de sa réduction par l'acide dihydrocaféique [12].

Le rapport DPPH•/antioxydant doit être adapté à la stœchiométrie du composé (nombre de radicaux réduits par molécule d'antioxydant) et le DPPH• doit être en excès. Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser ; il permet de comparer un grand nombre de composés. De plus, les conditions utilisées (solvants organiques, faible température) évitent l'auto-oxydation des molécules testées. Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH• (où A est l'absorbance pour une concentration en antioxydant donnée et un temps donné). L'EC50 (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH•) calculée pour chaque antioxydant permet de les classer entre eux. Plus l'EC50 est petite, plus la molécule est antioxydante. De plus, le test du DPPH• permet de déterminer un paramètre cinétique, la constante de vitesse de premier transfert d'atome H et un paramètre statique, la stœchiométrie. Ces paramètres définissent l'activité antioxydante intrinsèque des molécules testées [58-61,12].

Le modèle cinétique, inspiré des travaux de **Goupy *et al.* [61]**, analyse la réaction de transfert d'hydrogène entre le DPPH• et l'antioxydant durant la phase rapide (0-300 s) ; il permet de déterminer la constante cinétique  $k_1$  de transfert de l'atome d'hydrogène le plus réactif vis-à-vis du DPPH•. L'antioxydant de stœchiométrie  $n$  est considéré comme un ensemble de  $n$  sous-unités antioxydantes fictives indépendantes (AH) qui transfèrent un seul atome d'hydrogène au DPPH• avec la même constante de vitesse biomoléculaire  $k$  [12]. La constante de vitesse globale de transfert d'hydrogène  $k_1$  de l'antioxydant vers le DPPH• est égale à  $n$  fois la constante  $k$  [61,12]. Les courbes  $A_{515} = f(t)$  peuvent être traitées selon une loi cinétique d'ordre 2 avec  $[AH] = n C$ , où  $[AH]$  et  $C$  sont les concentrations en sous-unités AH et en antioxydant. La valeur  $A_f$  correspond à l'absorbance de la solution relevée au bout de 15 min où l'on considère que la réaction est complète. La valeur de  $n$  peut ainsi être évaluée.



Le tracé de la courbe *Equation (1)*

$$\ln \left( \frac{1 - \frac{A_f}{A}}{1 - \frac{A_f}{A^0}} \right) = \frac{(C k_1) t}{1 - \frac{A^0}{A_f}} = f(t) \quad \text{Equation 1}$$

La constante  $k_1$  est déterminée à partir de cette courbe. La démonstration de cette relation est donnée en annexe 1.

Ce test permet de déterminer plusieurs paramètres permettant de comparer les antioxydants entre eux [12] :

- (Pourcentage d'inhibition, l'index IC<sub>50</sub>) : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.
- EC<sub>50</sub> ("concentration efficace") correspondant au rapport molaire  $MR = n_{\text{antiox}} / n_{\text{DPPH}}$  nécessaire pour réduire 50 % du DPPH initial.
- ARP ("pouvoir anti-radicalaire" ou "Puissance anti radicalaire") égal à  $1/EC_{50}$  ou égal à  $1/IC_{50}$ . Plus l'ARP n'est grand et plus le composé est antioxydant.
- SV ("valeur stœchiométrique") égale à  $2 \times EC_{50}$ , soit le rapport molaire MR nécessaire pour réduire 100 % du DPPH initial.

- NRD "nombre de DPPH• réduit". Il s'agit du nombre de moles de DPPH réduites par une mole d'antioxydant. Ce paramètre est en réalité déduit de la valeur de l'EC<sub>50</sub> de l'antioxydant, donné dans l'équation 2 suivante :

$$\text{NRD} = \frac{1}{2 \text{EC}_{50}} = \frac{1}{\text{SV}} \quad (\text{Equation 2})$$

- TEC50 introduit par **Sanchez-Moreno et al.** [62] ; il s'agit du temps mis par l'antioxydant au rapport molaire MR = EC<sub>50</sub> pour atteindre le plateau A<sub>515</sub> ~ constante.

- ARE (efficacité antiradicalaire) Les deux facteurs IC<sub>50</sub> ou EC<sub>50</sub> et TE50 peuvent être combinés afin d'obtenir le paramètre d'efficacité anti-radicalaire (Equation 3).

$$\begin{aligned} \text{ARE} = \text{ARP}/\text{TEC50} \quad \text{et} \quad \text{ARP} = 1/\text{EC}_{50} &\implies \text{ARE} = \frac{1}{\text{EC}_{50} \times \text{TEC50}} \\ \text{ARE} = \text{ARP}/\text{TEC50} \quad \text{et} \quad \text{ARP} = 1/\text{IC}_{50} &\implies \text{ARE} = \frac{1}{\text{IC}_{50} \times \text{TEC50}} \end{aligned} \quad (\text{Equation 3})$$

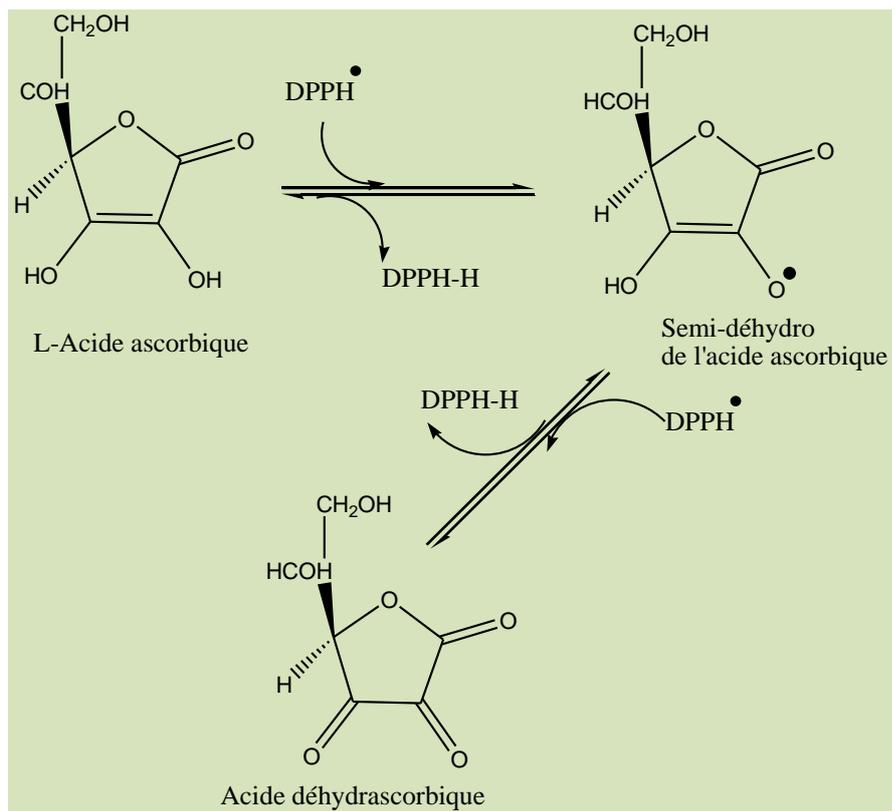
Unité de ARE est (g mg<sup>-1</sup> mn<sup>-1</sup>) ou (ml µg<sup>-1</sup> mn<sup>-1</sup>).

- k<sub>1</sub>, constante de vitesse de premier transfert d'atome H [61].

Brand-Williams *et al.* [57, 59] ont suggéré que les propriétés antioxydantes du BHT étaient dues à différents paramètres avec une contribution primordiale des radicaux benzyliques (**Figure 2.23**).

Cependant, ce test peut poser des difficultés d'interprétation lorsque les composés testés possèdent une bande d'absorption dans le visible vers 515 nm, interférant avec celle du DPPH• [63]. Le test avec l'ABTS+• est alors recommandé car on peut interpréter les résultats sur la bande à 734 ou 815 nm, n'interférant plus avec celle du composé testé, tandis que le DPPH• ne possède pas d'autres bandes d'absorption à plus grande longueur d'onde.

De plus, le DPPH• n'est soluble que dans des solvants organiques, en particulier les alcools, et non en milieu aqueux ; ce qui empêche toute analyse d'antioxydants hydrophiles [64]. Le dernier problème que pose ce radical son instabilité à la lumière. Son absorbance à 515 nm décroît sans l'intervention d'un quelconque antioxydant [65]. C'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH• doivent impérativement se faire dans l'obscurité [12].



**Figure 2.22:** Mécanisme proposé pour la réaction de l'acide ascorbique et le DPPH• [57].

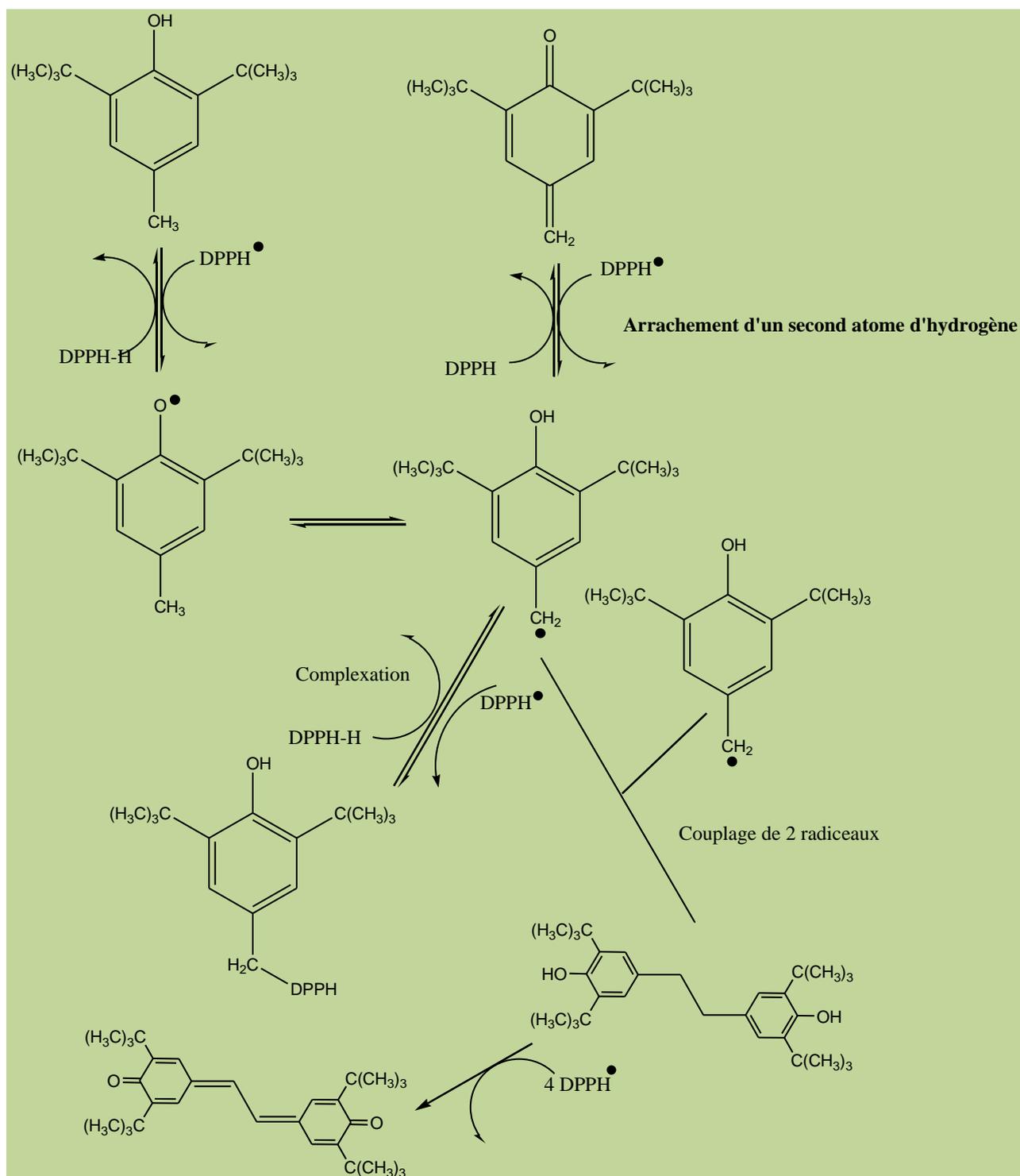
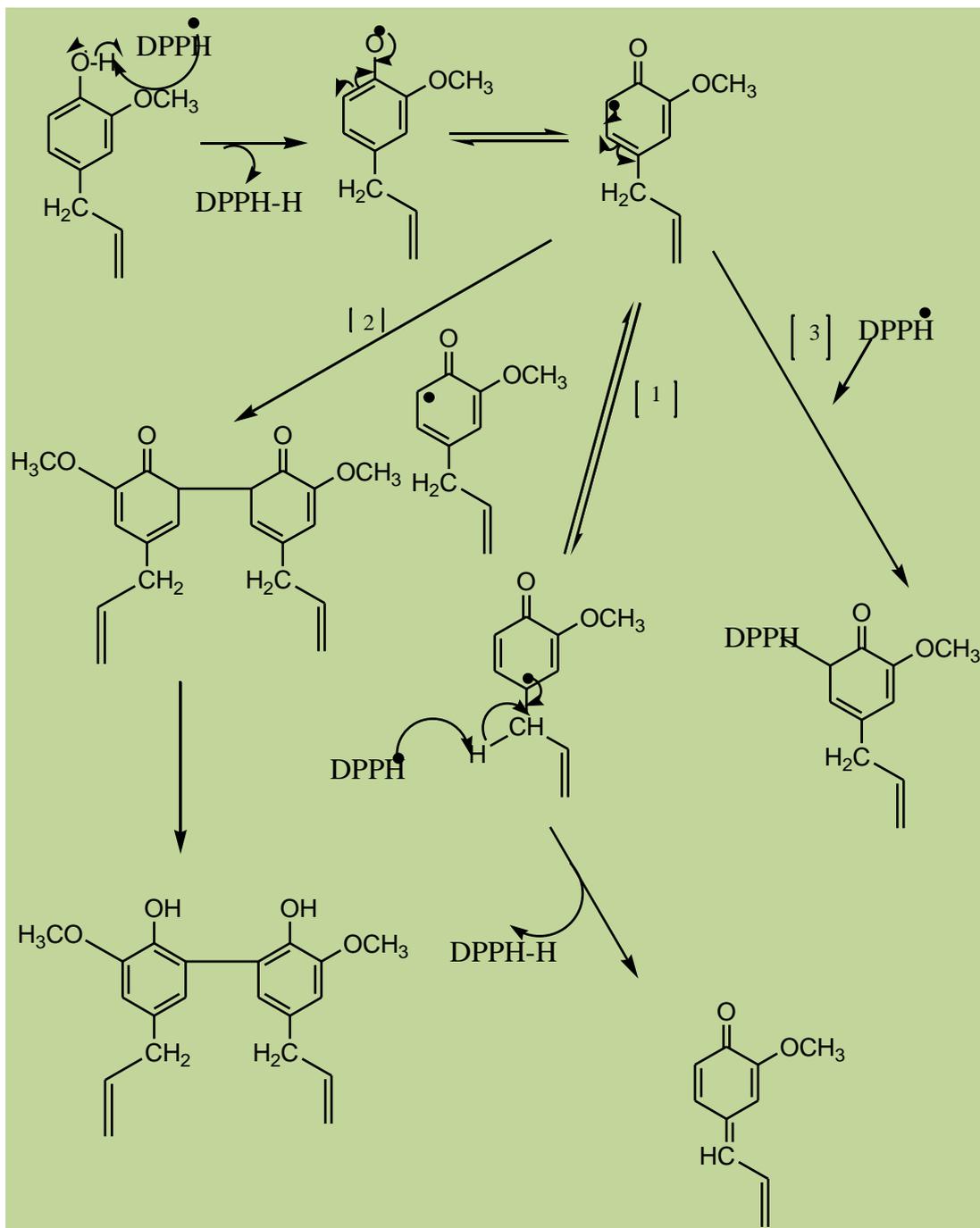


Figure 2.23 : Mécanisme proposé pour la réaction entre le BHT et le DPPH• [59].



**Figure 2.24 :** Mécanisme proposé pour la réaction entre l'eugénol et le DPPH. Réaction [1] : donation de seconde hydrogène ; Réaction [2] : dimerisation ; Réaction [3] : complexation [57,59].

#### 2.7.4. Comparaison des tests les plus utilisés

Le choix du test pour la mesure de l'activité antioxydante doit se faire en fonction du Composé à tester, des conditions opératoires supportables ou non par ce composé, des équipements du laboratoire. Une comparaison entre ces tests est résumée dans le **tableau 2.7**. Pour notre part, la méthode du radical DPPH• s'est avérée bien adaptée à l'eugénol, ses dérivés et les huiles essentielles [12].

**Tableau 2.7:** Protocoles utilisés pour la mesure de l'activité antioxydante [12].

| Test   | Solvant Conditions                       | Conditions  | Mesure Quantification   | Antioxydants testés                        | Références            |
|--------|--|---|---|--|-----------------------|
| ABTS+• | Milieu tampon phosphate, pH = 7,4        | Initiateur : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ou metmyoglobine | Décroissance de ABTS+• à 734 nm Référence : Trolox                  | Nombreux Extraits de plantes, jus, vins... | [66-70]               |
| TRAP   | Milieu tampon phosphate, plasma pH = 7,4 | 37°C et indicateur luminescent                              | Consommation en oxygène Référence : Trolox                          | Vitamine E, ascorbate, -SH                 | [71]                  |
| ORAC   | Tampon pH = 7,0                          | 37°C et indicateur fluorescent                              | Décroissance de la fluorescence de l'indicateur Référence : Trolox  | Nombreux extraits variés                   | [71-75]               |
| FRAP   | Milieu aqueux                            | 4-8 min   | Variation de l'absorbance à 593 nm, pour le Fe <sup>3+</sup> réduit | Jus de fruits                              | [76-77]               |
| DPPH•  | Méthanol                                 | Obscurité   | Décroissance du DPPH• à 515 nm EC50 ; 1/EC50 ; T(EC50)              | Phénols, vins, diverses molécules.         | [56-57] [62] et [78]. |

#### 2.7.5. Effet des antioxydants sur la santé humaine

Lors de la photosynthèse, les plantes fabriquent des substances antioxydantes pour se protéger des effets délétères des radiations solaires. Par conséquent, des vitamines (C, E, caroténoïdes) et des enzymes (catalases, peroxydases) sont synthétisés. De plus, Ces plantes élaborent des flavonoïdes qui préviennent l'oxydation. Ces substances jouent deux rôles au niveau de la plante : celui d'un filtre solaire et celui d'un antioxydant vis à vis des radicaux libres produits par les radiations. Tous ces antioxydants sont directement assimilables par

notre organisme quand on consomme des végétaux ou des produits dérivés de ceux ci. Il existe une forte corrélation entre la consommation de légumes et de fruits et une moindre incidence des maladies cardio-vasculaires et les cancers. Les antioxydants végétaux ont des propriétés protectrices en matière de vaisseaux sanguins, leurs vertus antiviellissement et leurs implications probables dans la prévention des pathologies liées au stress oxydatif. Les potentiels antioxydants, comparés à celui de la vitamine E, les plus élevés pour les fruits et les légumes sont respectivement ceux de la fraise (15,36) et l'ail (19,4) [79, 80,14].

#### **2.7.6. Conclusion**

Nous avons vérifié diverses méthodes de mesure de la capacité antioxydante de molécules synthétisées et d'extraits d'origine naturelle, réalisables à l'échelle du laboratoire ou à l'échelle industrielle. Il n'existe pas de méthode de référence, mais de nombreuses méthodes qu'il faut sélectionner et standardiser selon le problème posé.

D'autres méthodes existent mais sont généralement adaptées à l'analyse de fluides biologiques et n'ont pas été décrites dans ce travail.

Les facteurs à considérer dans le choix des méthodes sont : (1) les mécanismes impliqués dans la réaction de la mesure de l'activité antioxydante, en relation avec ceux de l'activité antioxydante de l'échantillon lui-même ; (2) la solubilité des réactifs et des extraits dans le solvant d'analyse; et (3) l'existence de données consultables et suffisamment exhaustives, afin de vérifier les valeurs à celles décrites dans la littérature.

## 2.8. Résultats et discussion

### 2.8.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans cette partie, deux méthodes d'évaluation antioxydante ont été utilisées. Un test qualitatif *via* l'utilisation de la technique HPTLC, et un test quantitatif par quantification spectrophotométrique (méthode au DPPH•).

### 2.8.2. Méthode chromatographique CCM (test au DPPH•)

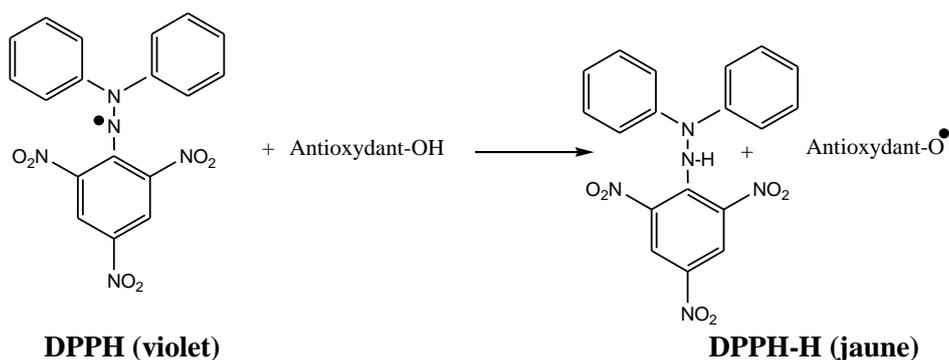
Dans le but de confirmer le pouvoir antioxydant des composés suivants : 6-bromoéugénol, eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle de clou de girofle (sec), nous avons effectué un test antioxydant par HPTLC bio-autographique.

La pulvérisation des plaques CCM par la solution méthanolique de DPPH• (0.004 %) permet de visualiser des taches jaunes et des taches pourpres dans les plaques pulvérisées par une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% (**Figure 2.25**).



**Figure 2.25:** Plaques CCM des composés suivants. A : eugénol et 6-bromoéugénol. B : eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle du clou de girofle (sec) pulvérisées par DPPH• (0.004 %) et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 %), (Toluène/ MeOH) (95/05).

Les tests de l'activité antioxydante des composés suivants : 6-bromoéugénol, eugénol, et l'huile essentielle de clou de girofle(sec) avec la technique du HPTLC ont démontré la présence d'un pouvoir antioxydant qui a été révélé par l'apparition de tâches jaunes sur la plaque CCM pulvérisées avec le DPPH•, et des taches pourpres dans les plaques pulvériser par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %, ce qui signifie qu'il a eu un piégeage des radicaux libres DPPH• selon la réaction suivante et l'absence du pouvoir antioxydant avec l'extrait d'acétate d'eugényle.



**Figure 2.26** : Réaction de piégeage des radicaux libres par DPPH•.

### 2.8.3. Test antioxydant par quantification spectrophotométrique DPPH•

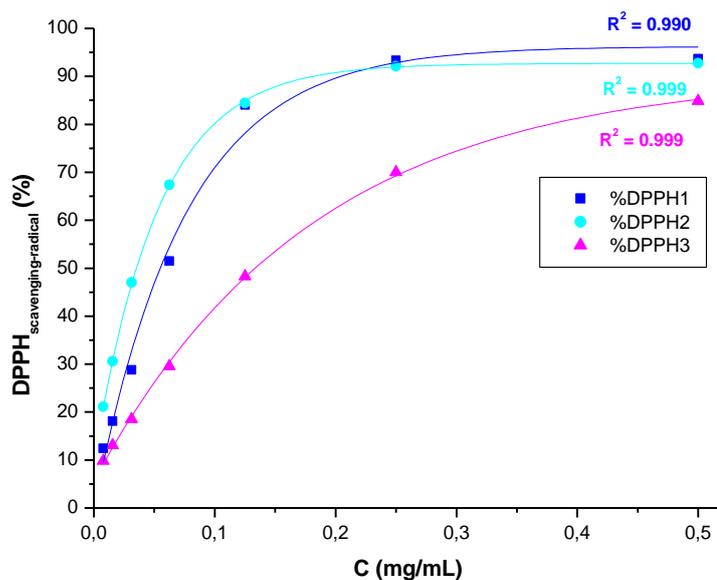
Après la confirmation du pouvoir antioxydant de nos extraits *via* la technique bioautographique HPTLC, et dans le but d'approfondir notre étude sur cette activité, une évaluation par quantification spectrophotométrique a été effectuée sur les quatre produits : 6-bromoéugénol, eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle de clou de girofle (sec) avec l'utilisation de l'acide ascorbique comme étant contrôle positif. Cette méthode est basée sur la mesure de l'absorbance à différentes concentrations de l'extrait. Ensuite le pourcentage d'inhibition a été calculé pour chaque concentration (0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 ; 0,0312 ; 0,0156 et 0,0078 mg/mL).

Par la suite, les courbes (% I) ou % DPPH<sub>piégeage des radicaux libres</sub> = f(C) ont été tracées, et la IC<sub>50</sub> calculée pour chaque extrait et comparée à celle de l'acide ascorbique.

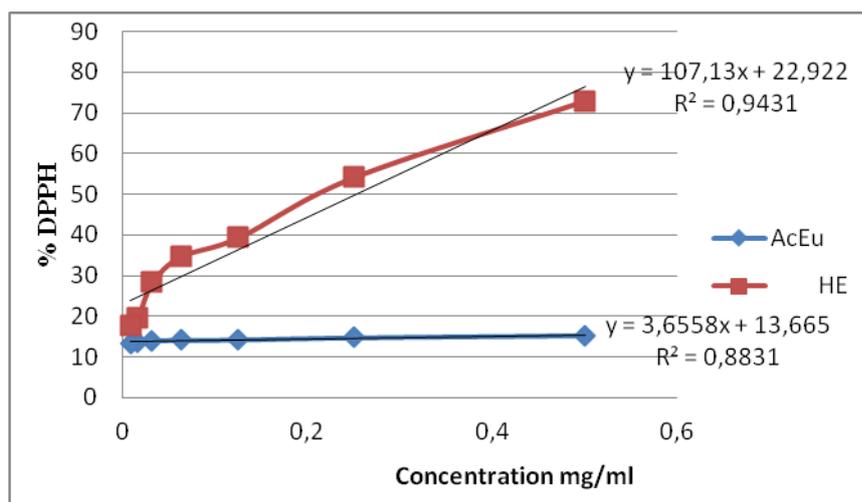
L'activité antioxydante des différents produits : 6-bromoéugénol, eugénol, acétate eugényle et l'huile essentielle extraite du clou de girofle (sec) *vis-à-vis* du radical DPPH•, s'accompagne par la déviation de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm.

### 2.8.4. Détermination du pourcentage d'inhibition

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH• (2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyle) sont enregistrés dans la **figure 2.27**.



a)



b)

**Figure 2.27** : Variation du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentration pour : a) % DPPH1: acide ascorbique, % DPPH2: 6-bromoéugénol et % DPPH3: eugénol. b) AcEu : acétate d'eugényle, HE : huile essentielle du clou de girofle (sec).

Nous observons que le profil de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration est une courbe logarithmique du type :  $y = a \cdot \text{Exp}(-x/c) + b$ , avec une bonne corrélation des valeurs obtenues du coefficient de corrélation  $R^2$  : ( $R^2=0.999$ ) pour l'eugénol,

( $R^2=0.999$ ) pour le 6-bromoéugénol et ( $R^2=0.990$ ) pour l'acide ascorbique. Par ailleurs, nous remarquons que le profil de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration est une droite linéaire du type ( $y=a x + b$ ) avec une bonne corrélation des valeurs obtenues du coefficient de corrélation  $R^2$  : ( $R^2=0.943$ ) pour l'huile essentielle du clou de girofle (sec) et ( $R^2=0.881$ ) pour l'acétate d'eugényle.

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la vitamine C ou pour le 6-bromoéugénol, l'eugénol, l'acétate d'eugényle et l'huile essentielle du clou de girofle (sec). On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'eugénol et l'acétate d'eugényle et l'huile essentielle du clou de girofle (sec) est inférieur à celui de la vitamine C pour toutes les concentrations utilisées. Par contre on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour le 6-bromoéugénol est supérieur à celui de la vitamine C pour toutes les concentrations utilisées.

### 2.8.5. Détermination d'IC50

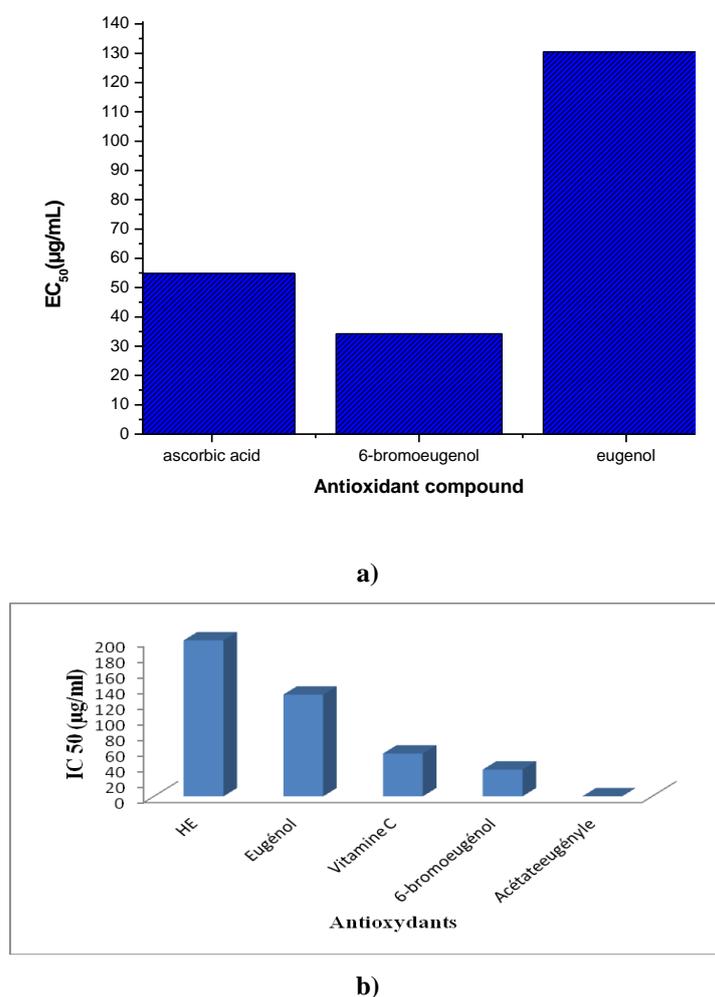
IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

L'analyse des graphes montre également une augmentation proportionnelle entre le pourcentage d'inhibition et la concentration. Ces résultats encourageants, révèlent que le 6-bromoéugénol transforme le radical libre stable 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) au diphenylpicrylhydrazine (coloré en jaune) avec un IC50 de 34.270 $\mu$ g/mL montrant ainsi une activité antioxydant supérieure à celle de la vitamine C (acide ascorbique) d'un IC50 de 54.888  $\mu$ g/mL. Par contre l'eugénol avec un IC50 de 130.485 $\mu$ g/mL et l'huile essentielle du clou de girofle (sec) avec un IC50 de 200.0 $\mu$ g/mL montre une activité antioxydant inférieure à celle de la vitamine C (acide ascorbique) (**Figure 2.27**). Par contre celle de l'acétate d'eugényle est nulle.

Les courbes illustrées dans la **Figure 2.27**, nous montrent que tous les extraits testés sont capables de neutraliser le radical DPPH<sup>•</sup> au cours du temps et en fonction de la concentration des antioxydants, ceci se traduit par la diminution de la concentration initiale de ce radical en comparaison avec le contrôle (acide ascorbique).Sauf que la capacité d'acétate

eugényle pour neutraliser le radical DPPH• au cours du temps et en fonction de la concentration et très petite mais non négligeable.

A partir de ces résultats, nous montrons que le 6-bromoéugénol reste l'antioxydant le plus efficace avec un IC50 de 34.270 µg/ml par rapport à la vitamine C (acide ascorbique), l'eugénol et l'acétate d'eugénol. Donc Ces résultats confirment bien que le 6-bromoéugénol possède un pouvoir antioxydant élevé. Les valeurs d'IC50 pour le 6-bromoéugénol, l'eugénol, la vitamine C, l'huile essentielle du clou de girofle (sec) et l'acétate d'eugényle sont indiquées dans les **Figures 2.28 [80]**.

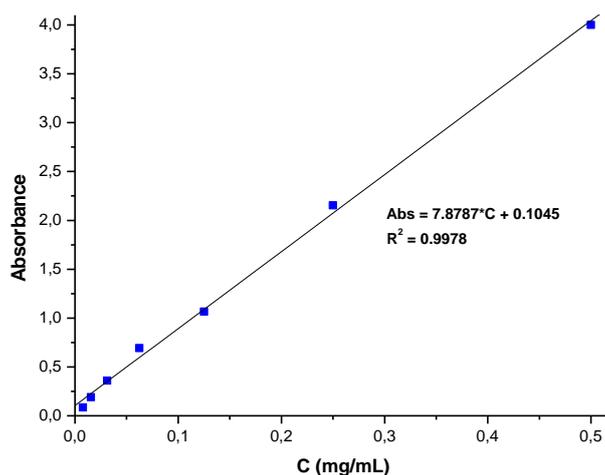


**Figure 2.28** : Histogrammes représentant les valeurs d'IC50 en fonction des antioxydants.

## 2.8.6. Suivi cinétique de la réaction de piégeage des radicaux libres DPPH•

### 2.8.6.1. Courbe d'étalonnage de la solution du DPPH•

Avant de commencer les testes de l'activité antioxydant, la stabilité et l'intervalle de linéarité des solutions de DPPH• ont été évalués et les résultats sont représentés graphiquement **Figure 2.29**. Sept solutions du DPPH• (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.0156 et 0.0078 mg/ml) à base du méthanol ont été testées et préparées à partir d'une solution mère 1 mg/ml (Dissoudre 2 mg dans 2 ml de méthanol).



**Figure 2.29** : Courbe d'étalonnage de la solution de DPPH•

La courbe d'étalonnage que nous obtenons est une droite du type  $y = ax + b$  avec un coefficient de corrélation  $R^2$  de valeur 0,996. Plus cette valeur se rapproche de 1 et plus les points sont alignés sachant qu'un bon  $R^2$  se situe entre 0,97 et 1. On observe qu'il n'y a pas de différence significative dans l'absorbance entre 0 et 60 min pour les concentrations testées et une très bonne linéarité de l'absorbance en fonction de concentration [82]. Cette courbe nous semble très utile pour déterminer le nombre de DPPH• piégés et restants pour chaque concentration.

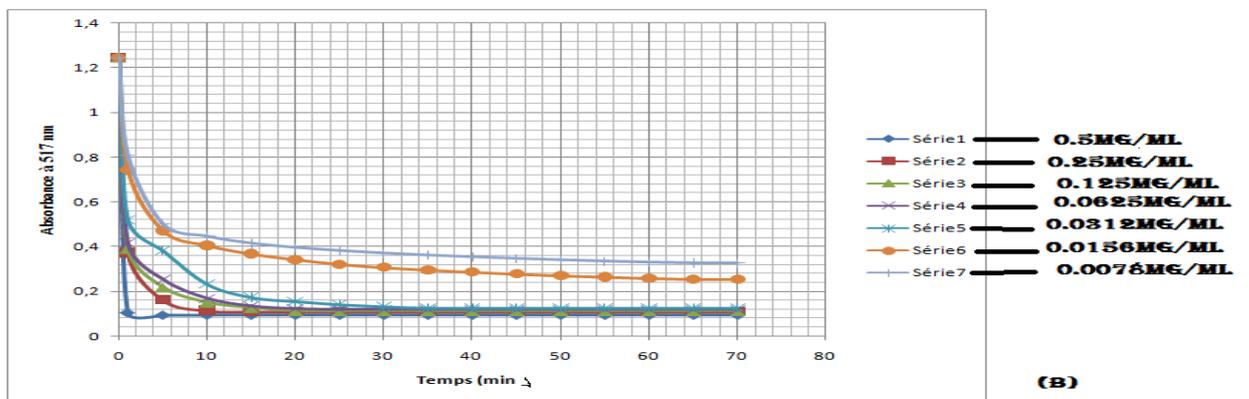
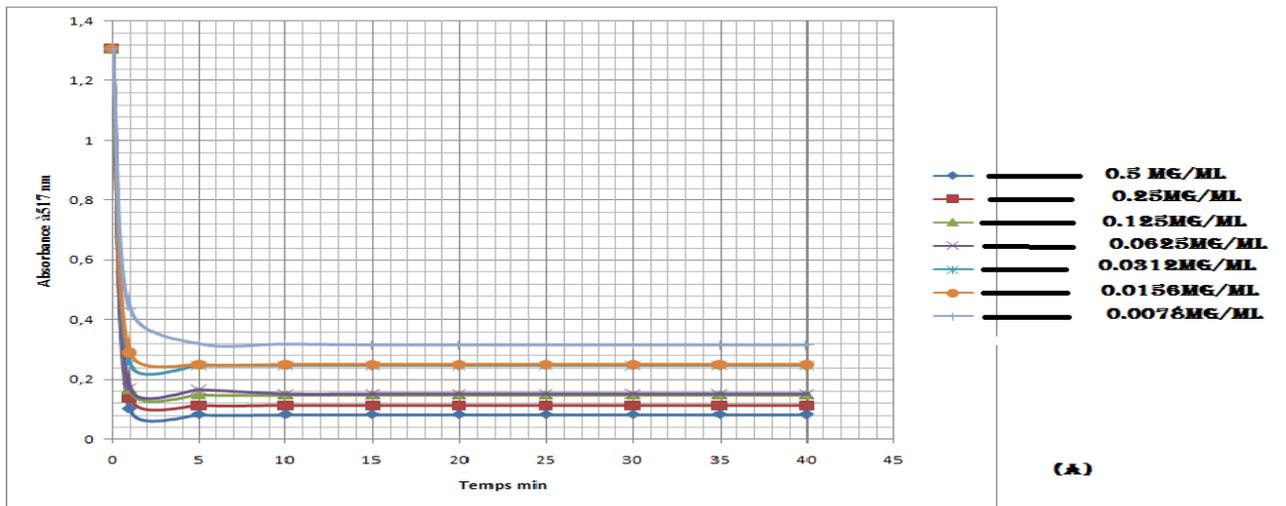
### 2.8. 6.2. Étude cinétique

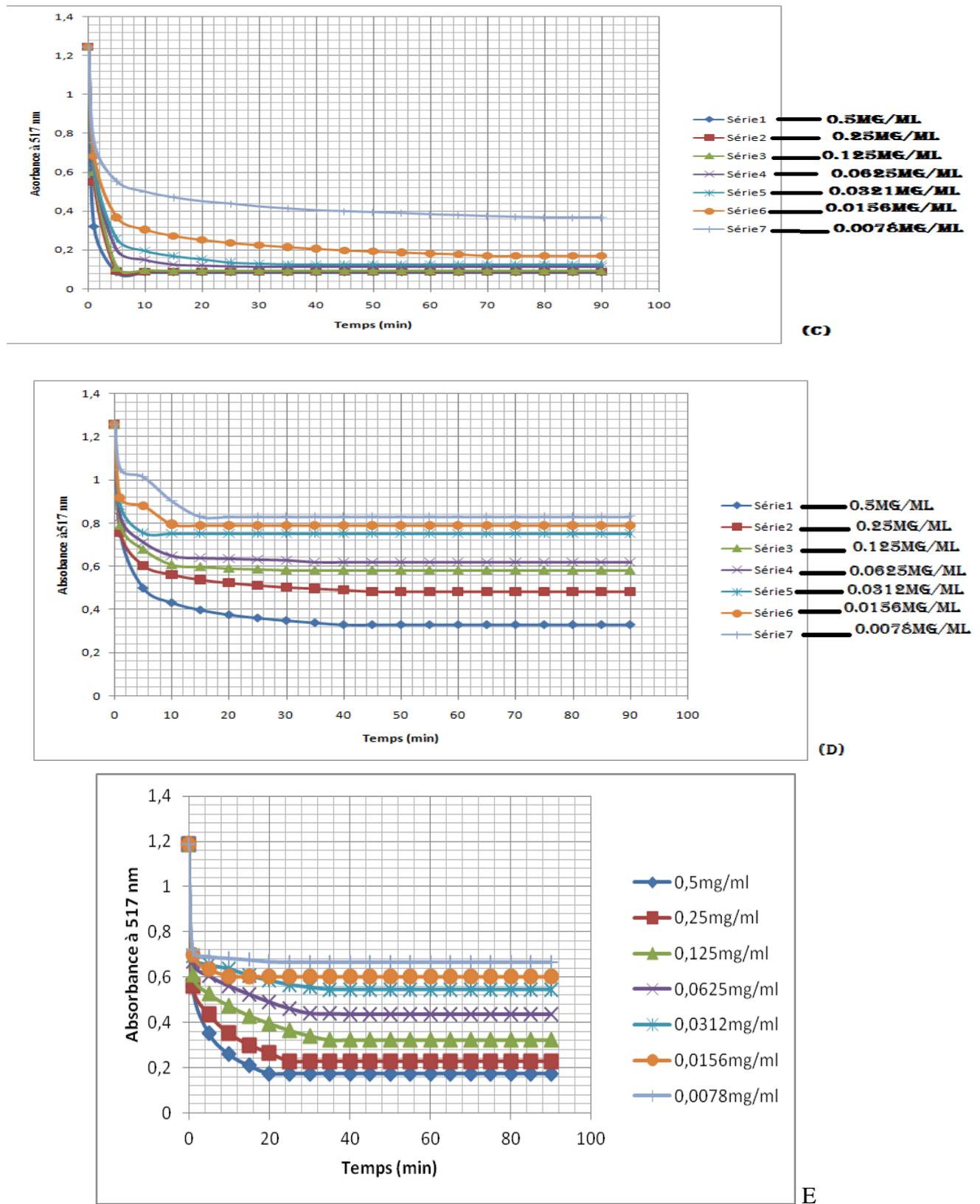
#### ► *Etude cinétique de la réaction*

La cinétique de réduction du DPPH• à différentes concentrations des différents antioxydants testés est suivie au cours du temps. Nous avons réalisé le suivi de cette réaction par mesure de l'absorbance après chaque 30 s jusqu'à l'obtention d'un plateau au temps final (Teq). La réduction des radicaux libres est évaluée par le rapport relatif de la concentration

résiduelle (DPPH•)  $t=Teq$  restant en fin de cinétique par rapport à sa concentration initiale (Equation .6).

La cinétique de réduction du radical libre DPPH• obtenue pour chaque concentration de la vitamine C, le 6-bromoéugénol, l'eugénol, l'acétate eugényle et l'huile essentielle du clou de girofle (sec) est indiquée dans les **figures 2.30**.





**Figure 2.30:** Cinétique de réduction du radical DPPH<sup>•</sup>. A : Acide ascorbique (vitamine C); B : 6-bromoéugénol; C : Eugénol et D : Acétate eugényle et E : Huile essentielle du clou de girofle (sec).

La réaction entre le radical DPPH• et l'acide ascorbique et le 6-bromoeugénol donneurs d'hydrogène atteint l'équilibre au bout d'un temps très court par rapport à l'eugénol et l'huile essentielle du clou de girofle (sec). L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques (6-bromoeugénol et l'eugénol et l'huile essentielle du clou de girofle (sec)). En présence d'un radical libre DPPH•, l'atome H est transféré sur ce dernier pour le transformer en une molécule stable DPPH. Ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de l'antioxydant donneur d'hydrogène. Par contre la réaction entre le DPPH• et l'acétate d'eugényle est lente à cause de l'acétate d'eugényle qui ne contient pas un atome d'hydrogène mobile sur le groupement hydroxyle.

La mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle du 6-bromoeugénol est augmentée par effet mésomère donneur de groupe Br en position *ortho* du dérivé 6-bromoeugénol. Par contre, l'eugénol contient un atome d'hydrogène en position *ortho* de l'eugénol qui diminue la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle.

#### ► *Activité anti-radicalaire des composés testés*

La cinétique de réduction du DPPH• à différentes concentrations en antioxydant testés est suivie au cours du temps jusqu'à l'obtention d'un plateau au temps final (Teq). La réduction des radicaux libres est évaluée par le rapport relatif de la concentration résiduelle [DPPH•]<sub>t=Teq</sub> restant en fin de cinétique par rapport à sa concentration initiale :

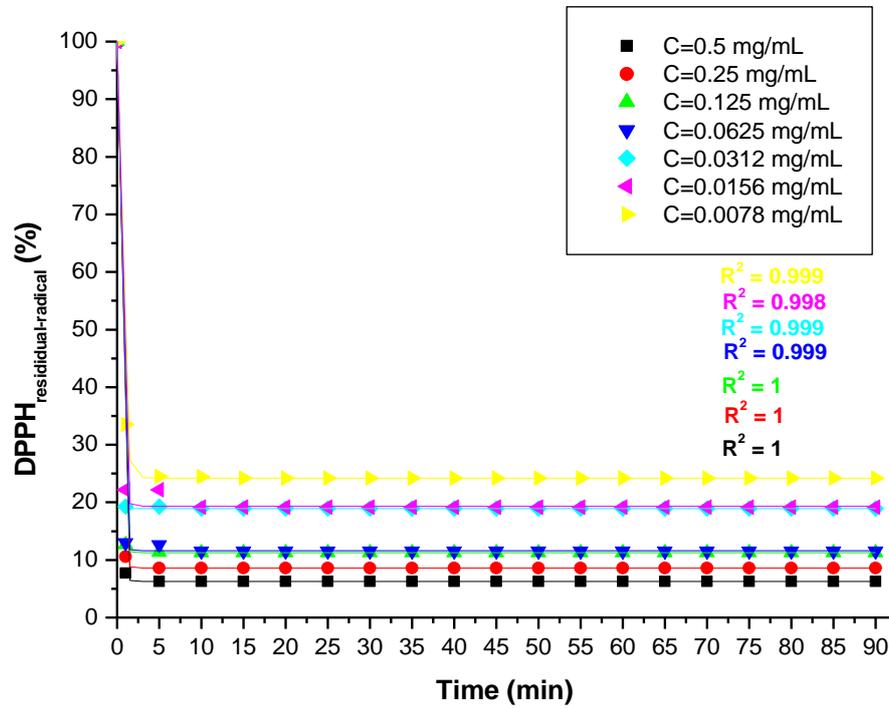
$$\%(\text{DPPH}\bullet)_R = ([\text{DPPH}\bullet]_{t=\text{Teq}} / [\text{DPPH}\bullet]_{t=0}) \times 100 \quad (\text{Equation .6})$$

L'indice  $\%(\text{DPPH}\bullet)_R$  diminue jusqu'à atteindre un plateau. Cette cinétique varie selon l'antioxydant utilisé.

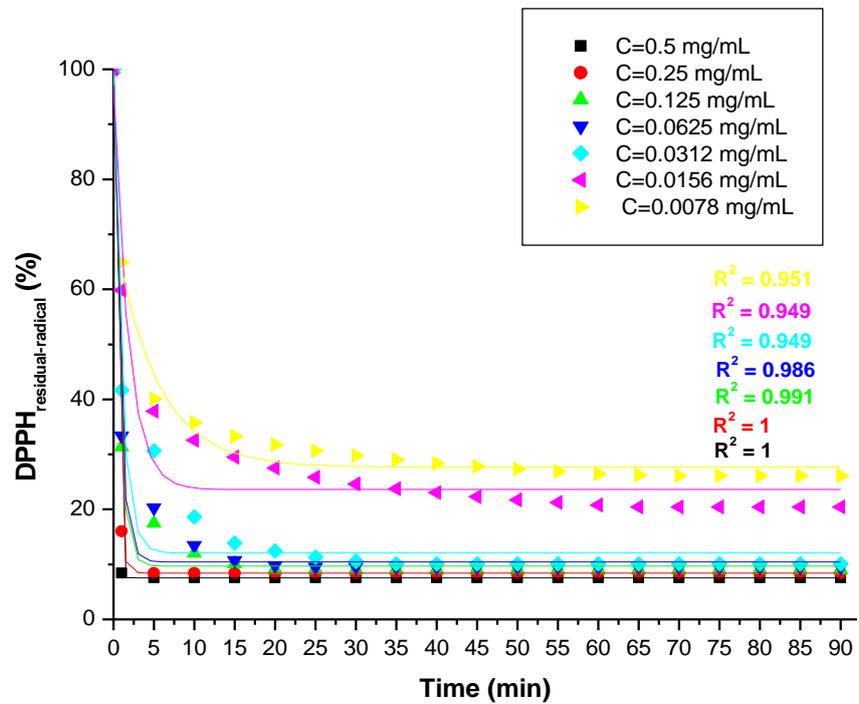
Le protocole de cette étude est le suivant. Dans un premier temps, on prépare plusieurs solutions d'antioxydant à des concentrations différentes et connues de façon à avoir différents rapports molaires :  $\text{MR} = n_{\text{antioxydant}} / n_{\text{DPPH}}$

Pour chaque MR, on mesure  $A_{517}$  jusqu'à stabilisation de la valeur au niveau d'un plateau. A partir de la valeur de  $A_{517}$ , on détermine le % de DPPH restant pour chaque relevé

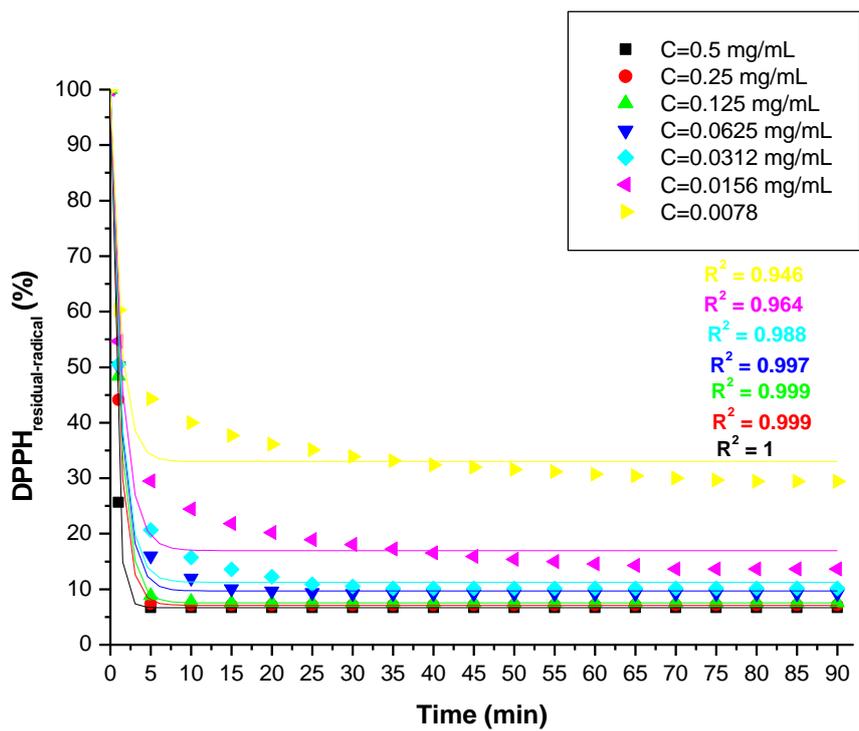
et on trace un premier graphique : % *DPPH* restant =  $f(t)$ . Les résultats obtenus sont illustrés dans les **Figures 2.31**.



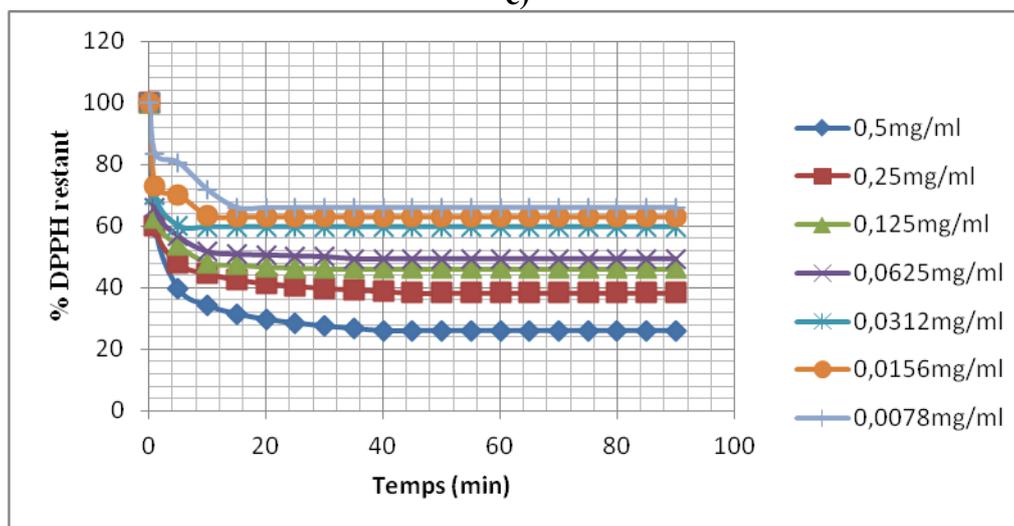
a)



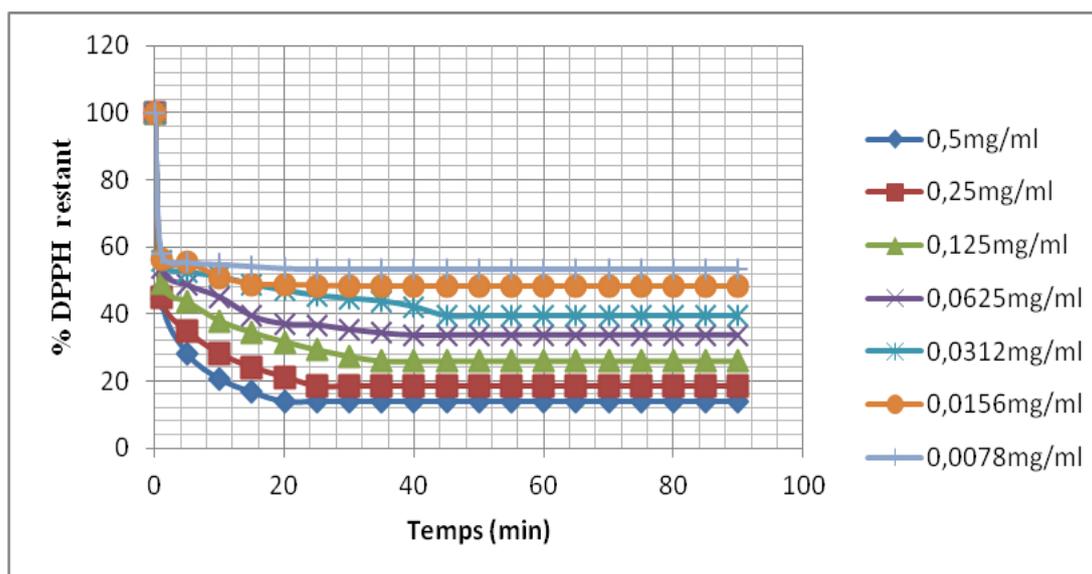
b)



c)



d)



e)

**Figure 2.31:** Etudes cinétiques de DPPH• par les antioxydants. a) Acide ascorbique, b) 6-bromoeugénol, c) Eugénol et d) Acétate d'eugényle et e) Huile essentielle du clou de girofle (sec).

A partir de ces courbes, nous remarquons la réduction d'une solution de DPPH• en fonction de temps. La courbe est linéaire à faibles concentrations et logarithmique à concentrations élevées (Figure 2.32). L'évolution de la réaction de consommation de DPPH• en fonction du temps est une exponentielle. Expérimentalement, on a remarqué que lorsqu'on additionne un volume défini de l'extrait à un volume déterminé de la solution DPPH•, l'absorbance du mélange diminué vers une valeur très basse et stable. Ce résultat encourageant, révéla que notre extrait a un pouvoir antioxydant remarquable surtout que son  $t_{1/2}$  prend un temps très court pour les sept concentrations. En plus, les temps des réactions et le pourcentage de DPPH• restant dans cette expérience varient entre 8 et 30 pour les différentes concentrations étudiées.

D'après ces résultats, il semble que l'huile essentielle du clou de girofle (sec) a une activité antioxydante mais elle est moins efficace que celle de la vitamine C. Il semble aussi que cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'huile essentielle. Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres.

Ces résultats justifient que l'eugénol et ses dérivés restent une source majeure d'agents antiradicalaires et la cinétique varie selon l'extrait testé. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **Tableau 2.8**.

**Tableau 2.8.** Résultats cinétique du piégeage de radicaux libres et activité antioxydante de l'eugénol, ses dérivés et l'huile essentielle du clou de girofle (sec).

| Composés testés   | Concentration (mg/mL) | mg AO/<br>g DPPH• | mol<br>AO/<br>mol<br>DPPH• | t <sub>1/2</sub><br>(min) | t <sub>eq</sub><br>(min) | %(DPPH•) <sub>R</sub><br>à l'équilibre | %(DPPH•)<br>piégeage des<br>radicaux libres |
|---|-----------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--|---|
| <b>Vitamine C<br/>(Acide<br/>ascorbique)<br/>(As.Ac)</b>      | 0.5                   | 6250.00           | 27.217                     | 0.183                     | 5                        | 6.25                                   | 93.75                                       |
|   | 0.25                  | 3125.00           | 13.986                     | 0.207                     | 5                        | 8.56                                   | 91.44                                       |
|   | 0.125                 | 1562.50           | 6.996                      | 0.198                     | 10                       | 11.24                                  | 88.76                                       |
|   | 0.0625                | 781.25            | 3.498                      | 0.200                     | 10                       | 11.55                                  | 88.45                                       |
|   | 0.0312                | 390.00            | 1.749                      | 0.177                     | 10                       | 18.89                                  | 81.11                                       |
|   | 0.0156                | 195.00            | 0.875                      | 0.290                     | 10                       | 19.12                                  | 80.88                                       |
|   | 0.0078                | 97.50             | 0.437                      | 0.514                     | 15                       | 24.17                                  | 75.83                                       |
| <b>6-<br/>Bromoéugénol<br/>(BrEu)</b>                         | 0.5                   | 6250.00           | 20.217                     | 0.167                     | 5                        | 7.53                                   | 92.47                                       |
|   | 0.25                  | 3125.00           | 10.137                     | 0.317                     | 5                        | 8.42                                   | 91.58                                       |
|   | 0.125                 | 1562.50           | 5.068                      | 0.567                     | 20                       | 8.98                                   | 91.02                                       |
|   | 0.0625                | 781.25            | 2.534                      | 0.604                     | 20                       | 9.54                                   | 90.46                                       |
|   | 0.0312                | 390.00            | 1.267                      | 0.808                     | 35                       | 10.10                                  | 89.9  |
|   | 0.0156                | 195.00            | 0.634                      | 1.870                     | 65                       | 20.44                                  | 79.56                                       |
|   | 0.0078                | 97.50             | 0.317                      | 2.214                     | 70                       | 26.14                                  | 73.86                                       |
| <b>Eugénol<br/>(Eu)</b>                                       | 0.5                   | 6250.00           | 30.000                     | 0.482                     | 5                        | 6.65                                   | 93.35                                       |
|   | 0.25                  | 3125.00           | 15.009                     | 0.837                     | 10                       | 7.13                                   | 92.87                                       |
|   | 0.125                 | 1562.50           | 7.505                      | 0.950                     | 15                       | 7.53                                   | 92.47                                       |
|   | 0.0625                | 781.25            | 3.752                      | 1.040                     | 30                       | 9.22                                   | 90.78                                       |
|   | 0.0312                | 390.00            | 1.876                      | 1.076                     | 35                       | 10.18                                  | 89.82                                       |
|   | 0.0156                | 195.00            | 0.938                      | 1.317                     | 70                       | 13.63                                  | 80.87                                       |
|   | 0.0078                | 97.50             | 0.469                      | 1.672                     | 80                       | 29.43                                  | 70.57                                       |
| <b>Acétate<br/>d'eugényle<br/>(Ac.Eu)</b>                     | 0.5                   | 6250.00           | 23.32                      | 1.239                     | 10                       | 26.13                                  | 73.87                                       |
|   | 0.25                  | 3125.00           | 11.963                     | 1.248                     | 15                       | 38.28                                  | 61.72                                       |
|   | 0.125                 | 1562.50           | 5.981                      | 1.341                     | 15                       | 46.15                                  | 53.85                                       |
|   | 0.0625                | 781.25            | 2.990                      | 1.467                     | 35                       | 49.32                                  | 50.68                                       |
|   | 0.0312                | 390.00            | 1.493                      | 1.110                     | 35                       | 59.72                                  | 40.28                                       |
|   | 0.0156                | 195.00            | 0.745                      | 1.851                     | 35                       | 62.82                                  | 37.18                                       |
|   | 0.0078                | 97.50             | 0.373                      | 3.010                     | 40                       | 65.92                                  | 34.18                                       |
| <b>Huile<br/>essentielle du<br/>clou de girofle<br/>(sec)</b> | 0.5                   | 6250.00           | /                          | 0.902                     | 20                       | 27.02                                  | 72.98                                       |
|   | 0.25                  | 3125.00           | /                          | 0.907                     | 25                       | 45.81                                  | 54.19                                       |
|   | 0.125                 | 1562.50           | /                          | 0.980                     | 35                       | 60.65                                  | 39.35                                       |
|   | 0.0625                | 781.25            | /                          | 1.080                     | 40                       | 65.33                                  | 34.67                                       |
|   | 0.0312                | 390.00            | /                          | 1.129                     | 45                       | 71.7                                   | 28.3  |
|   | 0.0156                | 195.00            | /                          | 1.141                     | 20                       | 80.49                                  | 19.51                                       |
|   | 0.0078                | 97.50             | /                          | 1.187                     | 20                       | 82.26                                  | 17.74                                       |

AO: Antioxydant ; MR =  $n_{\text{antioxydant}} / n_{\text{DPPH}} = n(\text{mol}) \text{AO} / n(\text{mol}) \text{DPPH} \bullet$ .

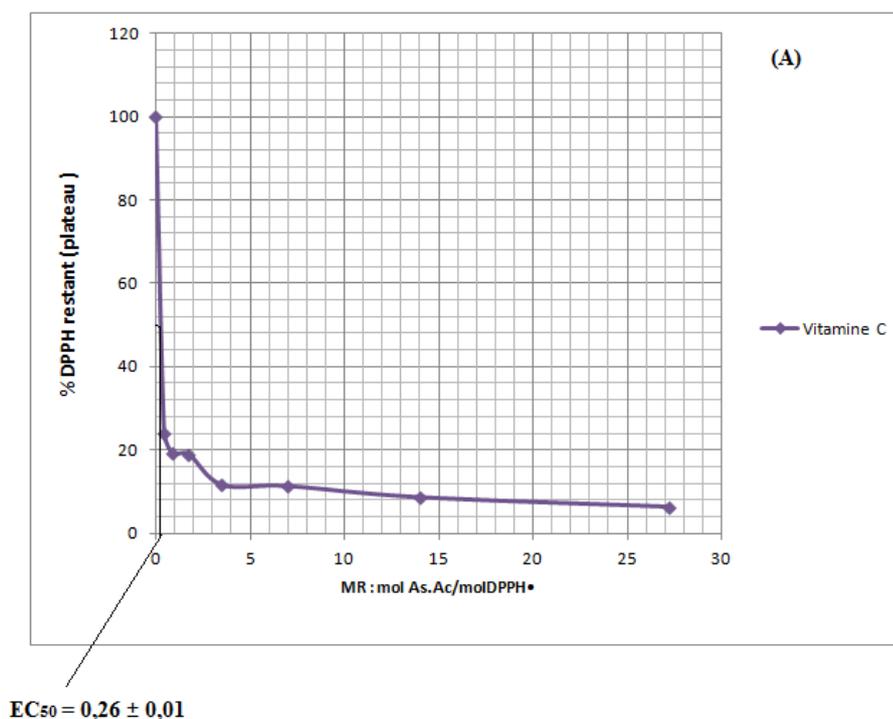
MR: rapport molaire entre nombre de mole de l'antioxydant et nombre de mole de DPPH•.

Les profils cinétiques obtenus révèlent une activité anti-radicalaire fortement dépendante des rapports molaires  $MR = [Antioxydant]/[DPPH^{\bullet}]$ . Plus le composé antioxydant est concentré, plus la baisse de l'absorbance est importante.

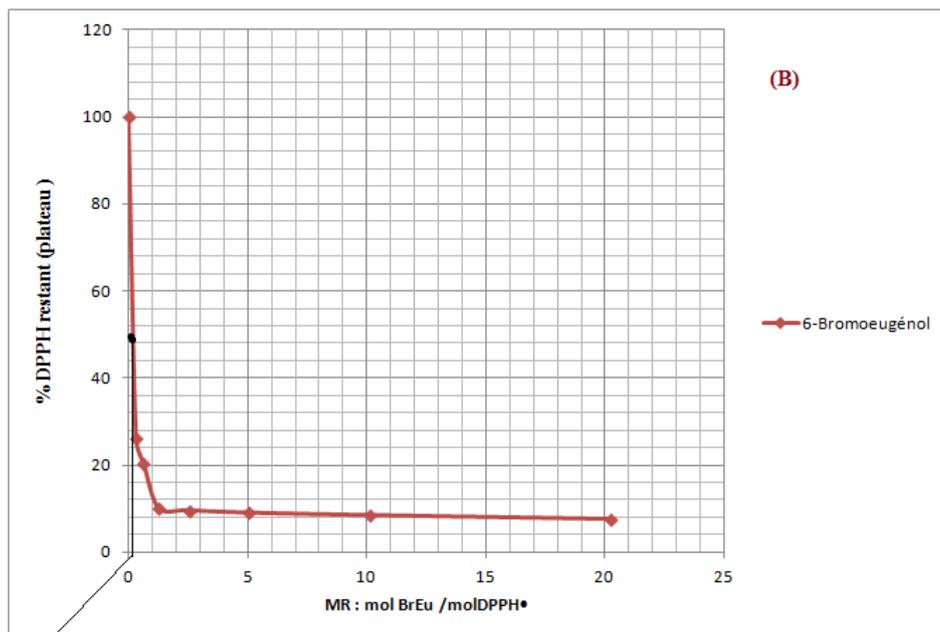
Pour un  $MR = 20.217$  mol BrEu/mol DPPH• dans le mélange réactionnel, le radical est presque totalement consommé. Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre  $T_{eq}$  varie en fonction des concentrations entre 3 minutes (réaction très rapide) et 10-30 minutes (réactions intermédiaires). A partir de la courbe traçant la relation entre le pourcentage de réduction % DPPH• *restant au plateau* et la teneur en composé phénolique on en déduit par interpolation graphique la concentration  $EC_{50}$  et le temps  $TCE_{50}$ . La courbe est linéaire à faibles concentrations et logarithmique à concentrations élevées (**Figure 2.32**).

### 2.8.6.3. Détermination d'EC50

Pour déterminer graphiquement la valeur de l'EC50 de l'antioxydant testé, nous avons tracé l'évolution du pourcentage de DPPH restant (au plateau) en fonction du rapport molaire (MR) entre le nombre de mole de l'antioxydant et le nombre de mole de DPPH•. La valeur de l'EC50 de l'eugénol et Vitamine C déterminée ci-dessus (**Figure 2.32 c et a**) est en accord avec la littérature ( $EC_{50} = 0,26$  ;  $EC_{50} = 0,26$  respectivement; Brand-Williams *et al.*) [57]. Les résultats sont illustrés dans les **figures 2.32**.

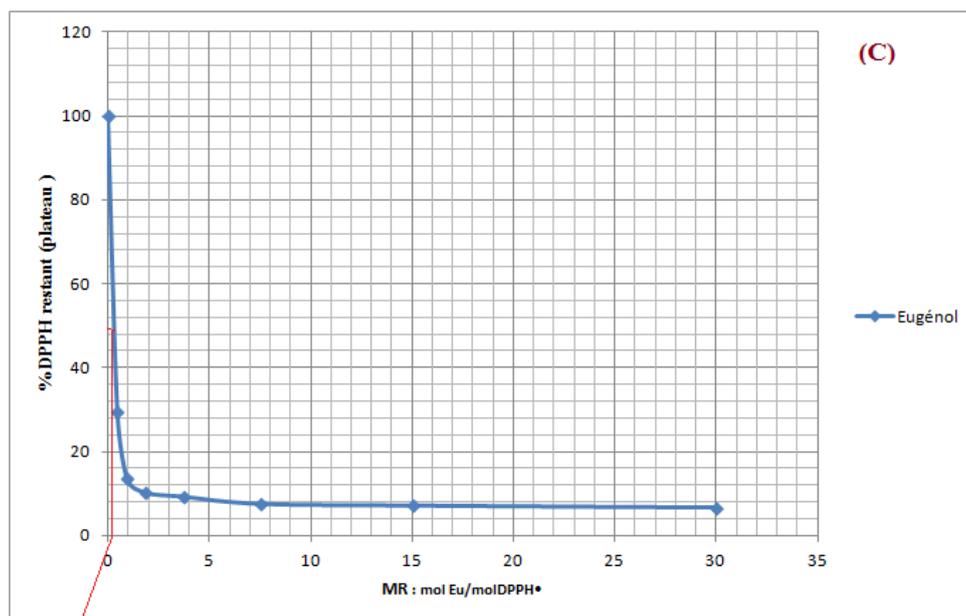


a)



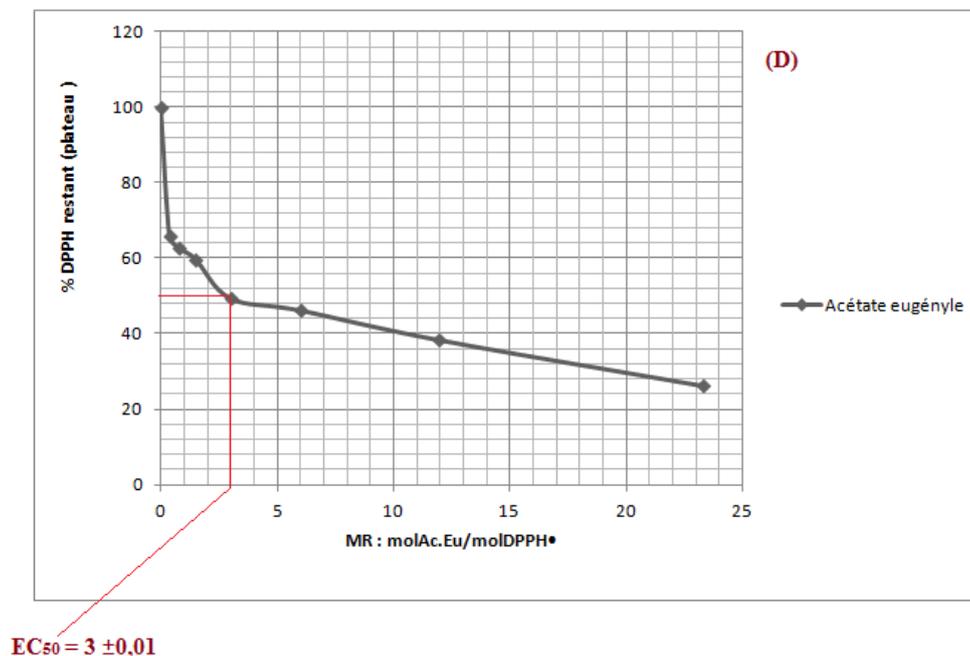
$EC_{50} = 0,22 \pm 0,01$

b)



$EC_{50} = 0,27 \pm 0,01$

c)



d)

**Figure 2.32:** Détermination d'EC50 de différents antioxydants utilisés. a) Acide ascorbique, b) 6-Bromoéugénol, c) Eugénol et d) Acétate d'eugényle.

#### 2.8.6.4. Détermination du temps d'équilibre TEC50

Le paramètre TEC50 est défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une concentration de l'antioxydant égale à IC50. Ce temps est calculé graphiquement [83]. On a choisi l'état d'équilibre comme période de mesure où il s'avère que la réaction ne progresse pas plus loin. Le temps à l'état d'équilibre dépend de la réactivité des antioxydants et des concentrations utilisées. On constate que la vitamine C réagit d'une façon plus rapide avec DPPH•. Le TEC50 pour le 6-bromoéugénol est de 1.45 min et pour eugénol est de 1.55 min, et pour acétate eugényle est de 34 min et pour l'huile essentielle du clou de girofle (sec) est de 1.02 min, alors que la vitamine C a besoin seulement de 0.95 min pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Les résultats pour les différents paramètres : IC50, EC50, EAR, ARP, TEC50, SV et NRD sont regroupés dans le **Tableau 2.9**

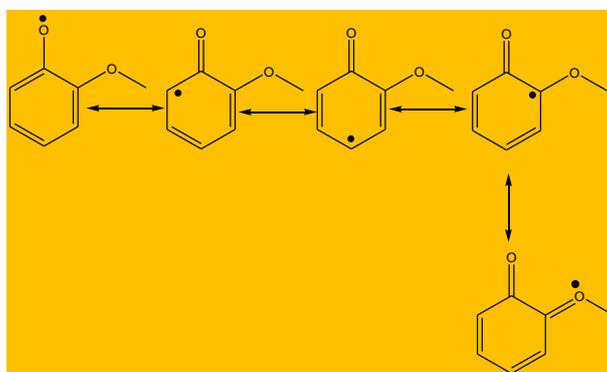
**Tableau 2.9.** Paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH•.

| Composés testés                            | IC50<br>µgAO/mL | EC50<br>molAO/mol DPPH• | ARP   | SV   | NRD   | TEC50<br>min | EAR<br>x10 <sup>-3</sup> | Classification                |
|--|-----------------|-------------------------|-------|------|-------|--------------|--------------------------|-------------------------------|
| Vitamine C (Acide ascorbique)              | 54.888          | 0.26                    | 3.84  | 0.52 | 1.923 | 0.95         | 17.54                    | Très élevée                   |
| 6-Bromoeugénol                             | 34.270          | 0.22                    | 4.54  | 0.44 | 2.27  | 1.45         | 17.23                    | Très élevée                   |
| Eugénol                                    | 130.485         | 0.27                    | 3.7   | 0.54 | 1.85  | 1.55         | 4.94                     | Intermédiaire                 |
| Acétate eugényle                           | /               | 3.00                    | 0.33  | 6    | 0.16  | 34           | /                        | Très faible (pas de réaction) |
| Huile essentielle du clou de girofle (sec) | 200.00          | /                       | 0.005 | /    | /     | 1.02         | 4.90                     | Intermédiaire                 |

Remarque : Certaines molécules synthétisées, n'ont révélé qu'un pouvoir antioxydant très faible. Ces molécules n'ont pas la capacité de réduire 50 % du DPPH• initialement introduit et il n'a pas été possible de déterminer une valeur EC<sub>50</sub>. Pour ces composés, on peut définir un nouveau paramètre : EC<sub>10</sub>, correspondant au rapport molaire laissant 90 % du DPPH• sous sa forme initiale de radical, et aussi le temps mis pour réduire 10 % de DPPH• soit TEC<sub>10</sub>.

Parmi ces composés, la vitamine C (Acide ascorbique) représente le composé le plus actif. Le pouvoir antioxydant du 6-bromoeugénol a donné les valeurs 2 fois plus faibles et l'eugénol a donné les valeurs 8 fois plus faibles. On obtient ainsi l'ordre décroissant de l'activité antioxydante suivant l'indice EAR : vitamine C (acide ascorbique) > 6-bromoeugénol > eugénol > huile essentielle du clou de girofle (sec).

Barclay *et al.* [84] ont montré qu'un groupement méthoxyle positionné en *ortho* d'un phénol stabilise par résonance le radical phénoxy (Figure 2.33).



**Figure 2.33:** Stabilisation d'un radical phénoxy [81].

La présence du brome et de méthoxyle (groupements donneurs) en deux positions *ortho* de 6-bromoéugénol explique la forte valeur de son ARP ainsi que la lenteur de sa cinétique de réaction (1.45 min) et provoque une augmentation de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle de 6-bromoéugénol. Par contre l'absence de groupement Br en deuxième position *ortho* d'éugénol explique la diminution de valeur de son ARP ainsi que la lenteur de sa cinétique de réaction (1.55 min) et provoque une diminution de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle de l'éugénol. Ce phénomène a déjà été discuté par Brand-Williams *et al.* [57] sur la réactivité de l'éugénol. Brand-Williams *et al.* ont montré que l'éugénol pouvait céder deux atomes d'hydrogènes : le premier atome d'hydrogène provenant du phénol puis un second atome d'hydrogène situé en position benzylique.

L'énergie ou enthalpie de dissociation (BDE) de la liaison O-H dans la partie phénolique des molécules est sûrement un facteur déterminant pour l'efficacité de l'activité antioxydante. Plus la molécule aura une énergie de dissociation BDE faible et plus la réaction avec un radical libre sera rapide et la molécule sera un antioxydant puissant. Le radical Ar-O• formé à la suite de la réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH• (ou un radical libre) doit être relativement stable pour que l'antioxydant considéré soit reconnu comme efficace. Récemment, Wright *et al.* [85] ont proposé un ensemble de valeurs dérivées  $\Delta$ BDE optimisées et obtenues par des calculs. Pour cela, ils ont calculé les différentes valeurs d'énergie de dissociation BDE de la liaison ArO-H pour un cycle aromatique phénolique substitué par différents groupements électro-donneurs ou électro-attracteurs en *ortho*, *méta* ou *para* du phénol. Pour simplifier, ils ont rapporté ces différentes valeurs de BDE à celle du phénol déterminant ainsi une nouvelle valeur :  $\Delta$ BDE. On peut conclure que le groupement phénolique joue un rôle majeur dans l'activité antioxydante, ce qui est en parfait accord avec nos résultats.

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant sont nombreuses et peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour confirmer l'activité antioxydante des composés, sont relativement peu nombreux et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes les plus utilisées pour la détection des antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM) qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés.

D'autres méthodes, moins pratiques, nécessitent la pulvérisation successive de deux solutions différentes. Une méthode de la chromatographie (CCM), combinée avec la détection visuelle pour l'évaluation de l'activité de balayage de radical libre des fractions antioxydantes en employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•).

La technique bio-autographique HPTLC est une méthode très utilisée pour détecter la présence des composés phénoliques (groupe –OH) et les substances antioxydantes dans les extraits des plantes comme l'huile essentielle.

Dans cette étude, nous avons utilisé cette technique pour confirmer le pouvoir antioxydant des composés suivants : le 6-bromoeugénol, l'eugénol, l'acétate d'eugényle et l'huile essentielle extraite du clou de girofle.

L'analyse des plaques CCM pulvérisées respectivement avec le DPPH 0.004% et l'acide sulfurique 10% montre des colorations des spots en jaune dans le cas de DPPH indiquant la présence des composés antioxydants et en pourpre dans le cas de l'acide sulfurique qui confirme bien que le 6-bromoeugénol, l'eugénol, et l'huile essentielle de clou de girofle (sec) possèdent une activité antioxydante.

Ainsi, la méthode HPTLC bio-autographique reste une méthode indispensable pour confirmer au préalable le pouvoir antioxydant avant d'entamer cette activité par quantification spectrophotométrique. A partir de l'HPTLC nous avons pu confirmer cette propriété des produits étudiés (6-bromoeugénol, eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle de clou de girofle (sec)).

En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. La génération de radical libre est directement reliée à l'oxydation dans la nourriture et les systèmes biologiques. Les méthodes principales comportent le balayage des radicaux de superoxyde ( $O_2^{\bullet}$ ); le balayage de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ); le balayage d'acide hypochloreux (HOCl); le balayage du radical d'hydroxyle (OH) ou le balayage du radical de peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ).

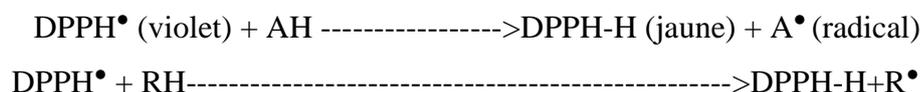
La plupart des méthodes sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés (piégeage du radical: superoxyde ( $O_2^{\bullet}$ ), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ), peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ), radical 2,2-diphényl-1picrylhydrazyle (DPPH•), du ABTS et réduction de fer FRAP). Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition " dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le

pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant.

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques. Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron.

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des produits suivants : 6-bromoeugénol, eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle de clou de girofle (sec) a été réalisée par la technique chimique : le piégeage du radical libre DPPH•.

Le radical DPPH• est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical et la simplicité de l'analyse. L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH• à 517 nm, qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire comme le montre les équations suivantes.



La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée à partir du calcul des IC<sub>50</sub>, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH•. Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande.

Dans notre travail, nous avons étudié l'activité antioxydante et la cinétique des produits suivants : 6-bromoeugénol, eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle de clou de girofle(sec) afin de déterminer le substrat la plus actif.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure droite qui signifie la réduction presque totale du DPPH• en sa forme non radicalaire. A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur d'IC<sub>50</sub> de chaque extrait.

Ces résultats obtenus encourageant, révèlent que le 6-bromoeugénol transforme le radical libre stable 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH•) au diphenylpicrylhydrazine (jaune) avec un IC50 de 34.270µg/mL montrant une activité antioxydant supérieure à celle de la vitamine C (Acide ascorbique) d'un IC50 de 54.888 µg/mL. Par contre l'eugénol et l'huile essentielle du clou de girofle (sec) avec un IC50 de 130.485µg/mL et 200.00 µg/mL respectivement montre une activité antioxydant inférieure à celle de la vitamine C (Acide ascorbique) et l'acétate d'eugényle avec IC50 nul. Il est important de souligner que le 6-bromoeugénol est un puissant antioxydant et un bon extracteur du radical DPPH•.

### **2.8.7. Conclusion**

Bien que le test au DPPH• soit considéré comme une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre, les expériences ont montré certaines difficultés relatives à la mesure de l'état de réduction: un phénomène dynamique à faible concentration (traces d'antioxydant en ppm) et accompagné de nombreux composés formés, dans certains cas instables.

De plus, il existe une hétérogénéité structurale au sein des composés phénoliques, hétérogénéité qui se traduit par des propriétés différentes. C'est pourquoi, en effectuant des tests de mesure de la cinétique de l'activité anti-radicalaire, on peut générer une évaluation plus globale des propriétés des échantillons étudiés. L'estimation simultanée du pouvoir anti-radicalaire 1/EC50 et du temps de réaction TEC50 permettent d'évaluer d'une meilleure façon l'activité antioxydante par l'indice de l'efficacité anti-radicalaire.

Le test au DPPH• n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH• et ainsi, d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques. L'évaluation de l'activité anti-radicalaire doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH• à 515-520 nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionné à l'antioxydant.

## 2.9. Matériel et méthodes

### 2.9.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Rappelons que les composés sont ajoutés au radical DPPH• dans du méthanol et l'absorbance à 517 nm (maximum d'absorption du DPPH•) est relevée à différents temps  $t$  (min). La réaction de transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le DPPH• est suivie par spectroscopie visible en enregistrant la décroissance de la bande d'absorption du DPPH• à 517 nm.

Nous avons déterminé plusieurs paramètres permettant de comparer les antioxydants entre eux : (Pourcentage d'inhibition, l'index IC<sub>50</sub> : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH•; EC<sub>50</sub> "concentration efficace" correspondant au rapport molaire  $MR = n_{\text{antiox}} / n_{\text{DPPH}}$  nécessaire pour réduire 50 % du DPPH• initial; AAI "indice de l'activité antioxydant" égal à  $C_f/IC_{50}$  :  $C_f$  est la concentration finale de la solution DPPH• et IC<sub>50</sub> Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire ou inhibée à 50% la concentration initiale du radical DPPH•; ARP "pouvoir anti-radicalaire" égal à  $1/EC_{50}$  ou  $1/IC_{50}$ ; T(EC<sub>50</sub>) temps mis par l'antioxydant pour atteindre le plateau ( $A_{517} \sim$  constante) à  $MR = EC_{50}$  ; ARE (efficacité anti-radicalaire) Les deux facteurs IC<sub>50</sub> ou EC<sub>50</sub> et TE<sub>50</sub> peuvent être combinés afin d'obtenir le paramètre d'efficacité anti-radicalaire ; SV "valeur stœchiométrique" égale à  $2 \times EC_{50}$  ; NRD "nombre de DPPH• réduit".

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH•. Le pouvoir antioxydant de : le 6-bromoeugénol, l'eugénol, l'acétate eugényle et l'huile essentielle extraite du clou de girofle (sec) testée a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel l'acide ascorbique (Vitamine C). Tous les tests ont été réalisés avec trois fois pour chaque concentration.

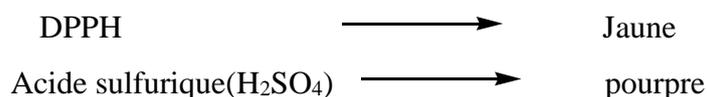
### 2.9.2. Préparation de l'extrait à testé

Dissoudre 2mg de l'échantillon synthétisé (eugénol et ses dérivées) ou extrait (huile essentielle de clou de girofle sec) dans 2mL de méthanol (solution mère 1 mg/mL). Préparer différentes concentration de (0,5 ; 0,25 ; 0.125 ; 0,0625 ; 0,0312 ; 0,0156 et 0, 0078 mg/mL).

### 2.9.3. Test HPTLC (Hight Performance Thin Layer Chromatography)

Les extraits des différents échantillons synthétisés, sont soumis à une séparation par couche mince avec utilisation toluène/méthanol (95/05) comme éluant. Après dépôt de notre

extrait sur la plaque, cette du dernière est développée dans une chambre chromatographie, la hauteur de la migration est de 70 mm. Après 15 min de séchage de la plaque à l'air libre, cette dernière est exposée a une pulvérisation par une solution méthanolique de DPPH 0.004% (m/v).Après 30 min de séchage de la plaque dans une étuve à 60°C, voir la coloration des spots. La même opération est refaite mais en pulvérisent la plaque avec de l'acide sulfurique 10 % (m/v).Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration :



La lecture a été faite par observation de la plaque sous lampe UV à 363nm .Les Rf des spots ont été enregistrés.

#### **2.9.1.4. Test de Piégeage du radical libre DPPH•**

##### **2.9.1.4.1. Mesure de l'activité anti radicalaire libre (DPPH•)**

###### **2.9.1.4.1.1. Principe**

La capacité de donner des électrons par : le 6-bromoeugénol, l'eugénol, l'acétate d'eugényle et l'huile essentielle de clou de girofle est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique (Absorbance 517 nm), en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH• (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle ) et l'apparition de la couleur jaune pâle ou incolore qui correspond à la forme non radical (DPPH-H). Ainsi, l'absorption diminue lors de la réduction ou le balayage de radical DPPH• [86].

###### **2.9.1.4.1.2. Mode opératoire**

L'activité antiradicalaire libre a été déterminée en utilisant l'essai au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•) selon la méthode décrite par Blois [87]. L'activité de piégeage des radicaux des dérivés de l'eugénol a été mesurée par le procédé légèrement modifié décrit ci-dessous.

100µL de chaque solution méthanolique extraites de : 6-bromoeugénol, eugénol, acétate d'eugényle et l'huile essentielle de clou de girofle à différentes concentrations (de 0,5 ; 0,25 ; 0.125 ; 0,0625 ; 0,0312 ; 0,0156 et0, 0078 mg/mL), sont ajoutés à 1,9 ml de la solution méthanolique du DPPH• (0.004%) [(0.04 mg/mL) ou (1mg de DPPH• dans 25ml de méthanol)]. Les solutions d'échantillons ainsi préparées sont maintenues dans l'obscurité à

température ambiante et les absorbances sont mesurées à 517 nm après 30 min à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/VIS 1700 pharma Spectrophotomètre, SHIMADZU).

L'expérience est réalisée trois fois et l'absorbance moyenne est notée pour chaque mesure afin de vérifier la reproductibilité. La même procédure est suivie pour le contrôle positif (témoin positif) : l'acide ascorbique (0,5-0,0078 mg/ml) et à titre de comparaison. Le méthanol est utilisé pour la correction de base. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) ou en % de piégeage des radicaux DPPH•. La diminution de l'absorbance de la solution DPPH• indique une augmentation de l'activité de piégeage des radicaux DPPH• (pourcentage d'inhibition) (I %). On détermine la cinétique de la réaction et les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour l'acide ascorbique et pour l'extrait méthanolique (Pourcentage d'inhibition, l'index IC50).

- **Courbe d'étalonnage de la solution de DPPH•**

Avant de déterminer l'activité antioxydante, nous avons estimé la stabilité et l'intervalle de linéarité des solutions de DPPH• doit être évalué et les résultats sont présentés graphiquement. Nous avons préparé sept solutions de DPPH• (0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0312, 0,0156 et 0,0078 mg / ml) à partir d'une solution mère (1 mg / ml). Ces concentrations ont été sélectionnées en raison de la loi de Beer. Après une période de 30 min à température ambiante dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

#### **2.9.1.5. Détermination du pourcentage d'inhibition**

Selon Blois et Sharififar et al. [83, 87-88] inhibition du radical DPPH• (% DPPH•) libre est calculé de la manière suivante :

$$(\%I) \%DPPH_{\text{piégeage des radicaux libres}} = [(A^{\bullet} - A) / A^{\bullet}] \times 100 \quad (\text{Equation 4})$$

$A^{\bullet}$  : absorbance du DPPH• dans le méthanol (blanc) ; A : absorbance de la solution de l'échantillon testé à l' instant t.

Les pourcentages du DPPH• inhibés en fonction des concentrations de 6-bromoéugénol, eugénol, acétate eugényle et l'huile essentielle extraite du clou de girofle et de la vitamine C, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50% [83].

### 2.9.1.6. Détermination d'IC50

Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante. Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC50 qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH• [89, 90].

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective EC50 (ou l'inverse 1/IC50) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH• dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son EC50 est petite. L'indice EC50 montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• avec 50% (exprimée en mol Antioxydant/mol DPPH• ou mg Antioxydant/g DPPH•), mais ne prennent pas en considération l'influence de la concentration sur le temps de la réaction [85].

### 2.9.1.7. Détermination de l'indice de l'activité antioxydant (AAI)

L'indice de l'activité antioxydant (AAI) est calculé comme suit [91]:

$$AAI = C_f/EC50 \quad (\text{Equation 5})$$

où  $C_f$  est la concentration finale de la solution DPPH• et EC50 ("concentration efficace") correspondant au rapport molaire  $MR = n_{\text{antiox}} / n_{\text{DPPH}}$  nécessaire pour réduire 50 % du DPPH• initial, et est calculée graphiquement en traçant la concentration de l'échantillon contre l'effet de balayage correspondante. Les auteurs estiment que l'activité antioxydante est: pauvre lorsque  $AAI < 0,5$ , modéré avec  $AAI$  dans  $[0,5 ; 1,0]$ , avec une forte  $AAI$  dans  $[1.0 ; 2.0]$  et très fort quand  $AAI > 2.0$  [81].

## 2.9.2. Etude cinétique de la réaction de piégeage des radicaux libres DPPH•

### 2.9.2.1. Principe

La cinétique de réduction du DPPH• à différentes concentrations en antioxydant testé est suivie au cours du temps jusqu'à l'obtention d'un plateau au temps final ( $T_{eq}$ ). La réduction des radicaux libres est évaluée par le rapport relatif de la concentration résiduelle  $[DPPH•]_{t=T_{eq}}$  restant en fin de cinétique par rapport à sa concentration initiale :

$$\%(\text{DPPH}\bullet)_R = [\text{DPPH}\bullet]_{t=T_{eq}} / [\text{DPPH}\bullet]_{t=0} \times 100 \quad (\text{Equation 6})$$

L'indice  $\%(\text{DPPH}\bullet)_R$  diminue jusqu'à atteindre un plateau, cette cinétique variant selon l'antioxydant utilisé.

### 2.9.2.2. Mode opératoire

#### ✚ Préparation de la solution mère et les solutions filles

Dissoudre 4mg d'extrait dans 4 mL de méthanol (solution mère 1 mg/mL). A partir de cette solution, préparer les différentes concentrations (0.5 ; 0.25 ; 0.125 ; 0.0625 ; 0.0312 ; 0.0156 ; 0.0078 mg/mL) pour faire le suivi cinétique.

#### ✚ L'étude cinétique de la réaction

On mélange 2mL de chaque solution avec 2mL de solution de DPPH (0.04 mg/mL) ou (1mg) de DPPH dans (25mL) de méthanol, l'absorbance a été mesurée après chaque 30 s jusqu'à ce qu'il devienne constant. Les absorbances ont été mesurées jusqu'à ce que la solution de DPPH • décoloré en présence d'acide ascorbique, du 6-bromoéugénol, d'eugénol, d'acétate d'eugényle et de l'huile essentielle du clou de girofle (sec).

### 2.9.2.3. Détermination du temps d'équilibre TEC50

Selon Sharififar .F et al [83] Le paramètre TEC50 est défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une Concentration d'antioxydant égale à IC50. Ce temps est déterminé graphiquement. Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, dans la deuxième approche des paramètres cinétiques sont introduits, tels que le temps TEC50 nécessaire pour atteindre l'équilibre à EC50, la constante de vitesse de la réaction ou le coefficient directeur de la courbe cinétique [92-94]. L'estimation de TCE50 permet d'introduire la classification suivante: TEC50 < 5 min (réaction rapide), 5-30 min (réaction intermédiaire) et TCE50 >30 min (réaction lente) [57,92].

### 2.9.2.4. Détermination de l'efficacité anti-radicalaire (ARE)

Les deux facteurs IC50 et TE50 sont combinés afin d'obtenir le paramètre d'efficacité anti-radicalaire :

$$EAR = 1 / (\text{IC}_{50} \cdot \text{TEC}_{50}) \quad (\text{Equation 7})$$

Les résultats peuvent être aussi exprimés en pouvoir anti-radicalaire ARP [57]

$$\text{ARP} = 1 / \text{IC}_{50} \quad (\text{Equation 8})$$

L'indice de l'efficacité anti-radicalaire [EAR = 1/(EC<sub>50</sub>.TEC<sub>50</sub>)] relie la concentration du DPPH• et le temps TEC<sub>50</sub> dans l'essai avec la concentration effective EC<sub>50</sub> de l'échantillon, et résulte dans un paramètre constant pour chaque solution ou extrait.

En considérant le pouvoir anti-radicalaire (1/EC<sub>50</sub>) et le temps de la réaction TCE<sub>50</sub> pour atteindre 50% réduction, l'indice de l'efficacité anti-radicalaire EAR a été calculé [91].

$$\begin{aligned} \text{ARE} = \text{ARP}/\text{TEC}_{50} \quad \text{et} \quad \text{ARP} = 1/\text{EC}_{50} &\implies \text{ARE} = \frac{1}{\text{EC}_{50} \times \text{TEC}_{50}} \\ \text{ARE} = \text{ARP}/\text{TEC}_{50} \quad \text{et} \quad \text{ARP} = 1/\text{IC}_{50} &\implies \text{ARE} = \frac{1}{\text{IC}_{50} \times \text{TEC}_{50}} \quad (\text{Equation 3}) \end{aligned}$$

Les solutions testées ont été classées suivant la classification proposée par Sanchez-Moreno *et al.* [91] : l'activité anti-radicalaire est faible pour EAR < 1.10<sup>-3</sup>, intermédiaire entre [1.10<sup>-3</sup>, 5.10<sup>-3</sup>], élevée entre [5.10<sup>-3</sup>, 10.10<sup>-3</sup>], et très élevée pour EAR > 10.10<sup>-3</sup>.

#### 2.9.2.5. Détermination de valeur stœchiométrique (SV)

La valeur stœchiométrique SV est égale à 2 x EC<sub>50</sub>, soit le rapport molaire MR nécessaire pour réduire 100 % du DPPH• initial.

#### 2.9.2.6. Détermination de nombre de DPPH• réduit (NRD)

Le NRD est le nombre de DPPH• réduit. Il s'agit du nombre de moles de DPPH• réduites par une mole d'antioxydant. Ce paramètre est en réalité déduit de la valeur de l'EC<sub>50</sub> de l'antioxydant, par la relation suivante :

$$\text{NRD} = \frac{1}{2 \text{EC}_{50}} = \frac{1}{\text{SV}} \quad (\text{Equation 2})$$

## ***Références bibliographiques***

- [1] F. Girodon F.D. Blache, A.D. Monget, M. Lombart, P. Brunet-Lecompte, J. Arnaud, M.J. Richard, P. Galan . Effect of a two-year supplementation with low doses of antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and antioxidant defense parameters. *J Am Coll Nutr.* **1997**, 16, 357-365.
- [2] R.S. Sohal, R.J. Mockett, W.C. Orr. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med.* **2002**, 33, 575-586.
- [3] J.M. Mates, F.M. Sanchez-Jimenez. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* **2000**, 32, 157-170.
- [4] C. Sergeant, C. Hamon, M. Simonoff, J. Constans, C. Conri, C. Peuchant, Delmas- MC. Beauvieux, C. Clerc, J.L. Pellegrin, B. Leng, I. Pellegrin, H. Fleury. Oxidative Stress in Cancer, AIDS and neurodegenerative diseases. Editors: L. Montagnier, R. Olivier, C. Pasquier; Marcel Dekker. Inc. *New York-Basel-Hong Kong.* **1998**, 409-427.
- [5] S.E. Atawodi. Antioxidant potential of African plants. *African. J. Biotec.* **2005**, 4 (2), 128-133.
- [6] S.R. Georgetti, R. Casagrande, V.M. Di Mambro, ECS. Azzolini Ana, J.V. Fonseca Maria. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharm Sci.* **2003**, 5 (2), 5.
- [7] J.F. Turrens, A. Alexandre, A.L. Lehninger. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch BiochemBiophys.* **1985**, 237, 408-414.
- [8] H.J.H. Fenton. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.* **1894**, 65 (65), 899-91.
- [9] J. Cillard, P. Cillard. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Dossier. Journal of OCL.* **2006**, 13 (1).
- [10] B. Halliwell. How to characterize a biological antioxidant. *Free RadicRes Commun.* **1999**, 9, 1-32.
- [11] a) B. Jehl, N. Madet. L'acide ascorbique et son utilisation en tant qu'additif dans les industries alimentaires. *Mémoire en Licence IUP SIAL.* Université de Paris XII. **2003/2004**.
- b) M. Denil, P. Lannoye. Guide des additifs alimentaires, les précautions à prendre, *Editions Frison-Roche*, Paris. **2001**.

- [12] E.Portès. Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. *Thèse de doctorat en chimie*. Université Bordeaux I. **2008**
- [13] J.L. Perrin. Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Revue française des corps gras*. **1992**, N° 39. P 25-32.
- [14] K. Bouhadjra. Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. *Mémoire de magister en chimie*. Université Tizi-Ouzou. **2011**.
- [15] M.C. Martini, M. Seiller. Actifs et additifs en cosmétologie. Coordonnatrices. Éditions Tec & Doc ISBN : 2-7430-0191-7. p337 - 352.
- [16] Ch.Basset. Recherche de nouvelles molécules antifongiques et mise en évidence de synergie dans l'activité antifongique. *Rapport de Stage du MASTER 2*. Université Paris-Sud 11. **2008**.
- [17] K. Sebei, S. Boukhchina, H. Kallel. Évolution des tocophérols en relation avec les acides gras insaturés au cours de la maturation des graines de colza de printemps (*Brassicanapus L.*). *C. R. Biologies*. **2007**, 330, 55–61.
- [18] a) J.F. Pennock, F.M. Hemming, J.D. Kerr. A reassessment of tocopherol chemistry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, 17, 542-548. b) E.J. Fernholz. Constitution of  $\alpha$ -tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 700-710.
- [19] E. Rock. Stress oxydant, micronutriments et santé ; INRA – CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments ; 63122 st genès champanelle. *Université d'été de Nutrition* **2003** .
- [20] G. Le Moel, A. Saverot-Dauvergne , T. Gousson. Le statut vitaminique. France : *Editions Médicales Internationales*. **1998**, p 550.
- [21] J. PASTRE. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Thèse de doctorat*. **2005**, TOU 3-4116.
- [22] K. Ba, E. Tine, J. Destain, N. Cissé, P. Thonart. Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2010** ,14(1), 131-139.
- [23] P. Ribéreau-Gayon. Les composés phénoliques des végétaux. **1968**.
- [24] R.B. Herbert. The Biosynthesis of secondary metabolites. 2<sup>ème</sup> édition Chapman and Halle. **1989**, p 2, 11-115.

- [25] J.B. Harborne. Secondary Plant Products. Encyclopedia of Plant Physiology. Eds. Springer-Verlag, Berlin. **1980**, p329-402.
- [26] J. Bruneton. Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales, Eds. *Technique et documentation Lavoisier, Paris*. **1999**.
- [27] J.P.E. Spencer, D. Vauzou. Les effets des flavonoïdes sur la mémoire et l'apprentissage ; *Molecular Nutrition Group, School of Chemistry, Food and Pharmacy, University of Reading* , janvier. **2009**.
- [28] A. Puppo. Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type Reactions; Influence of the Iron Chelator. *PhytoChemistry*. **1992**, 31(1), 85-88.
- [29] Ch.Boubekri. Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. *Thèse de doctorat en chimie*. Université Mohamed Khider – Biskra. **2014**.
- [30] J. Doat. Les tanins dans les bois tropicaux. *Revue bois et forêts des tropique*. **1978**, N°182, Novembre- Décembre .
- [31] V.V. Cheynier, J.M. Souquet, H. Fulcrand, P. Sarni, M. Moutounet. Stabilisation tannins-anthocyanes données générales. Extrait de " les composés phénoliques" *Journal Technique* (compte rendu). 8 juillet **1998**.
- [32] S. Khoufi, F. Feki, S. Sayadi. Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials*. **2007**,142, 58-67.
- [33] F.N. Bazoti, E. Gikas, A.L. Skaltsounis, A. Tsarbopoulos. Development of a liquid chromatography–electrospray ionization tandemmass spectrometry (LC–ESI MS/MS) method for the quantification of bioactive substances present in olive oil mill wastewaters. *Analytica Chimica Acta*. **2006** ,573–574.
- [34] M. Bouaziz. Production et caractérisation de molécules bioactives à partir de deux plantes médicinales : oleaeuropaeal. et hyparrheniahirtal. stapf. *Thèse pour l'obtention du grade de docteur en chimie, Faculté des sciences de Sfax*. **2006**.
- [35] H. Hartzallah, A. Kiritsakis. Effet antioxydant des extraits phénoliques des feuilles et des fruits de l'olivier ; N°77. Juin, **1999**.
- [36] J.R. Chipault, G.R. Mizuna, J.M. Hawkins, W.O Lundberg. The antioxidant properties of natural spices. *Food Res*. **1952**, 17, 47–55.
- [37] J.R. Chipault, G.R. Mizuna, J.M Hawkins, W.O. Lundberg. The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technol* .**1955**, 10, 209–11.

- [38] A.E.F. Kouame. Etude de la migration des antioxydants phénoliques dans les boissons en sachet (Abidjan- cote d'ivoire). Thèse de doctorat en pharmacie. 28 juin **2004** N° 26. Université Cheikh anta diop de Dakar.
- [39] J. Pincemial, M. Meurisse, R. Limet, R. JO. Defraigne. Mesure et utilisation des antioxydants. *Journal of Médecine Sphère*. **1998**, 73, 233 – 239.
- [40] Z. Hellal. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). *Mémoire de magister en biologie*. Université Tizi-Ouzou. **2011**.
- [41] N. Just, M. Nyunga, J. Lelong, B. Wallaert. Allergie immédiate aux glucocorticoïdes de synthèse oraux. *La Revue de Médecine Interne*, **2005**, 26, 331-334.
- [42] M.C. Pibiri. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. *Thèse de Doctoral. Polytechniques Fédérale de Lausanne*. **2005**.
- [43] R. Yaacoub. Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux ; Intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés ; thèse de doctorat; N°AGPT 0048; Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech) .N°AGPT 0048, **2009**.
- [44] E. Méndez, J. Sanhueza , H. Speisky, A. Valenzuela. Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oils. *Journal of American Oil Chemical Society*, 1996, 73, 1033-1037.
- [45] N. A. Botsoglou , D J. Fletouris , G E. Papageorgiou , G E. Vassilopoulos, A. J. Mantis, A G. Trakatellis. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissues, food and feedstuff samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **1994**, 42, 1931-1937.
- [46] M.K. Fasseas, K.C. Mountzouris, P.A. Tarantilis, M. Polissiou, G. Zervas .Antioxydant activity in meat treated with Oregano and Sage essential oils. *Food Chemistry*. **2007**, 106, 1188-1194.
- [47] N.J. Miller, C A. Rice-Evans, M.J, Davies, V. Gopinatan, A. Milner. A nouvel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status inprematue neonates. *Clinic Science*. **1993**, 84, 407-412.
- [48] N.J. Miller, J. Sampson, L.P. Candeias, P.M. Bramley , C.A. Rice-Evans. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, **1996**, 384, 240-242.

- [49] A. Cano, O. Alcaraz, M. Acosta, M. Arnao. On-line antioxidant activity determination: comparaison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS<sup>•+</sup> assay. *Redox Report*. 2002, 7, 103-10.
- [50] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, M. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **1999**, 26, 1231-1237.
- [51] K. Schlesier, M. Harwat, V. Böhm, R. Bitsch. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research*. **2002**, 36, 177-187.
- [52] L. Hedhili .Cours : les antioxydants dans les aliments. Institut Préparatoire aux Etudes d'Ingénieurs de Nabeul (Université du 7. Nov à Carthage). Tunisie.
- [53] R.L. Prior, H. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill, D. Huang, B. Ou, R. Jacob. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2003**, 51, 3273-3279 .
- [54] R.L. Prior, G. Cao. *In vivo* total antioxidant capacity: comparaison of different analytical methods, *Free Rad Bio Med*. **1999**, 27, 1173-1181.
- [55] I.F.F. Benzie, J.J. Strain. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. **1996**, 239, 70-76 .
- [56] M.S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature*. **1958**, 4617, 1199-1200.
- [57] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. **1995**, 28, 25-30.
- [58] a) O. Dangles, G. Fargeix, C. Dufour. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions*. **1999**, 2, 1387-1395. b) M. Roche, C. Dufour, N. Mora, O. Dangles .Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Organic Biomolecular Chemistry*. **2005**, 3, 423-430
- [59] V. Bondet, W. Brand-Williams, C. Berset . Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **1997**, 30, 609-615.

- [60] C. Dufour, E. da Silva, P. Potier, Y. Queneau, O. Dangles. Gallic esters of sucrose as efficient radical scavengers in lipid peroxidation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2002**, 50, 3425-3430.
- [61] P. Goupy, C. Dufour, M. Loonis, et O. Dangles. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2003**, 51, 615-622.
- [62] C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrani. Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Science and Technology International*. 1998, 4, 391-399.
- [63] R. L. Prior, X. Wu, et K. Schaich. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **2005**, 53, 4290-4302.
- [64] M.B. Arnao. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*. **2000**, 11, 419-421.
- [65] B. Ozcelik, J.H. Lee, D.B. Min. Effects of light, oxygen and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*. **2003**, 68, 487-490.
- [66] N.J. Miller, C.A. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. **1993**, 84, 407-412.
- [67] N.J. Miller, A.T. Diplock, C.A. Rice-Evans. Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1995, 43, 1794-1801.
- [68] P. Simonetti, P. Pietta, G. Testolin. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **1997**, 45, 1152-1155.
- [69] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **1999**, 26, 1231-1237.
- [70] D.D.M. Wayner, G.W. Burton, K.U. Ingold, S. Locke. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*. **1985**, 187, 33-37.
- [71] G. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. **1993**, 14, 303-311.
- [72] G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids:

- structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. **1997**, 22, 749-760.
- [73] G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **1996**, 44, 3426-3431.
- [74] H. Wang, G. Cao. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **1996**, 44, 701-705.
- [75] H. Wang, G. Cao. Oxygen radicals absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **1997**, 45, 304-309.
- [76] I.F.F. Benzie, J.J. Strain. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. **1996**, 239, 70-76.
- [77] P.T. Gardner, T.A.C. White, D.B. Mc Phail, G.G. Duthie. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, **2000**, **68**, 471-471.
- [78] C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto. Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1999**, 79, 1301-1304.
- [79] C.A. Rice-Evans and N.J. Miller. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions* . **1996**, 24, 790-794.
- [80] G. Cao , E. Sofic and R.L. Prior .Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44(11), 3426-3431.
- [81] R. Mahboub, F. Memmou. Antioxidant activity and kinetics studies of eugenol and 6-bromoeugenol. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. **2014**, DOI: 10.1080/14786419.2014.958738.
- [82] O. Ozcelik, J.H. Lee, D.B. Min. Effects of light, oxygen and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sc.* **2003**, 68, 487-490.
- [83] F. Sharififar, M.H. Moshafi, S.H. Mansouri, M. Khodashenas, M. Khoshnoodi. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* .**2007**, 18, 800-805.
- [84] L.R.C. Barclay, F. Xi, J.Q. Norris Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **1997**, **17**, 73-90.
- [85] J.S. Wright, E R. Johnson, G.A. Dilabio. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidant. *Journal of the American Chemical Society*. **2001**, 123, 1173-1183.

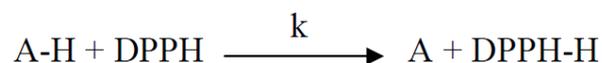
- [86] T. Ak, I. Gülçin. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* **2008**, 174, 27- 37.
- [87] M.S. Blois. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* **1958**, 181, 1199-1200.
- [88] F. Sharififar, B.G. Dehghn-Nudeh, M. Mirtajaldini. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chem.* **2009**, 112, 885-888.
- [89] C. Sanchez-Moreno, A. Larrauri Jose, F. Saura-Calixto. Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1998**, 76(2), 270-276.
- [90] S. Khoudali, D. Benmessaoud, A. Essaqui, M. Zertoubi, M. Azzi, M. Benaissa. Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc. *J Mater Environ Sci.* **2014**, 5 (3), 887-898.
- [91] R. Scherer, H.T Godoy. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* **2009**, 112, 654-658.
- [92] R. Scherer, HT. Godoy. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* .**2009**, 112, 654-658.
- [93] D. Villano, M.S. Fernandez-Pachon, M.L. Moy, A.M. Troncoso, M.C.García-Parrilla. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* .**2007**, 71, 230-235.
- [94] N. Nenadis, M. Tsimido. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) tests. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **2002**, 79(12), 1191-1195

### Annexe 1

#### Etude de la cinétique de la réaction entre un antioxydant et le DPPH [58,11]

L'antioxydant de stœchiométrie  $n$  est considéré comme un ensemble de  $n$  sous-unités antioxydantes fictives indépendantes (AH) qui transfèrent un seul atome d'hydrogène au DPPH• avec la même constante de vitesse biomoléculaire  $k$ . La constante de vitesse globale de transfert d'hydrogène  $k_1$  de l'antioxydant vers le DPPH• est égale à  $n$  fois la constante  $k$  [58,11]. Les courbes  $A_{515} = f(t)$  peuvent être traitées selon une loi cinétique d'ordre 2 avec  $[AH] = nC$  ; où  $[AH]$  et  $C$  sont les concentrations en sous-unités AH et en antioxydant. La valeur  $A_f$  correspond à l'absorbance de la solution relevée au bout de 15 min où l'on considère que la réaction est complète. La valeur de  $n$  peut ainsi être évaluée.

$C$  : concentration initiale en antioxydant, de  $n$  sous-unités antioxydantes AH,  $[AH] = nC$



$$(1) \quad \frac{d[DPPH]}{dt} = \frac{d[AH]}{dt} = -k[AH][DPPH]$$

$$(2) \quad [DPPH]_0 = \frac{A_0}{\varepsilon}$$

$$[AH] = [DPPH]_0 - [DPPH]_f = \frac{(A_0 - A_f)}{\varepsilon} \quad d'où \quad n = \frac{(A_0 - A_f)}{C\varepsilon} \quad (3)$$

A partir de la relation (1), on fixe  $[DPPH] = [DPPH]_0$  et on intègre la relation entre 0 min et  $t$  :

$$\begin{aligned} \frac{d[AH]}{[AH]} &= -k[DPPH]dt \\ \int_0^t \left( \frac{d[AH]}{[AH]} \right) &= - \int_0^t k[DPPH]_0 dt \\ (a) \quad \ln[AH] - \ln[AH]_0 &= \ln\left(\frac{[AH]}{[AH]_0}\right) = -k[DPPH]_0 \times t \end{aligned}$$

On repart de la relation (1) mais cette fois, on fixe comme constante la concentration en antioxydant. On intègre ensuite la relation entre 0 min et  $t$  :

$$\frac{d[DPPH]}{[DPPH]} = -k[AH]dt$$

$$\int_0^t \left( \frac{d[DPPH]}{[DPPH]} \right) = - \int_0^t k[AH]_0 dt$$

$$(b) \quad \text{Ln}[DPPH] - \text{Ln}[DPPH]_0 = \text{Ln}\left(\frac{[DPPH]}{[DPPH]_0}\right) = -k[AH]_0 \times t$$

On soustrait alors les relations (a) et (b) pour aboutir à la relation (4) :

$$(4) \quad \text{Ln}\left(\frac{[AH][DPPH]_0}{[AH]_0[DPPH]}\right) = ([AH]_0 - [DPPH]_0) \times k \times t$$

$$[AH] = [AH]_0 - [AH]_{\text{consommé}} = [AH]_0 - [DPPH]_{\text{consommé}} = nC - \frac{A_0 - A}{\epsilon}$$

$$[AH] = \frac{A_0 - A_f}{\epsilon} - \frac{A_0 - A}{\epsilon} = \frac{A - A_f}{\epsilon} \quad (5)$$

On reprend alors la relation (4) où l'on reporte la valeur de  $[AH]$  obtenue par la relation (5) :

$$\text{Ln}\left[\frac{(A - A_f) \times A_0}{nC A \epsilon}\right] = \text{Ln}\left[\frac{(A - A_f) \times A_0}{(A_0 - A_f) \times A}\right] = \text{Ln}\left[\frac{\left(1 - \frac{A_f}{A}\right)}{\left(1 - \frac{A_f}{A_0}\right)}\right] = ([AH]_0 - [DPPH]_0) \times k \times t$$

$$\text{Ln}\left[\frac{\left(1 - \frac{A_f}{A}\right)}{\left(1 - \frac{A_f}{A_0}\right)}\right] = \left(nC - \frac{A_0}{\epsilon}\right)kt = \left(\frac{A_0 - A_f}{\epsilon} - \frac{A_0}{\epsilon}\right)kt = -\left(\frac{A_f}{\epsilon}\right)kt$$

$$\text{Or } k = \frac{k_1}{n} \quad \text{avec } n = \frac{A_0 - A_f}{C\epsilon}$$

On reporte cette valeur dans l'équation précédente :

$$\text{Ln}\left[\frac{\left(1 - \frac{A_f}{A}\right)}{\left(1 - \frac{A_f}{A_0}\right)}\right] = -\left(\frac{A_f}{\epsilon}\right) \times \left(\frac{C\epsilon}{A_0 - A_f}\right)k_1 t = \frac{C}{\left(1 - \frac{A_0}{A_f}\right)} k_1 t$$

$$\text{On trace un nouveau graphique : } \text{Ln}\left[\frac{\left(1 - \frac{A_f}{A}\right)}{\left(1 - \frac{A_f}{A_0}\right)}\right] = f(t)$$

Ce graphique présente une partie linéaire pour  $t$  proche de zéro. Le coefficient directeur de cette droite permet de déterminer la valeur de  $k_1$ .

## Deuxième partie

Activité antimicrobienne



## **2.10. Activité antimicrobienne**

### **2.10.1. Généralités**

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classées parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires). Elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria.

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscope électronique [1].

### **2.10.2. Culture des bactéries**

On utilise habituellement pour cultiver les bactéries des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C. En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon [1].

### **2.10.3. Antibiotiques**

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes (le plus souvent des champignons). Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) [2].

#### **2.10.3.1. Classification des antibiotiques**

Il existe plusieurs classifications des antibiotiques, elles sont basées sur le spectre d'action, la cible, ou la famille chimique. Cette dernière celle-ci est la plus fréquemment rencontrée. Les principales familles chimiques des antibiotiques sont:  $\beta$ -lactamines: pénicilline et céphalosporines; Aminosides: streptomycine, gentamycine; Chloramphénicol et thiamphénicol; Cyclines: tétracyclines, doxycycline. Macrolides et apparentés : érythromycine, oléandomycine [3].

### **2.10.3.2. Activité antimicrobienne sur les extraits des plantes et les produits synthétiques**

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveau agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) [4, 5].

Beaucoup de groupes de chercheurs ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenouil (*Foeniculum vulgare*), menthe poivrée (*Mentha piperita*), thym (*Thymus vulgaris*), ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mai aussi contre les champignons, les levures et les virus [6].

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes, cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle [7].

### **2.10.3.3. Description des bactéries étudiées**

#### **2.10.3.3.a. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* est un bacille à gram négatif [8], de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$  [9].

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore

des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies [8].

#### **2.10.3.3.b. *Staphylococcus aureus***

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1  $\mu\text{m}$ . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré [8]. *S. aureus* représente la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée [9].

#### **2.10.3.3.c. *Pseudomonas aeruginosa***

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3  $\mu\text{m}$  de long et 0.5 à 0.8  $\mu\text{m}$  de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ». *P. aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3<sup>ème</sup> rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1<sup>er</sup> rang pour les infections pulmonaires basses et le 3<sup>ème</sup> rang pour les infections urinaires [10].

## 2.11. Résultats et discussions

### 2.11.1. Activité antimicrobienne (*in vitro*)

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part et sans exercer des effets délétères sur la santé humaine [4, 5]. De nombreux laboratoires de très haut niveau ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits (huiles essentielles de clou de girofle (sec) ou les produits synthétiques comme l'eugénol et ses dérivés). Ces extraits étudiés se sont avérés non seulement actifs contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus [6].

Certains chercheurs ont franchi une étape plus avancée, en isolant et identifiant les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes. Cette étape constitue une plateforme pour plusieurs applications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle [7].

#### 2.11.1.1 Sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Quatre antibiotiques standards sont testés sur 3 souches bactériennes gram (+) et gram (-). Nous observons que les différents types de souches réagissent différemment aux antibiotiques étudiés. Le **tableau 2.10** ci-dessous rapporte les valeurs en mm des zones d'inhibitions manifestées par les antibiotiques sur les différentes souches étudiées.

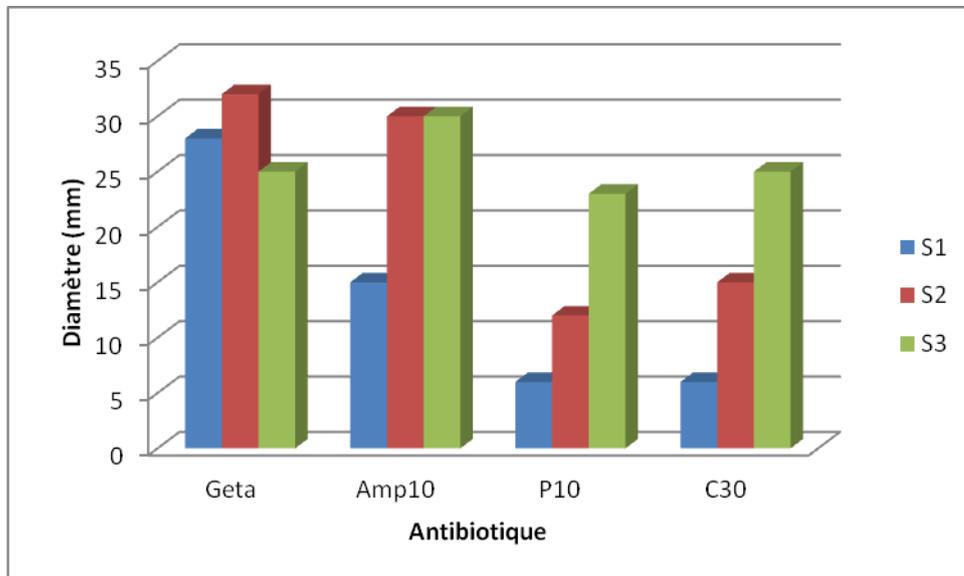
**Tableau 2.10:** Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

| Souches<br>(ATB)<br>Antibiotiques | <i>Pseudomonasaeruginosa</i><br>ATCC 27853 (S1) | <i>Escherichiacoli</i><br>ATCC25922<br>(S2) | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923 (S3) |
|-----------------------------------|---|---|---|
| Gentamicine :(Genta)(120µg)       | 28  | 32  | 25  |
| Ampicilline :(Amp10) (10µg)       | 15  | 30  | 30  |
| Pénicilline : P10 (6µg)           | 6   | 12  | 23  |
| Chloramphénicol :C30(30µg)        | 6   | 15  | 25  |

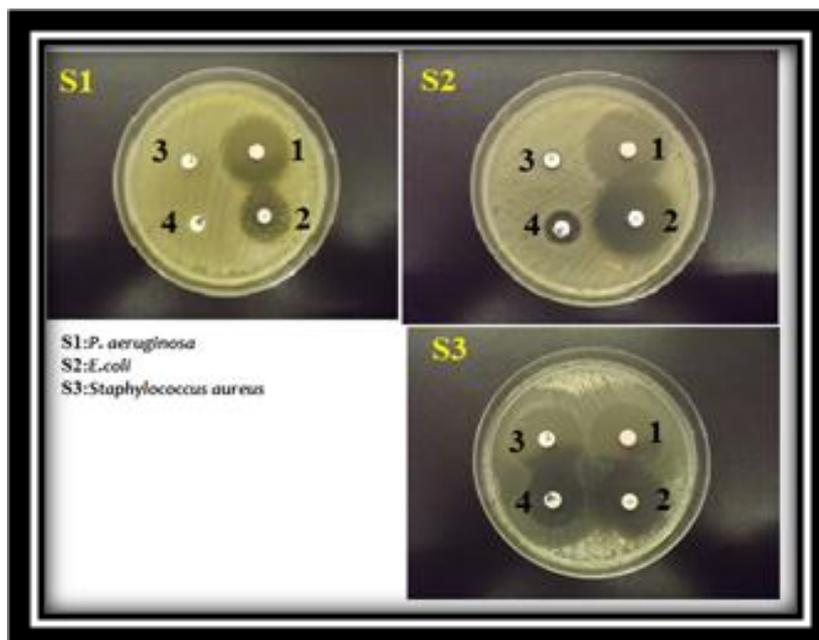
### 2.11.1.2 Test comparatif par antibiogramme

Les résultats de la technique de diffusion par disque en étudiant l'action des quatre antibiotiques suivants: Gentamicine, Ampicilline, pénicilline et chloramphénicol sur les différentes souches bactériennes (03) sont représentés dans la **Figure 2.34**.

Nous observons que les souches bactériennes réagissent différemment aux antibiotiques. Nous constatons que les souches testées présentent une zone supérieure à 15mm expliquant leur sensibilité aux antibiotiques. En revanche, la pénicilline et le chloramphénicol n'expriment aucune zone d'inhibition sur la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* (S1). Ce résultat révèle que la souche bactérienne est résistante à ces deux antibiotiques (figure 2.36).



**Figure 2.34** : Valeurs moyennes des diamètres du test d'antibiogramme. Genta : gentamicine, Amp10 : ampicilline, P10 : pénicilline et C30 : chloramphénicol. S1: *P. aeruginosa*, S2: *E.coli*, S3: *S. aureus*.



**Figure 2.35:** Zones d'inhibition obtenues par l'action des antibiotiques sur les souches testées. (1) : Gentamicine Genta, (2) : Ampicilline Amp10, (3) : Pénicilline P10 et (4) : Chloramphénicol C30.

### 2.11.1.3. Pouvoir antimicrobien

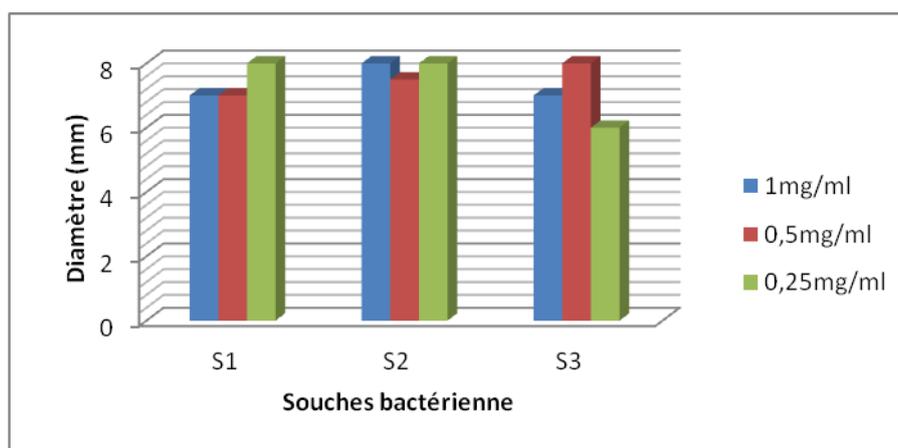
Il s'agit de déterminer le diamètre d'inhibition et la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La plus faible concentration se traduit par l'inhibition de la croissance visible des bactéries en utilisant la méthode du disque.

### 2.11.1.4 .Etude de l'effet antimicrobien par la méthode de disque

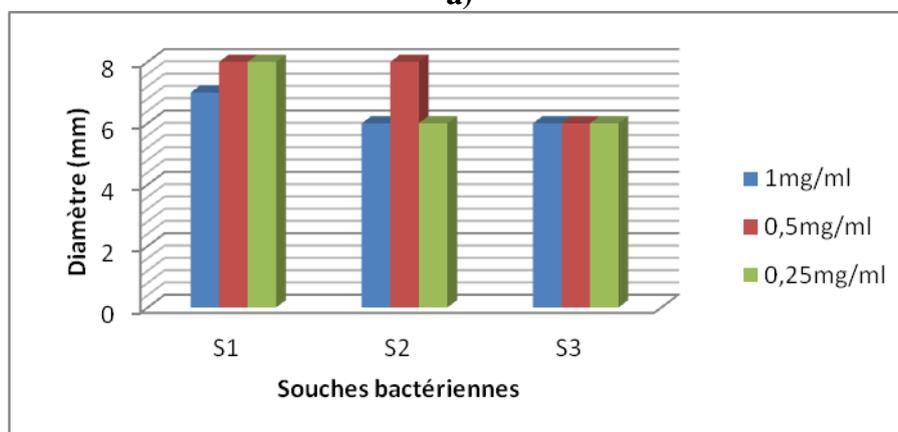
La méthode de disque a permis de déterminer l'action de l'huile essentielle du clou de girofle et les produits synthétiques (eugénol et ses dérivés) dissouts dans le DMSO sur les différentes souches. Celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des échantillons explique les variations de leurs compositions chimiques.

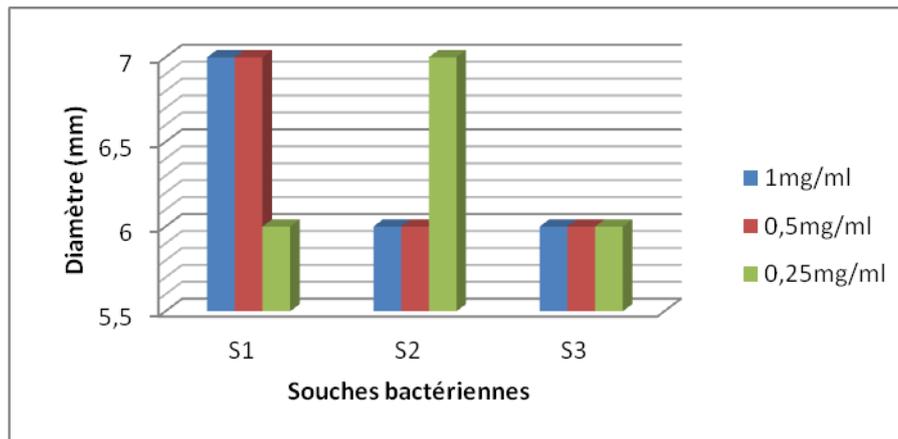
L'évaluation de l'activité antimicrobienne des composés suivants : l'huile essentielle extraite du clou de girofle, l'eugénol, l'acétate d'eugényle (source : eugenol et l'huile essentielle) et le 6-bromoéugénol, a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme). Celle-ci permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations des différents extraits en mesurant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne au tour des disques. Ces derniers représentent l'activité antimicrobienne maximale. Nous illustrons ces résultats dans les **figures 2.36**.



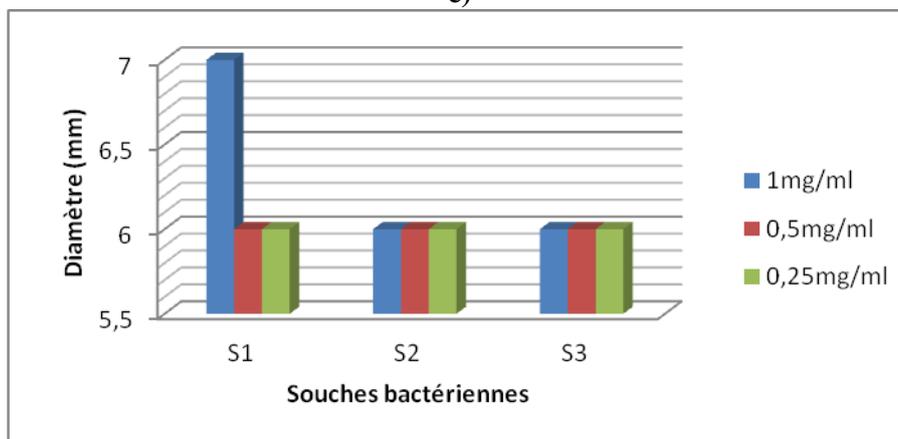
a)



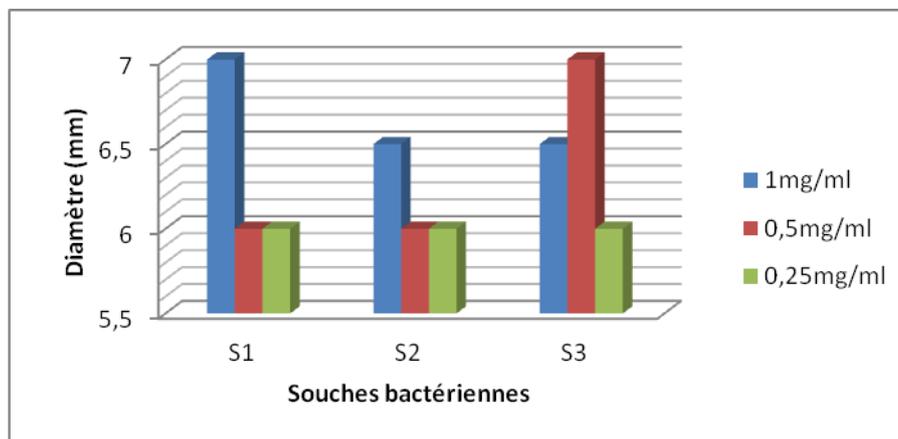
b)



c)



d)



e)

**Figure 2.36:** Valeurs moyennes des diamètres de l'activité antibactérienne de : a) l'huile essentielle extraite du clou de girofle (sec), b) l'eugénol, c) l'acétate d'eugénol (source eugénol commercial), d) l'acétate d'eugénol (source huile essentielle extraite du clou de girofle) et e) le 6-bromoéugénol. S1: *P. aeruginosa*, S2: *E.coli*, S3: *S. aureus*.

Les cinq échantillons : l'huile essentielle de clou de girofle, l'eugénol, l'acétate eugényle (source eugénol commercial et source l'huile essentielle de clou de girofle (sec)) et le 6-bromoéugénol, ont été testés afin d'évaluer leur activité antibactérienne *vis-à-vis* des trois souches bactériennes: *Pseudomonas aeruginosa* (S1), *Escherichia coli* (S2) et *Staphylococcus aureus* (S3). Les souches sélectionnées pour cette étude ont fait l'objet de confirmation de leurs identités par les différents tests microbiologiques (état frais, test de mobilité, coloration de gram, et galeries biochimiques). Le tableau ci-dessous rapporte les valeurs en mm des zones d'inhibitions (**Tableau 2.11**).

**Tableau 2.11:** AntibioGramme des germes étudiés en présence de différents échantillons : l'huile essentielle de clou de girofle, l'eugénol, l'acétate d'eugényle (eugénol et huile essentielle) et le 6-bromoéugénol (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

| <i>Souches</i><br><i>Echantillons</i>                                   | Concentrations<br>des échantillons | <i>Pseudomonas</i><br><i>aeruginosa</i><br>ATCC 27853<br>(S1) | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC25922(S2) | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923(S3) |
|---|------------------------------------|---|--|--|
| Huile essentielle de clou de girofle (sec)                              | C(1mg/mL)                          | 7mm   | 8mm                                      | 7mm  |
|   | C(0.50mg/mL)                       | 7mm   | 7.5mm                                    | 8mm  |
|   | C(0.25mg/mL)                       | 8mm   | 7mm                                      | 6mm  |
| Eugénol   | C(1mg/mL)                          | 7mm   | 6mm                                      | 6mm  |
|   | C(0.50mg/mL)                       | 8mm   | 8mm                                      | 6mm  |
|   | C(0.25mg/mL)                       | 8mm   | 6mm                                      | 6mm  |
| Acétate d'eugénol (source eugénol commercial)                           | C(1mg/mL)                          | 7mm   | 6mm                                      | 6mm  |
|   | C(0.50mg/mL)                       | 7mm   | 6mm                                      | 6mm  |
|   | C(0.25mg/mL)                       | 6mm   | 7mm                                      | 6mm  |
| Acétate d'eugénol (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec)) | C(1mg/mL)                          | 7mm   | 6mm                                      | 6mm  |
|   | C(0.50mg/mL)                       | 6mm   | 6mm                                      | 6mm  |
|   | C(0.25mg/mL)                       | 6mm   | 6mm                                      | 6mm  |
| 6-bromoéugénol  | C(1mg/mL)                          | 7mm   | 6.5mm                                    | 6.5mm  |
|   | C(0.50mg/mL)                       | 6mm   | 6mm                                      | 7mm  |
|   | C(0.25mg/mL)                       | 6mm   | 6mm                                      | 6mm  |

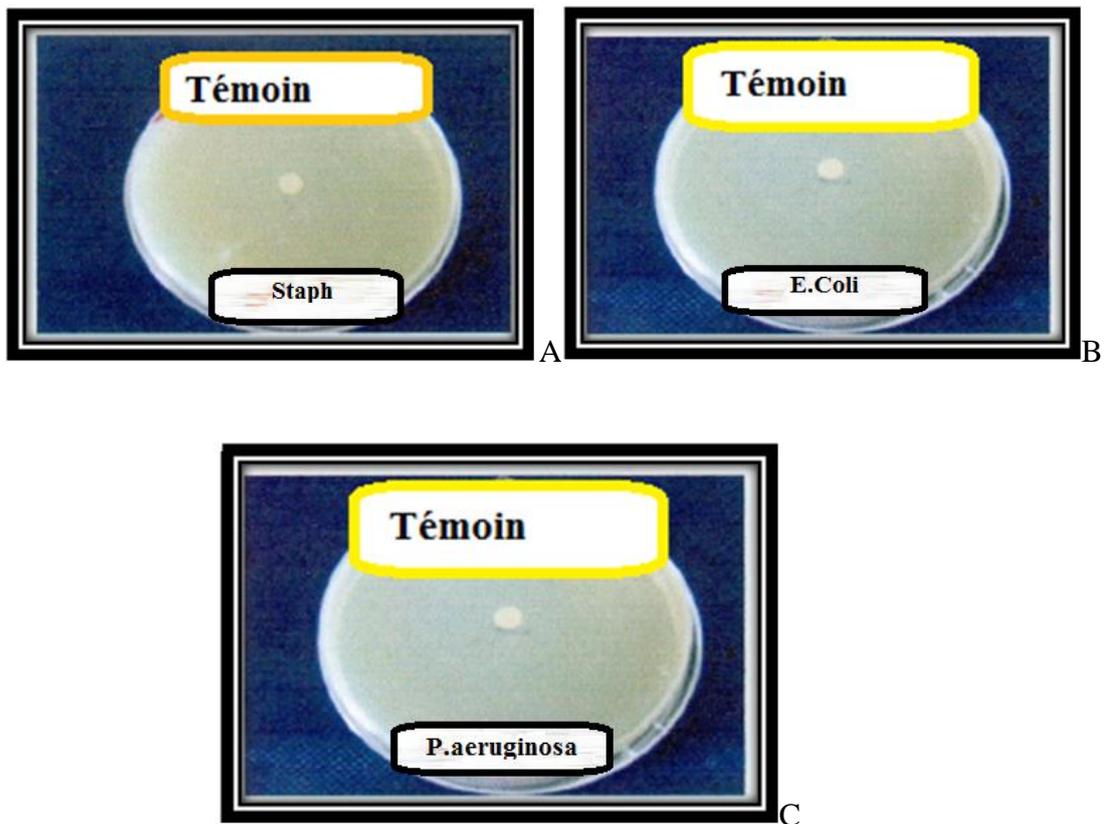
Tous les produits ont réagi positivement au moins à une des souches microbiennes testées. Ces résultats confirment que l'huile essentielle et les produits synthétiques (eugénol et ses dérivés) sont dotés de propriétés antimicrobiennes.

L'analyse des résultats de l'activité antibactérienne de : l'huile essentielle de clou de girofle (sec), l'eugénol, l'acétate eugényle (source eugénol commercial), l'acétate eugényle

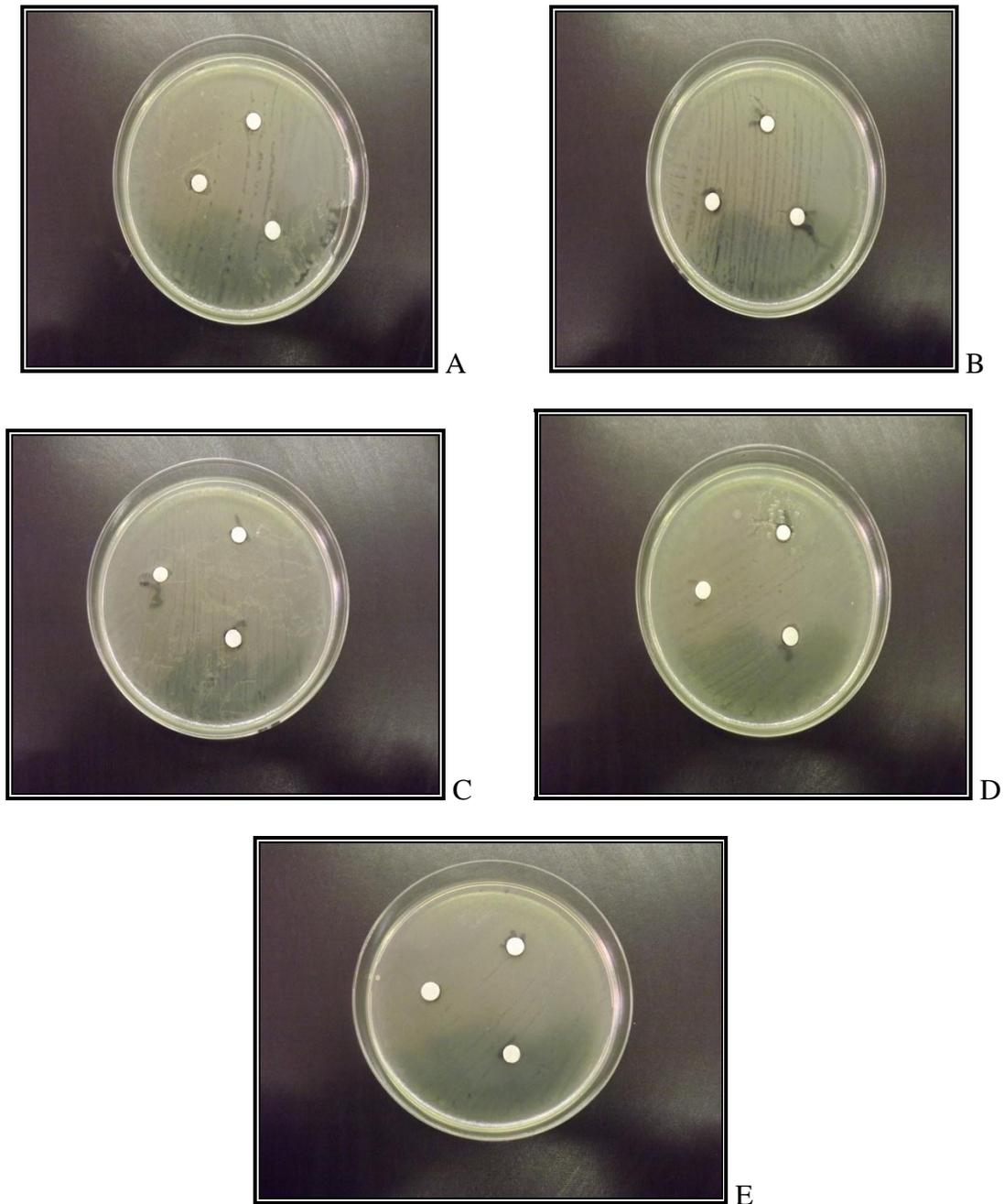
(source l'huile essentielle de clou de girofle (sec) et le 6-bromoéugénol, révèle que la majorité des souches ont été sensibles *vis-à-vis* de l'extrait testé avec différentes concentrations. Les diamètres obtenus sont variables de 6.5 à 8 mm (**figures 2.37**).

La souche de *Staphylococcus aureus* s'est révélé particulièrement la plus résistante pour tous les échantillons. Par ailleurs, la souche d'*Escherichia coli* est plus résistante que la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans le cas du 6-bromoéugénol, la souche d'*Escherichia coli* se révèle la plus résistante en comparant à la souche de *Staphylococcus aureus* et à la souche de *Pseudomonas aeruginosa*. Pour l'huile essentielle de clou de girofle (sec), nous avons remarqué que les trois souches testées (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) sont sensibles.



a)



b)

**Figure 2.37:** a) Zones d'inhibition obtenues par les trois témoins réalisés par la méthode de diffusion sur la gélose. A : *Staphylococcus aureus*, B : *Escherichia coli* et C : *Pseudomonas aeruginosa*. b) Effets des différents échantillons sur la *Pseudomonas aeruginosa* (S1) (Zone d'inhibition obtenue par méthode de diffusion sur gélose). A: Huile essentielle de clou de girofle (sec), B : Eugénol, C : Acétate d'eugéyle (source eugénol commercial), D : Acétate d'eugéyle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec) et E: 6-bromo-eugénol.

**2.11.1.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI a été déterminée pour les différentes souches microbiennes. La souche de *Staphylococcus aureus* ne montre aucune sensibilité pour l'eugénol, l'acétate d'eugényle (source eugénol commercial) et l'acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec)) ; par contre elle a été la plus sensible aux 6-bromoéugénol et l'huile essentielle de clou de girofle (sec) avec une CMI de 0.5 mg/mL. La souche *Escherichia coli* a été la plus sensible à l'huile essentielle de clou de girofle (sec), l'eugénol, l'acétate eugényle (source eugénol commercial) et le 6-bromoéugénol avec des CMI de 0.5 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL et 1 mg/mL respectivement. Cette souche ne montre aucune sensibilité pour l'acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec)). La souche *P. aeruginosa* montre une sensibilité très efficace et remarquable pour tous les extraits (l'huile essentielle de clou de girofle (sec), eugénol, acétate d'eugényle (source eugénol commercial), acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec) et 6-bromoéugénol) avec des CMI de 0.25 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL et 0.25 mg/mL respectivement (Tableau 2.12).

**Tableau 2.12:** Résultats de l'activité antibactérienne des différents échantillons (l'huile essentielle de clou de girofle (sec), l'eugénol, l'acétate d'eugényle (source eugénol commercial), l'acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec) et le 6-bromoéugénol (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

| Echantillon  | Souche  | Concentration minimale inhibitrice (CMI) (mg/mL) | Diamètre d'inhibition (mm) | Sensibilité | Surface d'inhibition (cm <sup>2</sup> ) | Coefficient d'activité A (cm <sup>2</sup> /μL) |
|--|---|--|----------------------------|-------------|---|--|
| Huile essentielle de clou de girofle (sec) 20μL    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (S1) | 0.25   | 8                          | Sensible    | 0.502                                   | 0.025  |
|  | <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 (S2)        | 0.5  | 7.5                        | Sensible    | 0.441                                   | 0.022  |
|  | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (S3)  | 0.5  | 8                          | Sensible    | 0.502                                   | 0.025  |
| Eugénol 20μL                                       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (S1) | 0.25   | 8                          | Sensible    | 0.502                                   | 0.025  |
|  | <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 (S2)        | 0.5  | 8                          | Sensible    | 0.502                                   | 0.025  |
|  | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (S3)  | /  | /                          | Résistante  | /                                       | /  |
| Acétate d'eugéyle (source eugénol commercial) 20μL | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (S1) | 0.5  | 7                          | Résistante  | 0.384                                   | 0.0192   |

|  |  |      |     |            |       |        |
|--|--|------|-----|------------|-------|--------|
|  | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC25922 (S2)        | 0.25 | 7   | Résistante | 0.384 | 0.0192 |
|  | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923 (S3)  | /    | /   | Résistante | /     | /      |
| Acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec) 20µL | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 (S1) | 1.00 | 7   | Résistante | 0.384 | 0.0192 |
|  | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC25922 (S2)        | /    | /   | Résistante | /     | /      |
|  | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923 (S3)  | /    | /   | Résistante | /     | /      |
| 6-bromoeugénol 20µL  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 (S1) | 1.00 | 7   | Résistante | 0.384 | 0.0192 |
|  | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC25922 (S2)        | 1.00 | 6.5 | Résistante | 0.331 | 0.0165 |
|  | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923 (S3)  | 0.5  | 7   | Résistante | 0.384 | 0.0192 |
| diméthylsulfoxyde (DMSO).Témoin  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 (S1) | /    | 6   | Résistante | /     | /      |
|  | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC25922 (S2)        | /    | 6   | Résistante | /     | /      |
|  | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923 (S3)  | /    | 6   | Résistante | /     | /      |

Le coefficient d'activité A est estimé par l'équation suivante donnée ci-dessous pour les souches bactériennes dont les zones d'inhibition sont importantes [11].

$$A = z' / q \text{ avec } z' = \pi (z^2 / 4).$$

Z' : la surface d'inhibition; q : la quantité de différents échantillons (en µL) et z : le diamètre d'inhibition (cm). (Le diamètre du disque de la gélose inclus (6mm)).

A partir du **tableau 2.12**, nous constatons que la valeur du coefficient d'activité A de la souche très sensible se rapproche de 1 et celle de la souche sensible de 0.025 tandis que la valeur de la souche résistante ne présente qu'une valeur < 0.0192.

Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées connues pour leurs faibles propriétés antibactériennes. Les terpènes hydrocarbonés sont d'ailleurs inactifs. En revanche, les molécules oxygénées inhibent la croissance de toutes les souches bactériennes testées. L'activité des molécules oxygénées dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules appartenant à des classes chimiques différentes ne produiront donc pas les mêmes effets selon les souches bactériennes testées. Les phénols sont décrits comme les composés les plus actifs du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle. Les composés carbonylés, fonctionnalisés par des groupements

aldéhydiques ou cétoniques, et les alcools sont également reconnus pour leurs propriétés antibactériennes [12].

#### **2.11.1.6. Conclusion**

Cette étude permet, encore une fois, la mise en valeur de l'exploitation de l'huile essentielle du clou de girofle dans les domaines, pharmaceutique et cosmétique. Par la même occasion, elle confirme leur utilisation comme conservateur dans le domaine médicale. Le 6-bromoéugénol a montré son efficacité comme agent antimicrobien vis-à-vis des trois composés testés (eugénol et les acétates d'eugényle).

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle ou synthétique biologiquement active. Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur l'activité antimicrobienne de ces composés.

Finalement nous pouvons dire que l'effet antibactérien de l'huile essentielle de clou de girofle (sec), l'eugénol, l'acétate d'eugényle (source eugénol commercial), l'acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec) et le 6-bromoéugénol est sous la dépendance de plusieurs facteurs, citant entre autre l'interaction du milieu de culture et les composés. Sachant que l'environnement microbien conditionne l'activité de l'agent microbien, qu'il s'agisse du milieu de culture dans lequel se développe l'expérience, du tissu au niveau duquel il agit, de l'objet ou du matériel qui doit être désinfecté.

## 2.12. Matériel et méthodes

### 2.12.1. Préparation des échantillons

- ➔ *Extraction l'huile essentielle de clou de girofle (sec)*

Voir Chapitre III

- ➔ *Synthèse de 6-bromoéugénol*

Voir Chapitre I

- ➔ *Synthèse acétate eugényle (source eugénol commercial) et acétate eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec))*

Voir Chapitre I

### 2.12.2. Test de l'activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des dérivés de l'eugénol et l'huile essentielle extraite du clou de girofle, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme). Celle-ci permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations des composés testés.

Notre travail consiste à étudier l'activité antibactérienne des dérivés de l'eugénol et l'huile essentielle de clou de girofle par les trois souches testées à savoir : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Ces espèces sont procurées par le laboratoire de LAMMABE (**Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'agroalimentaire, Au Biomédical et à l'Environnement**) de l'Université de Tlemcen. Les souches utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne des dérivés des dérivés de l'eugénol et l'huile essentielle du clou de girofle font partie de trois genres de microorganismes. Ce sont des souches référentielles de l'American Type Culture Collection (ATCC). Il s'agit de: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

**Tableau 2.13** : Souches bactériennes testées.

| Souches testées  |              | Origine                        |
|--|--------------|--------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Gram négatif | Laboratoire LAMAABE de Tlemcen |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923  | Gram Positif | Laboratoire LAMAABE de Tlemcen |

ATCC: American Type Culture Collection.

### 2.12.2.1. Confirmation des souches testées

La vérification des puretés des souches (**Tableau 2.14**) est basée sur :

- l'observation macroscopique des colonies (couleur, aspect et diamètre) et l'observation microscopique des bactéries (mobilité, forme et le mode de réarrangement) ;
- la coloration de Gram ;
- le test de la catalase et de l'oxydase.

**Tableau 2.14:** Résultats d'identification des souches testés

| Souches bactériennes          | Référence  | Caractères   |
|-------------------------------|------------|--|
| <i>Escherichia coli</i>       | ATCC 25922 | Bacille a coloration de Gram négatif, mobile, aéro-anaérobie facultatif, oxydase négative. |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 | Bacille fins à Gram négatif, non capsulés mobiles. aérobie strict. oxydase positive.       |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | ATCC 25923 | Cocco- bactérie Gram positif, catalase positive.   |

#### 2.12.2.1.a. Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

#### 2.12.2.1.b. Milieux de culture

Selon les méthodes utilisées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé les milieux suivants:

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes;
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents produits (voir annexe 2).

#### 2.12.2.1.c. Préparation d'inoculum

A partir d'une culture pure des bactéries sur milieu d'isolement (milieu gélose nutritive) ayant au maximum 24h, on racle à l'aide d'une pipette pasteur scellée quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite, on décharge la pipette pasteur dans 10 mL d'eau physiologique stérile et on homogénéise la suspension bactérienne; son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une DO égale à 0,08 à 0,10, lue à la longueur d'onde de 620 nm qui correspond à 10<sup>8</sup> UFC/mL [13].

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

#### **2.12.2.1.d. Aromatogramme**

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des dérivés d'eugénol et l'huile essentielle du clou de girofle (sec). Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible [14]. Placés dans une étuve à 37,5 °C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif. Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries de petits disques de papier buvard imprégné de différentes huiles essentielles à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence à 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des échantillons utilisées. L'aromatogramme représente un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques [15].

#### **2.12.2.1.e. Préparation de la suspension bactérienne**

Une colonie bien isolée issue d'une culture de 18-24 h a été introduite dans 5 mL d'eau physiologique contenue dans un tube à essai.

#### **2.12.2.1.f. Ensemencement**

Ensemencement avec la coton tige l'inoculum.

#### **2.12.2.1.g. Imprégnation des disques**

Les disques blancs de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 20 µL de la solution d'essai préparée au préalable. Les disques ont été placés dans des boîtes à pétri sur lesquelles ont été séchés.

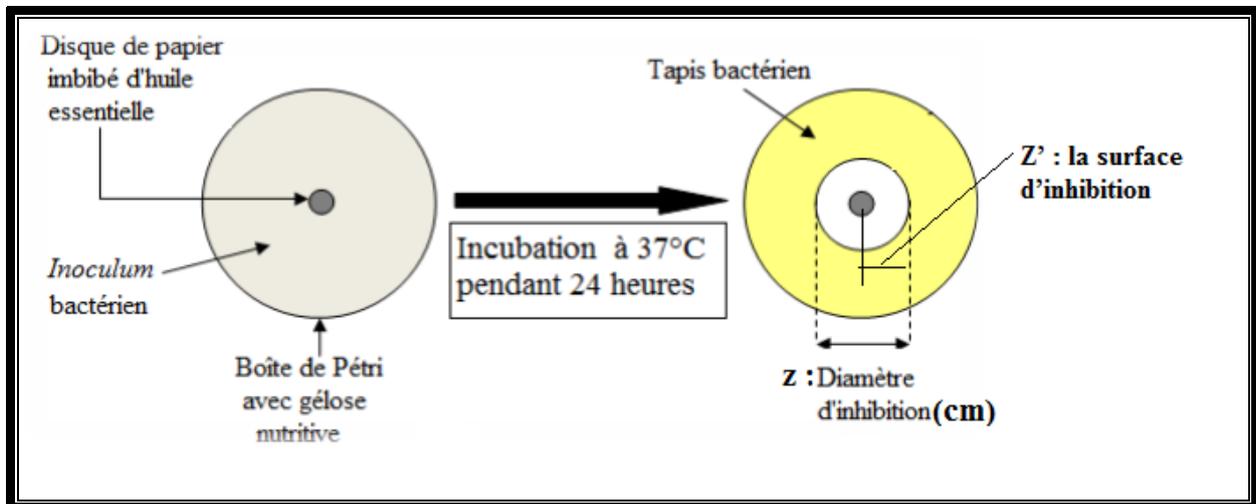
#### **2.12.2.2. Méthode de diffusion ou méthode des disques**

Cette méthode permet la mise en évidence de l'effet antibactérien des composés testés sur des bactéries, ainsi que la détermination de la résistance et la sensibilité de ces souches *vis-à-vis* des échantillons (les composés des dérivés de l'eugénol et l'huile essentielle du clou de girofle) étudiés. La technique utilisée est une modification de la méthode de Hayes et Markovic [16].

Le principe de cette technique est le même que celui du test d'antibiogramme, dont les disques sont chargés de l'extrait et déposés à la surface des milieux de cultures solides Muller Hinton et ensemencés par des espèces bactériennes bien déterminées.

L'échantillon à tester commence à diffuser dès son application sur le milieu de culture, et pour favoriser la croissance bactérienne, ces boîtes sont incubées dans l'incubateur pendant 24 heures à 37° C.

L'effet de l'échantillon sur la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une zone appelée «zone d'inhibition» dépourvue des bactéries. Le même principe est suivi pour le contrôle positif. Les antibiotiques utilisés sont : la gentamicine, l'ampicilline, la pénicilline et le chloramphénicol (**Figure 2.39**).



**Figure 2.39** : Principe de la méthode de diffusion par disque.

#### 2.12.2.2.a. Préparation des solutions

On Préparée une solution mère (1mg/mL de DMSO) de chaque échantillon (eugénol ,6-bromoéugénol, Acétate d'eugnyl, huile essentiel de clou de girofle (Sec)) à partir de cette solution mère on prépare différentes concentrations (0.5 et 0.25mg/mL) diluée dans le DMSO.

#### 2.12.2.2.b. Application du test

Des disques de 6 mm de diamètre préparés en papier wathman N°1, et autoclavés pendant 20 minutes à 120°C sont imprégnés de différentes solutions des extraits préalablement dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

À l'aide d'une pince stérile, les disques sont déposés à la surface d'un milieu ensemencé (étalé) par une suspension microbienne d'une densité optique de 0.5 Mc Farland. Après diffusion, les boîtes sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C. Après la période d'incubation, l'action des échantillons se révèle par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible [17]. Les disques imprégnés de DMSO ou d'éthanol sont aussi utilisés comme témoins (tests négatifs).

### 2.12.2.3. Expressions des résultats

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant -à l'aide d'une règle- le diamètre de la zone d'inhibition, déterminé pour les différentes concentrations des différents échantillons autour des disques [18,19]. Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues :  $\pm$  l'écart type (SD).

- 🌿 Non sensible (-) ou résistante : diamètre <7mm.
- 🌿 Sensible (+) : diamètre compris entre 8 à14mm.
- 🌿 Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à19mm.
- 🌿 Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20mm.

### 2.12.2.4. Concentration minimale d'inhibition des échantillons (CMI)

La CMI est définie comme la plus petite concentration d'échantillon pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin.

Une solution-mère de concentration de 1 mg/mL est obtenue par dissolution de 1mg d'échantillon dans 1ml DMSO. Afin de déterminer la CMI de chaque échantillon, des séries de dilutions sont préparées (0.5-0.25mg /mL). Les tests ont été répétés trois fois.

## ***Références bibliographiques***

- [1] a) C. Nauciel, J.L. Vildé. Bactériologie médicale. 2<sup>ème</sup> Ed. Masson. Paris. 2005, 5-10. b) K.C. Ong, H.E. Khoo. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life. Sci.* **2000**, 67, 1695-1705.
- [2] J.L. Elghozi, D. Duval. Pharmacologie, 2<sup>ème</sup> Ed Médecine Flammarion. Paris. **1992**, pp289.
- [3] Y. Cohen, C. Jacquot. Pharmacologie. 5<sup>ème</sup> Ed. Masson. Paris. **2001**, p350.
- [4] A. Garcia-Ruiz, B. Bartolomé, A.J. Martinez-Rodriguez, E. Pueyo, P.J. Martin-Alvarez, M.V. Moreno-Arribas. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control.* **2008**, 19, 835–841.
- [5] S. Kempf, Zeitouni. Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences Pathologie Biologie. **2009: article in press.**
- [6] R. Jürgen, S. Paul, S. Ulrike, S. Reinhard. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed.* **2009**, 16, 79–90.
- [7] G. Huang, J. Jiang, D. Dai. Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.* **2008**, 7 (9): 1335-1338.
- [8] B. Patrick, L. Jean, S. Michel. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1<sup>er</sup> Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. **1988**, pp100-108-274.
- [9] P. Steven, C. Rachel, E. Martha, H. Paul, S. Jane, W.J. Peter. Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. **2004**, pp71-132
- [10] C. Richard, M. Miredjian. Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucelle, Bordetella. 2<sup>ème</sup> édition. Ed Institut. Pasteur .Paris. **1995**, pp 42-43.
- [11] F. Haddouchi. A .Benmansour .Huiles essentielle, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Article de synthèse. Les technologies de laboratoire- N°8. Janvier-Février 2008.*
- [12] D. Kalemba, A. Kunicka . Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 813-829.
- [13] D. Gingras, R. Béliveau. Delphinidin a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis.* **2007**, 27(5), 989-996.

- [14] M.C. Pibiri. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *thèse de Doctorat, Lausanne, Canada*. **2006**, p : 177.
- [15] J. El amri, Kh. Elbadaoui, T. Zair, H. bouharb, S. Chakir, T. Alaoui. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*. **2014**, 82, 7481-7492.
- [16] A.J. Hayes, B. Markovic. Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chem Toxicol*. **2002**, 40, 535-543
- [17] Y.M. Choi, D.O. Noh, S.Y. Cho, H.J. Suh, K.M. Kim, J.M. Kim. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. **2006**, 39, 756-761.
- [18] S. Athamena. Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. *Mémoire de magister*. Université Batna. **2009**.
- [19] Z. Hellal. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). *Mémoire de magister en biologie*. Université Tizi-Ouzou. **2011**.

## Annexe 2

### MILIEUX DE CULTURE

#### Composition des principaux milieux de culture utilisés (g/L)

##### Milieux liquides

- **Eau physiologique stérile**

Chlorure de sodium(NaCl).....9g  
Eau distillée.....1000mL  
pH=7  
Stérilisation à 121°C/15mn.

##### Bouillon nutritive (BN)

Peptone.....10g  
Extrait de viande.....5g  
Chlorure de sodium.....5g  
pH .....7.2

Après l'addition de tous les ingrédients avec 1L répartir en tubes à essais (7à10mL).Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

##### Milieux Solides

- **Gélose Müller Hinton (M.H)**

Extrait de viande.....3g  
Hydrolysate acide de caséine.....17.5g  
Agar..... 18g  
pH.....7.4

Stérilisation à 121°C/15mn.

Après refroidissement , 5mL de l'additif Hektoen sont rajoutés à 225mL de la gélose Hektoen.

 **Gélose Nutritive (GN)**

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Peptone.....            | 10g     |
| Extrait de viande.....  | 3g      |
| Extrait de levures..... | 3g      |
| Chlorure de sodium..... | 5g      |
| Agar.....               | 18g     |
| pH .....                | 7.2±0.2 |

Stérilisation à 121°C/15mn

 **Gélose Hektoen**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Peptone pepsique de viande..... | 15g    |
| Extrait de viande.....          | 3g     |
| Extrait de levures.....         | 3g     |
| Lactose.....                    | 12g    |
| Salicine.....                   | 2g     |
| Saccharose.....                 | 12g    |
| Chlorure de sodium.....         | 5g     |
| Thiosulfate de sodium.....      | 5g     |
| Citrate de fer ammoniacal.....  | 1.5g   |
| Sels biliaires.....             | 4g     |
| Bleu de Bromothymol.....        | 0.064g |
| Fuchsine acide .....            | 0.1g   |

# CHAPITRE 3

# Chapitre 3

Propriétés de quelques huiles essentielles.  
Composition de l'huile essentielle extraite du clou  
de girofle.

### **3. Huiles essentielles**

#### **3.1. Introduction**

Historiquement, les plantes ont été une source d'inspiration pour des nouveaux composés médicamenteux, comme les médicaments dérivés des plantes ont apporté une importante contribution à la santé humaine. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2008, plus de 80% de la population mondiale repose sur la médecine traditionnelle pour leurs besoins de soins de santé primaires [1]. Presque toutes les cultures et les civilisations de l'Antiquité à nos jours ont dépendent entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, l'accessibilité, la disponibilité, la faible toxicité et d'acceptabilité. Donc les plantes sont capables de produire des substances naturelles très diversifiés. En effet, à coté des métabolites primaires, ils accumulent des métabolites dits secondaire parmi lesquels, les huiles essentielles très utilisées par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [2].

#### **3.2. Définition**

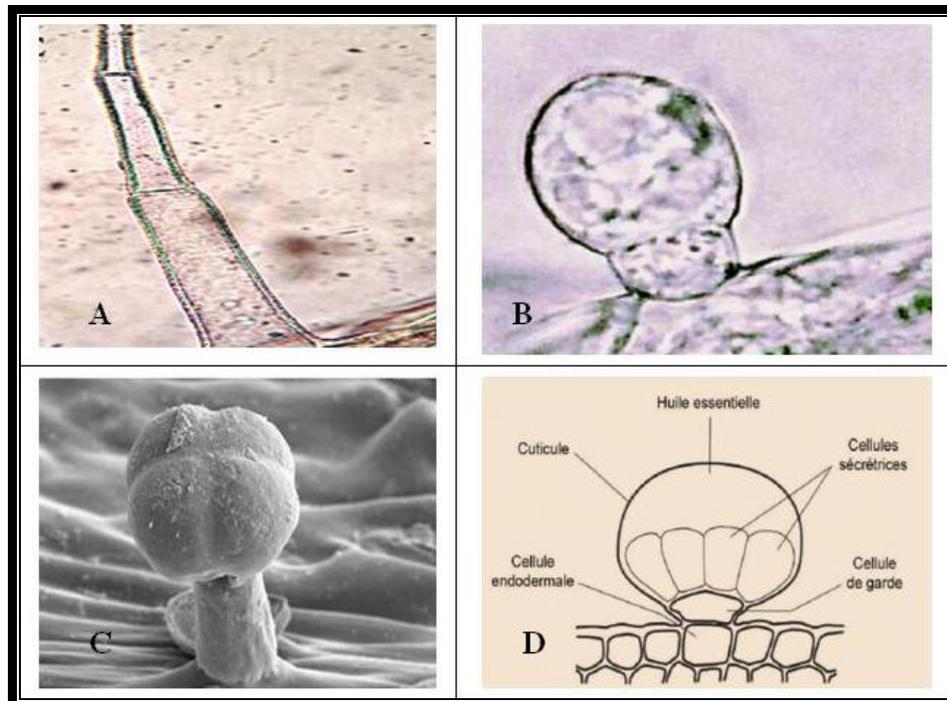
Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Les huiles essentielles (HES) sont extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels que l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) [3, 4]. Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.). Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, soit dans les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rosier), soit dans les sommités fleuries (tagète, lavande), soit dans les feuilles (citronnelle, eucalyptus), ou dans l'écorce (cannelier), ou dans les racines (vétiver), ou dans les fruits (vanillier), ou dans les graines (muscade) ou encore autre part dans la plante [5]. Le terme « huile » s'explique par la propriété que présente ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante.

### 3.3. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les HES peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, rhizomes, fruits et graines. La synthèse et l'accumulation des HES sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (**Figure 3.1**). Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaceae ou Asteraceae). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes [6].

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air [3, 5].

Les trichomes glandulaires sont les formes les plus répandues. Ils représentent à la fois le site de biosynthèse et de stockage des HES [7,7'].



**Figure 3.1.** Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. (A) : poil sécréteur de *Mentha pulegium*, (B) : trichome glandulaire de *Mentha pulegium*, (C) : trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* et (D) : structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris* [7- 8].

### 3.4. Rôles et propriétés des huiles essentielles

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs [9].

De plus, en règle générale, les huiles essentielles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes. Les substances émises sont dans ce dernier cas appelées « phytoalexines ». Ce type de toxine n'est produit qu'en cas d'infection et n'entre donc pas dans la composition d'une huile essentielle provenant d'une plante saine [10].

La sauge *Salvia leucophylla* libère quant à elle des substances dans l'atmosphère tels que le cinéole, le camphre et d'autres composés voisins afin d'inhiber la germination et le développement d'espèce prairiale en concurrence. Ces composés agissent par absorption dans un sol sec [11].

L'intérêt pour les produits naturels dans l'alimentation et dans l'industrie pharmaceutique est grandissant [12]. Ainsi, les chercheurs ont réalisé une expérience visant à mettre en évidence les propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes de plusieurs huiles essentielles [6].

### 3.5. Composition chimique

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable [13]. Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques et peuvent comporter plus de soixante composants différents, dont deux ou trois sont des composants majeurs constituant 20 à 70 % du mélange comparativement aux autres qui se trouvent le plus souvent sous forme de traces [14]. A titre d'exemple, le carvacrol et le thymol sont les composants majeurs de l'huile d'*Origanum compactum*, le linalol pour l'huile de *Coriandrum sativum*, le menthol et le menthone pour l'huile de *Mentha piperita*, et l'eugénol pour l'huile de *Eugenia caryophyllata*. Généralement ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques de l'huile essentielle [15]. Donc sur le plan chimique, les HES sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles apparentant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (mycènes,  $\beta$ -pinene etc.) et les sesquiterpènes ( $\beta$ -caryophyllène etc.) [16,6].

La plupart des composants des HES sont inclus dans deux groupes :

- ❖ le groupe de terpénoïdes;
- ❖ le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (les phénylpropanoïdes). Les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées [17, 18].

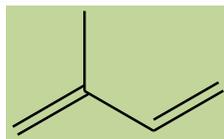
D'après Pibiri *et al* [14], la structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés.

Selon Mailhebiau *et al.* [19,6], cette structure varie en fonction :

- ❖ Du nombre d'atomes de carbone qui la constituent:
  - Les monoterpènes;
  - Les sesquiterpène ;
  - Rarement les diterpènes.
- ❖ Du caractère saturé ou insaturé des liaisons;
- ❖ De leur agencement : linéaire ou cyclique;
- ❖ De la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...);
- ❖ De la nature des groupes fonctionnels à savoir :
  - Terpènes :  $R_1\text{-HC=CH-R}_2$  ;
  - Alcools terpéniques :  $R\text{-OH}$  ;
  - Cétones :  $R_1\text{-CO-R}_2$  ;
  - Phénols :  $C_6H_5\text{-OH}$  ;
  - Aldéhydes :  $R\text{-CHO}$  ;
  - Esters :  $R_1\text{-COO-R}_2$  ;
  - Ethers :  $R_1\text{-O-R}_2$ .

### 3.5.1. Terpénoïdes

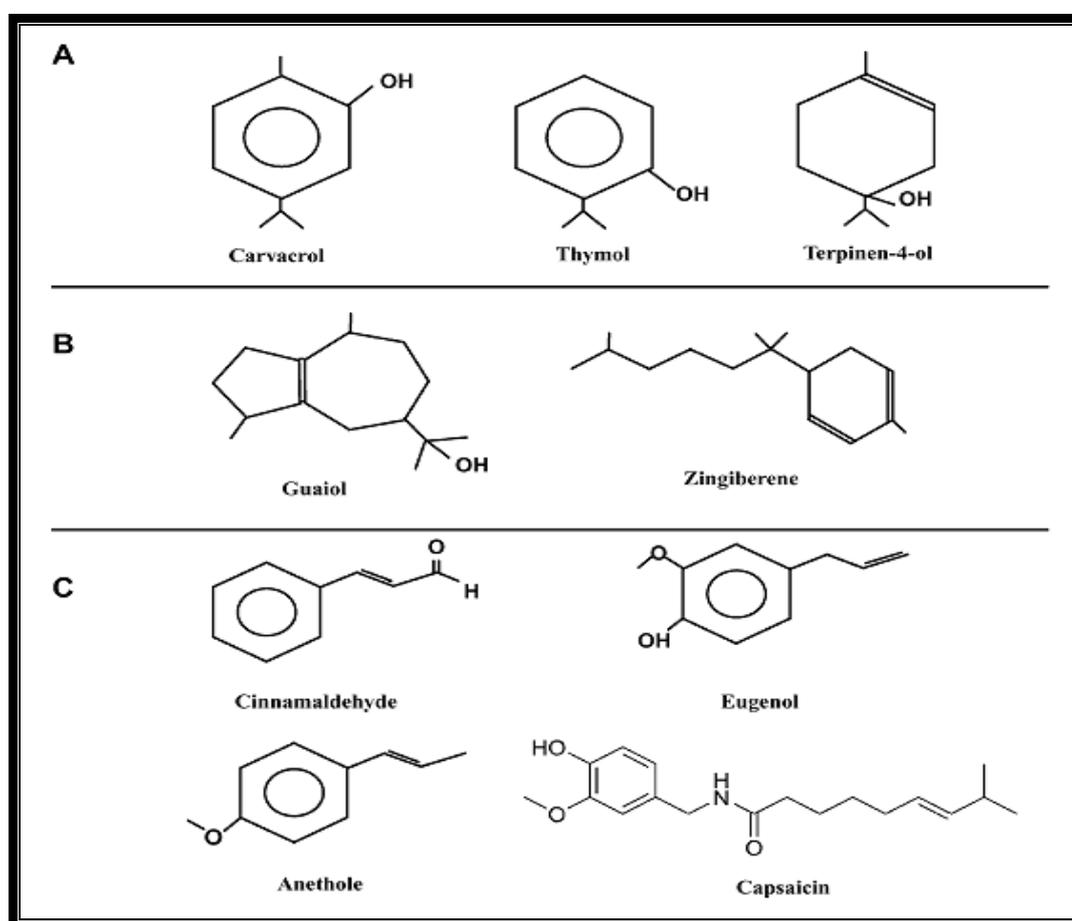
Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires, végétaux, plus de 15.000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones ( $C_5H_8$ ), communément appelée isoprène (**Figure 3.2**). Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes ( $C_{10}$ ), sesquiterpénoïdes ( $C_{15}$ ) et diterpénoïdes ( $C_{20}$ ). Dans la composition de la plupart des huiles essentielles les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie [18, 20,7'].



**Figure 3.2.** Structure de la molécule d'isoprène [18].

### 3.5.2. Phénylpropanoïdes

Ils sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Néanmoins, certaines plantes possèdent ces composés avec des proportions significatives. Les phénylpropanoïdes dérivent majoritairement de la phénylalanine. Ils sont constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones (**Figure 3.3**) [21,7'].



**Figure 3.3.** Structure de quelques composés des huiles essentielles (A) : monoterpénoïdes, (B) : sesquiterpénoïdes et (C) : phénylpropanoïdes [21,7'].

### 3.5.2.1. Notion de chémotype

Le chémotype d'une HE est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'HE. C'est l'élément qui permet de distinguer des HES extraites d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les HES pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgais*, *Manthospicoto*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les HES de chémotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables [14].

### 3.6. Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène [3, 22].

Les principales caractéristiques sont :

- ❖ Liquides à température ambiante ;
- ❖ N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- ❖ Volatiles et très rarement colorées ;
- ❖ Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- ❖ Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, Cependant, une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- ❖ Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;
- ❖ Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- ❖ Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux. Il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

### 3.7. Caractéristiques économiques

Si de nos jours quelques centaines de plantes aromatiques, parmi d'innombrables espèces recensées dans la nature, sont exploitées à l'échelle commerciale, c'est en partie

Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle

---

parce que les facteurs agronomiques, climatiques, botaniques et olfactifs sont limitatifs mais d'autres critères sont aussi à prendre en compte.

### **3.8. Caractéristiques traditionnelles**

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et infusions mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par nos ancêtres.

Une relation entre la structure chimique et l'activité biologique est alors tentante. La production de molécules naturelles pourrait entrer dans la composition de médicaments moins agressifs vis-à-vis de l'organisme, ou à des fins industrielles précédemment exposées. Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des plantes aromatiques, (autrefois restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives), par l'exploitation des nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle. Ce dernier travail fait apparaître des molécules « bioactives » dans des espèces référencées par la médecine traditionnelle supposant ainsi des activités biologiques [23].

### **3.9. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles**

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

- ❖ Facteurs intrinsèques liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat) et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée.

- ❖ Facteurs extrinsèques liés à la méthode d'extraction [24,6].

#### **3.9.1. Facteurs intrinsèques liés à l'espèce**

Les cellules productrices d'huile essentielle pouvant se situer dans différents organes, il est possible d'obtenir différentes huiles selon les parties sélectionnées d'une même plante. Ainsi les huiles essentielles extraites à partir des baies et des feuilles de piment ne sont pas identiques [90].

Les travaux de Maffei et *al* ont montré des différences de composition des huiles essentielles en raison d'organes différents (feuilles et fleurs) et de sous-espèces différentes [25].

Le stade végétatif au moment de la récolte est un facteur déterminant pour le rendement et la composition de l'huile essentielle des plantes de *Lavandula* obtenus par clonage [26].

### 3.9.2. Facteurs extrinsèques liés à la méthode

Huang et *al.* ont montré l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles [27].

Le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. Fantino et *al* [26] a noté des pertes considérables d'huile essentielle lors d'un stockage prolongé au congélateur, mais peu d'évolution de la composition.

Par ailleurs le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier la composition de ces huiles. D'après Carette et *al* [28], les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car, avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître.

D'autres travaux ont mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première [29].

### 3.10. Toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée [6]. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées [14].

Certains auteurs se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent [30, 31].

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxiques selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande [32]).

### **3.11. Activités biologiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, antioxydantes, et antiparasitaires [6]. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses [33].

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires [34].

#### **3.11.1. Activité antioxydante**

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir [35].

Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation [36]. En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène etc [37].

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation [38,6].

#### **3.11.2. Activité antibactérienne**

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HES, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [39]. De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HES sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules [40,6].

Le mode d'action des HES dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane [39, 41].

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée [42]. Les HES peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, ARN, des protéines et des polysaccharides [43].

Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides pariétales grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable [44,6].

### **3.12. Méthodes d'extraction et d'identification des composés des huiles essentielles**

#### **3.12.1 Méthodes d'extraction**

Le procédé d'obtention des HES intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique [45]. Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. Cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants, celle la plus utilisée étant la distillation par entraînement à la vapeur. L'extraction des huiles essentielles peut être réalisée à partir des fleurs, des feuilles, des racines ou encore des graines de la plante [6].

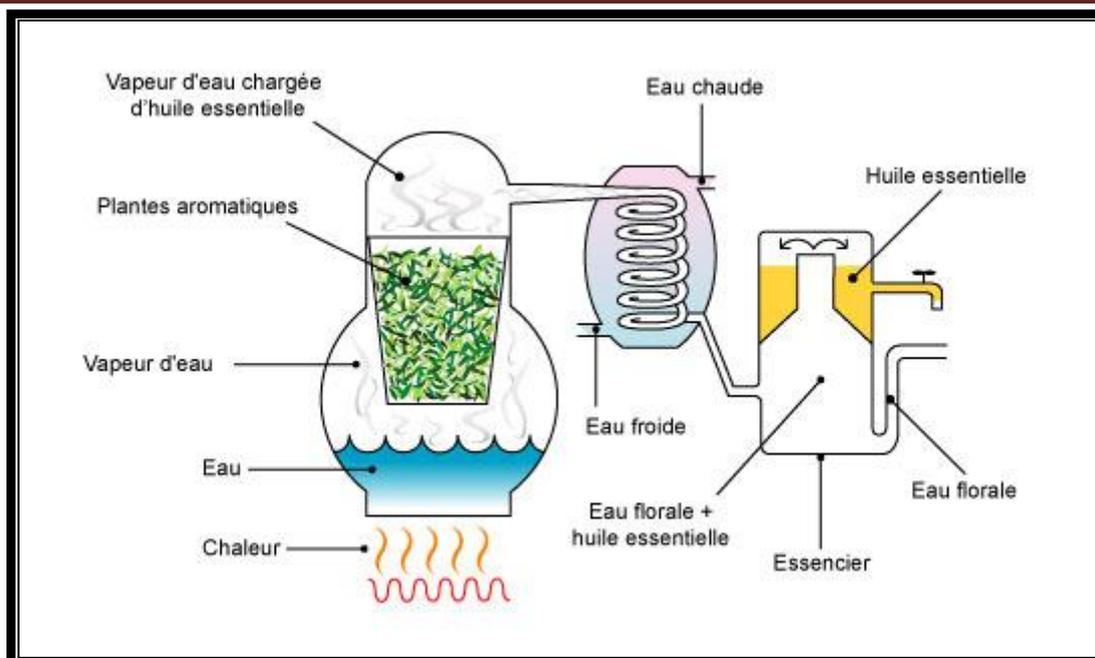
##### **3.12.1.1. Distillation**

Selon Piochor, il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau [46].

La conception de la distillerie, la capacité, la pureté de l'eau, le débit d'écoulement, les températures opératoires et la durée de distillation sont des points importants et peuvent affecter la composition et la qualité de l'huile.

##### **3.12.1.1.a. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau**

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic (**Figure 3.4**) [35].



**Figure 3.4 :** Montage de distillation par entraînement à la vapeur d'eau de d'huile essentielle [35].

### 3.12.1.1.b. Principe de l'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles

Le procédé, correspondant à une distillation hétérogène, met en jeu l'application de deux lois physiques [47, 48].

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

$$P_T = T_H + T_E$$

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

$$\frac{\text{Mole H}}{\text{Mole E}} = \frac{T_H}{T_E}$$

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

$$R = \frac{T_H}{T_E} * \frac{M^{\circ}_H}{M^{\circ}_E} = \frac{P_H}{P_E}$$

H et E désignent respectivement l'huile essentielle et l'eau

PT= Pression totale

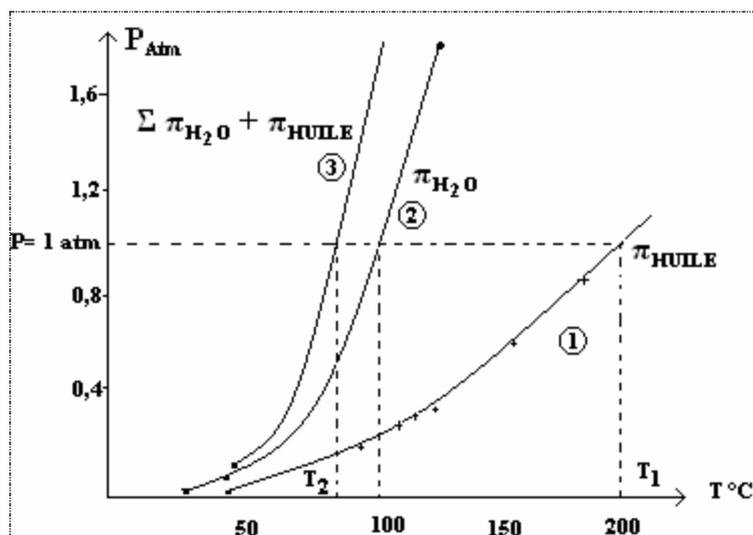
T= Tension de vapeur

M°=masse molaire

P= poids

R= rapport d'entraînement

La température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeurs de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation. Elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange eau/huile essentielle distillée possède une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique (généralement proche de 100°C en raison de la faible tension des constituants odorants) alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. La **figure 3.5** montre l'évolution de la température de co-distillation d'un mélange hétérogène d'eau et d'huile essentielle [49,50].

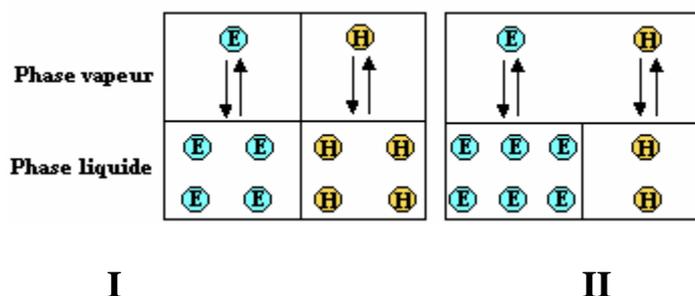


**Figure 3.5** : Evolution des températures de distillation de l'eau et l'huile essentielle, et du mélange eau/huile essentielle en fonction de la pression du milieu [49,50].

Pendant l'entraînement à la vapeur, les liquides non miscibles semblent distiller simultanément comme s'il s'agissait de deux compartiments séparés bien qu'en pratique, ils

Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle

soient mêlés. Or leurs vapeurs constituent un gaz homogène. On parle alors de co-distillation [47]. Dans les deux cas, représentés dans la **figure 3.6**, la pression partielle de l'eau est égale à celle de l'huile ( $P^{\circ}_E = P^{\circ}_H$ ), nous avons respectivement :



**Figure 3.6** : Répartition de l'eau (E) et de l'huile essentielle (H) entre les phases liquide et vapeur en fonction de la pression lors de l'hydrodistillation [47,50].

Phase liquide : mole d'eau = mole d'huile mole mole d'eau > mole d'huile

Phase vapeur : mole d'eau = mole d'huile mole d'eau = mole d'huile

La pression totale ( $P_T$ ) est indépendante des quantités d'eau et d'huile :

$$P_T = P^{\circ}_E + P^{\circ}_H$$

Où  $P^{\circ}$  désigne la pression partielle.

Les inconvénients de cette technique sont :

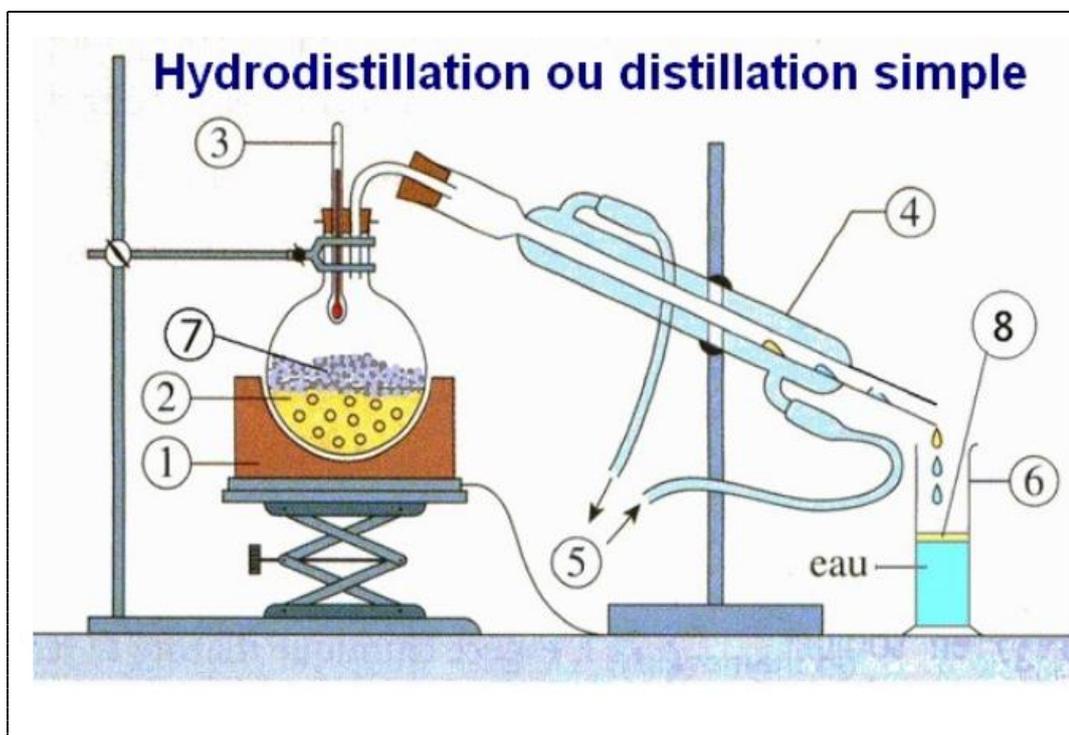
- ✚ Extraction lente (2h à 12h) et donc une consommation d'énergie.
- ✚ Si la matière première est sèche on peut avoir un ralentissement d'extraction.

### 3.12.1.1.c. Extraction par Distillation à l'eau ou hydro distillation d'huile essentielle

Ce mode d'extraction a été proposé par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe de l'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal traité (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition pendant 6h. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (**Figure 3.7**) [3,51].



a)



1-Chauffe ballon

2-Ballon

3-Thermomètre

4-Réfrigérant

5-Entrée et sortie d'eau

6-Erlenmeyer

7-Matière à extraire l'essence

8-La couche d' H.E

b)

**Figure 3.7 :** Montages de l'hydrodistillation pour l'extraction de l'huile essentielle. a) réalisé au laboratoire ; b) pris littérature [51].

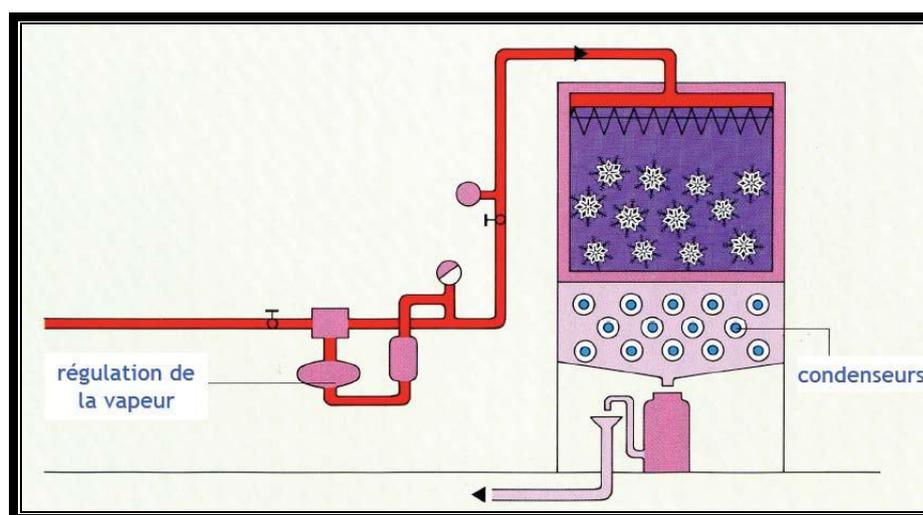
Le chauffage direct peut provoquer des points de surchauffe, ce qui provoque des changements qualitatifs et quantitatifs.

Hydro distillation et distillation par entraînement à la vapeur d'eau saturée restent les techniques les plus adoptées pour l'extraction des huiles essentielles.

#### 3.12.1.1.d. Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale (**Figure 3.8**).

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins nuisible pour les composés volatils. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur [56,57].



**Figure 3.8** : Schéma du procédé d'hydrodiffusion [56,57].

#### 3.12.1.2. Expression à froid

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices [58].

### 3.12.1.3. Extraction par solvants organiques

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone [59-61].

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient [4] :

- ❖ Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau
- ❖ Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilué
- ❖ Des teintures ou solutions non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- ❖ De résinoïdes ou extraits éthanoliques concentrés

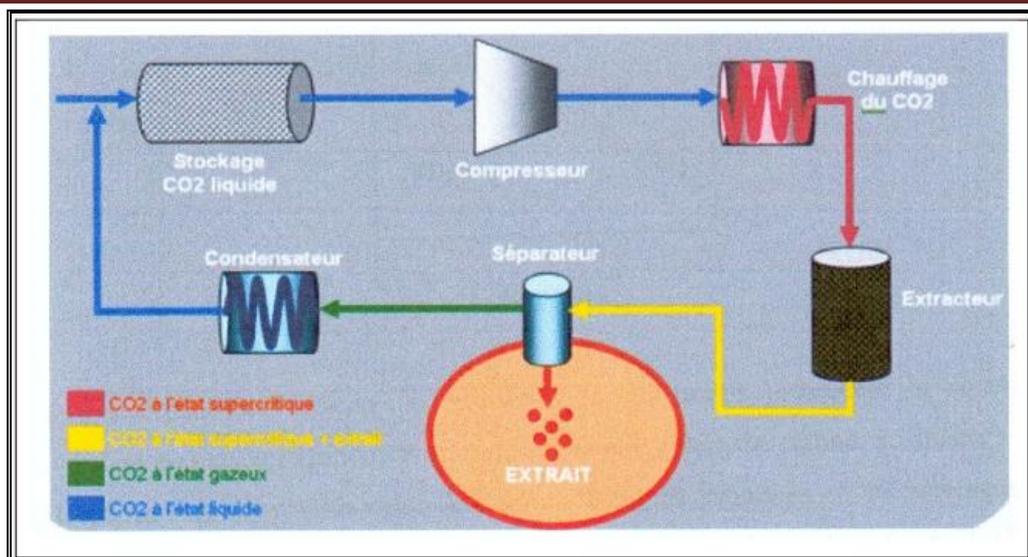
L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement [58].

### 3.12.1.4. Extraction par fluide à l'état supercritique

L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique met en œuvre généralement le dioxyde de carbone [59]. D'autres travaux de recherche [60-63] montrent l'utilisation de l'eau dans son état supercritique. Dans ce système, le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un compresseur et d'un détendeur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus, les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité de CO<sub>2</sub> (Figure 3.9) [46].

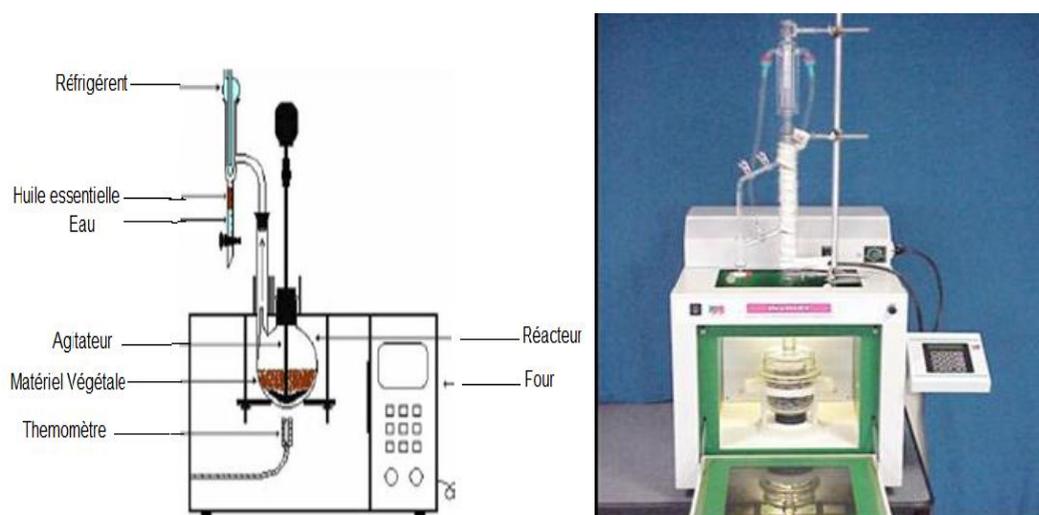
Le frein du développement de cette technologie est le coût élevé des appareillages lié à l'application de pressions de plusieurs centaines de bars [46].



**Figure 3.9:** Montage d'extraction par fluide à l'état supercritique d'huile essentielle [51].

### 3.12.1.5. Extraction assistée par micro-ondes

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles (**Figure 3.10**). Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-onde dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, l'utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé [64,51].



**Figure 3.10:** Montage d'extraction assistée par micro-onde [50].

### 3.12.2 Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles

Selon la Pharmacopée Française et Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants [14].

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique.

#### 3.12.2.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative [65]. L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte [66].

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé [67].

#### 3.12.2.2 Couplage chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence [68, 69]. Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes [70, 51,6].

➤ **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ ;

➤ **Accélération** : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.

➤ **Séparation** : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge ;

Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle

- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées ;
- **Traitement du signal** : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

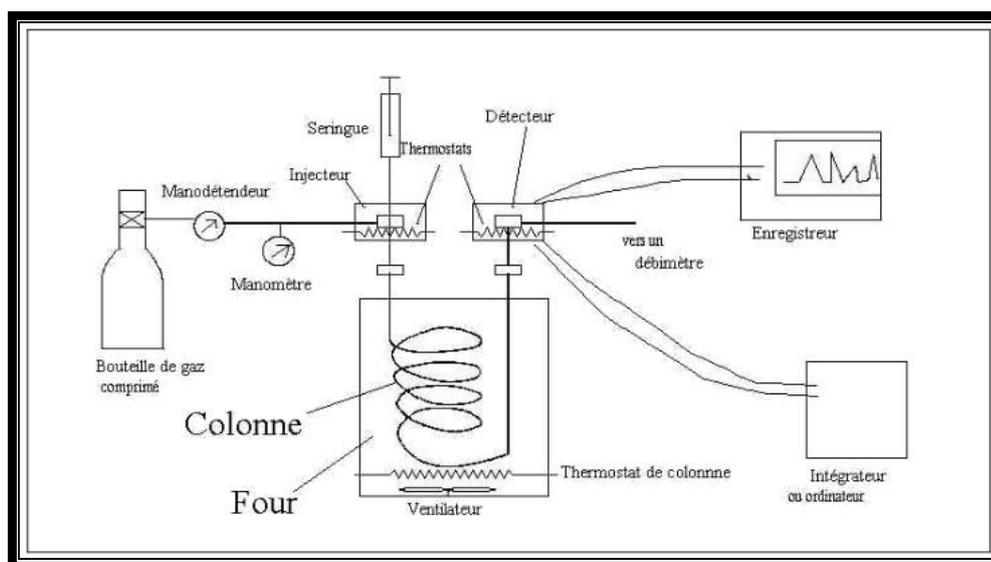


Figure 3.11: Chromatographie en phase gazeuse(CPG) [51].

### 3.13. Clou de girofle

#### 3.13.1. Histoire et présentation

Ce que l'on a coutume de rencontrer sous le nom de clou de girofle sont les bourgeons séchés d'un arbre tropical : le giroflier ou *Eugenia Caryophyllata* de la famille des Myrtacées et un arbuste cultivé à Madagascar, en Indonésie et en Afrique. C'est un bel arbre de 12 à 15 m de haut, exigeant un climat doux et humide. Le bouton floral (clou de girofle) à odeur caractéristique et à saveur chaude et piquante. Le clou de girofle est une épice utilisée en cuisine [71].



a)



b)



c)



d)

**Figure 3.12:** Illustrations du Giroflier et des clous de girofle. a) giroflier, b) fleurs fraîches de girofle, c) clou de girofle (sec), et d) graines de girofle

Dès le III<sup>ème</sup> siècle av JC, le clou de girofle est connu par les Chinois pour ses propriétés médicinales. Jusqu'au Moyen Age où il servira à la conservation des aliments, il sera utilisé en raison de ses vertus médicinales et sa rareté en fait un véritable trésor. A partir

Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle

---

du XV<sup>ème</sup> siècle la culture du giroflier, réalisée sur les Moluques (archipel Indonésien), fut très réglementée de façon à maintenir élevé le prix de cette épice. Ca ne sera qu'à partir de 1773 que Pierre Poivre, botaniste français, réussira à acclimater l'arbre à des climats plus tempérés et permettra la démocratisation de l'épice [72].

Les bourgeons sont récoltés à maturité juste avant l'épanouissement de la fleur. Ils sont ensuite dégriffés (séparation du bouton du pédoncule) puis séchés au soleil ce qui les fait passer d'une couleur brun roux à brun foncé. Les récoltes ont lieu habituellement deux fois par l'an, de juillet à octobre puis en décembre. Actuellement, l'Indonésie reste le principal producteur de clous de girofle (71% de la production mondiale), suivie de Madagascar (12%) et de la Tanzanie (10%) [73].

### 3.13.2. Huile essentielle du clou de girofle

#### 3.13.2.1. Description, Extraction, Composition et Analyse

L'huile essentielle de clou de girofle se présente sous la forme d'un liquide huileux (ce qui est normal), de couleur jaune fonçant au brun à la lumière. La volatilité des huiles essentielles les oppose aux huiles de table (lipides).

La teneur des plantes en huile essentielle est faible de l'ordre de 1 à 3 % à l'exception du clou de girofle (14 à 19 % en masse) très riche en eugénol (70 à 85 %) (Espèce majoritaire ou appeler *principe actif*) [74]. Elle est obtenue par entraînement à la vapeur, ou hydro distillation du clou du girofle. Il est aussi possible de l'obtenir par extraction du clou par un solvant organique mais l'huile est généralement dans ce cas de qualité inférieure est raison de traces résiduelles du solvant.

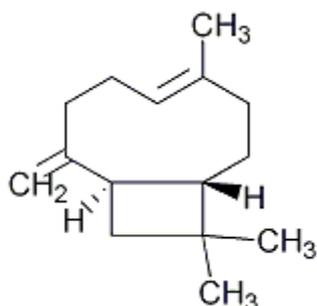
On pourra noter qu'une étude menées en 2006 à montré qu'une extraction par le dioxyde de carbone supercritique est tout à fait possible avec un rendement maximum dans les conditions suivantes : pression de 10 MPa (méga pascal) et température de 50°C [73].

L'huile essentielle des clous de girofle contient principalement de l'eugénol, de 75 à 85 %, de l'acétate d'eugénol, de 4 à 10 %, du  $\beta$ -caryophyllène, de 7 à 10 % et de faibles quantités d'autres produits. En précision l'huile essentielle des clous de girofle contient en moyenne 23 composés [74] :

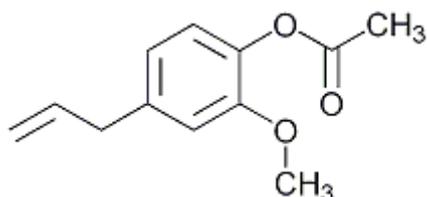
- ✚ des sesquiterpènes : alpha et bêta caryophyllènes (de 7 à 10%), alpha et bêta humulènes, alpha amorphène, alpha muurolène, calaménène, calacorène.

## Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle

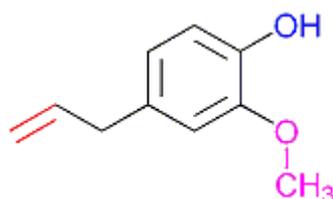
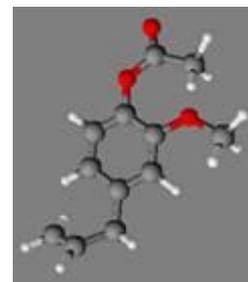
- ✚ des esters : hexanoates d'éthyle, acétates de 2-heptanyle, de 2-nonanyle, de styralyle, de benzyle, d'eugénol (de 4 à 10%), de terpényle et d'éthylphényle;
- ✚ des phénols : eugénol (75 à 85%), cis et trans isoeugénol, chavicol, 4-allylphénol.
- ✚ des oxydes : oxyde de caryophyllène, époxyde d'humulène.



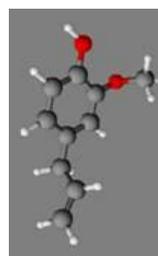
**$\beta$ -caryophyllène**



**Acétate d'eugénol**



**Eugénol**



**Figure 3.13:** Composés principaux dans l'huile essentielle des clous de girofle

Une conservation prolongée se traduit par la formation d'acétate de méthyle au niveau de la chaîne latérale de l'acétyleugénol, ce qui entraîne des modifications indésirables de l'arôme [75].

L'identification de l'huile essentielle se fait par le profil CCM suivi par analyse (CG-SM) pour connaître la teneur de cette huile et les teneurs de chaque constituant de ce dernier.

### 3.13.2.2. Propriétés biologiques

L'huile essentielle de clous de girofle possède de nombreuses propriétés médicinales, dues à l'eugénol : elle est anti-inflammatoire [76], antiseptique [77], parasiticide et anesthésiant local (utilisé à ce titre par les dentistes). Elles sont utilisées dans certains médicaments, en parfumerie, en phytothérapie ou comme agent de saveur dans l'alimentation.

### 3.14. Résultats et discussions

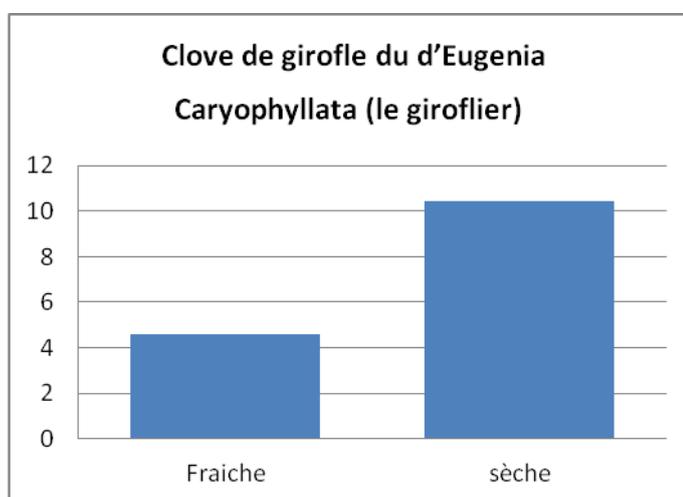
#### 3.14.1. Huile essentielle

##### 3.14.1.1. Rendement en huile essentielle

➤ **Effet de l'état de la plante (sèche ou fraîche) sur le rendement d'extraction d'HE**

Le rendement d'extraction est influencé par le degré d'humidité du matériel végétal. Donc le rendement d'extraction du matériel végétal sec est plus élevé que celui du végétal frais d'*Eugenia Caryophyllata* (le giroflier). Pour notre travail, nous avons utilisé des clous secs.

En effet, plus la matière végétale à distiller est chargée d'eau plus la consommation de augmente, et ce non seulement après la récolte mais même avant. D'après l'étude économique qui a été réalisée par Tavish *et coll.* [78], un temps en soleil durant quelques semaines immédiatement permet aux plantes de produire plus d'huile par rapport à un temps couvert. Cependant, un matériel végétal trop sec nécessite souvent un minimum d'eau à l'état liquide pour faciliter la diffusion de huile essentielle. Nous donnons les résultats dans la **figure 3.14** et dans le **tableau 3.1**.



**Figure 3.14.** Histogramme de la matière fraîche et sèche.

**Tableau 3.1.** Rendement du clou de girofle d'*Eugenia Caryophyllata* (le giroflier).

| Clou de girofle d' <i>Eugenia Caryophyllata</i> (le giroflier),<br>RENDEMENT(%) |       |
|---|-------|
| FRAI  | SEC   |
| 4.59  | 10.45 |

➤ **Effet de chlorure de sodium (NaCl) sur le rendement d'extraction d'HE (rendement de composé majoritaire : eugénol)**

Le fait d'ajouter du chlorure de sodium est l'opération de relargage. En clair, il s'agit de diminuer la solubilité de l'eugénol dans l'eau et de favoriser sa séparation.

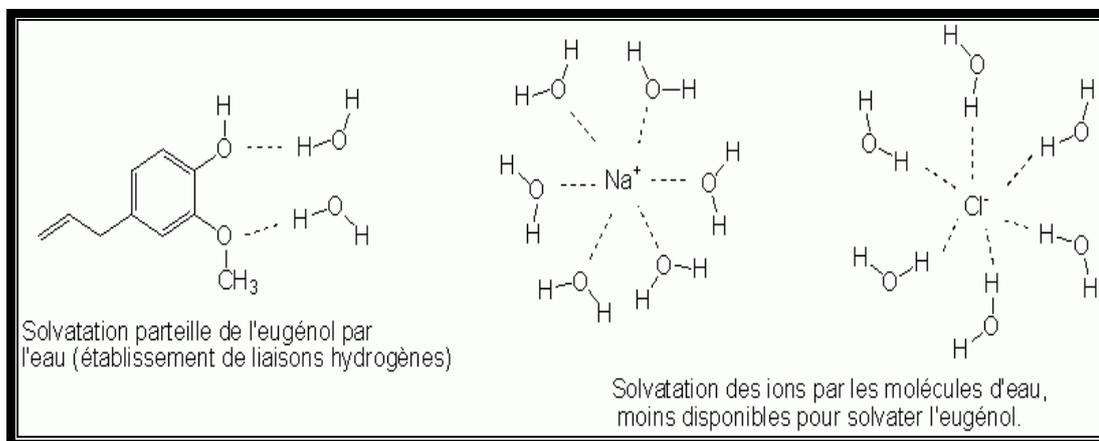
Cette opération est basée sur la modification des sphères de solvation. Un mot bien savant pour un phénomène physique assez simple.

En effet lorsque l'on dissout un composé dans de l'eau, les molécules H<sub>2</sub>O vont avoir tendance à entourer le composé à dissoudre (le soluté) de façon à favoriser sa dissolution.

Ainsi une molécule d'eugénol va être plus ou moins entourée de molécules d'eau, répartie sous forme de sphère. On dira alors que la molécule est solvatée et la sphère correspondante de molécules d'eau est la sphère de solvation.

Lors de l'ajout de sel, les molécules d'eau vont entourer les ions sodium Na<sup>+</sup> et chlorure Cl<sup>-</sup> pour permettre la dissolution du sel (**Figure 3.15**).

- ✚ L'eugénol étant un composé peu polaire, les molécules d'eau auront tendance à entourer plus facilement les ions que notre molécule.
- ✚ L'eugénol va ainsi être de moins en moins solvate par l'eau et va donc se séparer plus facilement.



**Figure 3.15 :** Effet du chlorure de sodium sur l'eugénol.

➤ **Effet de la méthode d'extraction sur le rendement d'extraction d'HE (rendement de composé majoritaire : eugénol)**

D'après la littérature la méthode d'extraction par distillation à la vapeur d'eau donne souvent un rendement plus élevé que celui de l'hydrodistillation. Ce résultat de recherche s'accorde avec d'autres travaux comme celui de Boutekjiret *et coll.* [79] qui ont étudié l'extraction du Romarin par hydrodistillation et par distillation à la vapeur d'eau et ils ont

## Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle

constaté que le rendement obtenu par distillation à la vapeur d'eau est beaucoup plus élevé que celui obtenu par hydrodistillation.

On peut expliquer ces différences par l'hypothèse suivante :

Lors de l'hydrodistillation, le matériel végétal se trouve immergé dans l'eau qui dissout plusieurs constituants de l'huile essentielle. Cependant ce problème est minime dans la distillation à la vapeur d'eau. Pour résoudre ce problème, dans notre future nous choisissons la méthode d'extraction par distillation à la vapeur d'eau.

La méthode d'extraction par distillation à la vapeur d'eau donne souvent un rendement plus élevé d'huile essentielle et au même temps l'augmentation du pourcentage de l'espèce actif dans l'huile essentielle (eugénol) d'après les travaux des Alma et *al.* [80].

### 3.14.1.2. Analyse de l'huile essentielle

#### 3.14.1.2.1. Analyse CCM

Les analyses CCM de l'huile essentielle des clous dans le solvant (dichlorométhane ou cyclohexane) de girofle montrent nettement l'apparaissent 6 à 7 spots.

Les CCM sont réalisées sur des plaques Merck, éluant : toluène/méthanol (95/5) révélées à la lampe UV (254 nm) (**Figure 3.16**).



**Figure 3.16** : CCM. A droite : l'huile essentielle du clou de girofle, au milieu : l'eugénol, et à gauche : l'acétate d'eugényle.  $R_f$  acétate d'eugénol = 0.94 ;  $R_f$  eugénol = 0.66.

Les CCM sont réalisées sur des plaques Merck, éluant : toluène/méthanol (95/5) révélées à la lampe UV (254 nm) et l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$  10%) **Figure 3. 17**.



**Figure 3.17** : CCM. A droite : l'huile essentielle du clou de girofle, au milieu : l'eugénol, et à gauche : l'acétate d'eugényle.  $R_f$  acétate d'eugénol = 0.94 ;  $R_f$  eugénol = 0.66.

Il a été précisé précédemment que l'huile essentielle des clous de girofle contient 23 produits. Sur la plaque CCM, nous pouvons voir en réalisant un dépôt concentré la présence de certains de ces composés.

Remarque :

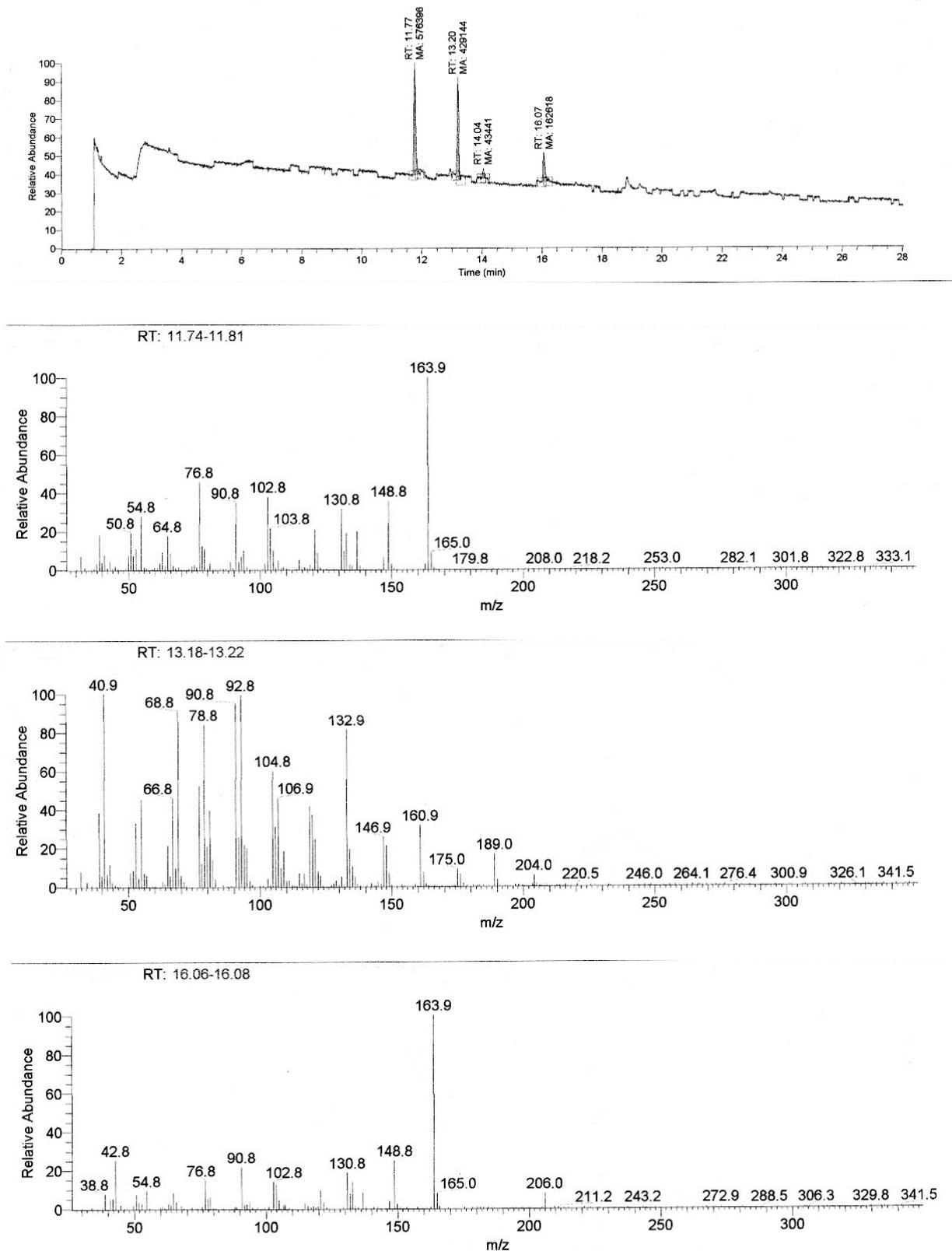
- Le révélateur utilisé pour l'analyse CCM et pour identifier la composition de l'huile essentielle du clou de girofle (sec) et qui donne un bon résultat : c'est l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$  10%).
- On peut aussi utiliser l'iode, mais cette méthode est beaucoup plus sensible à l'eugénol qu'à l'acétate d'eugénol.

#### 3.14.1.2.2 Analyse par CG-MS

- **Principaux composés de l'huile essentielle détectés par la chromatographie en phase gazeuse couplé à spectrométrie de masse (CPG/SM)**

L'analyse de l'huile essentielle des fleurs fraîches de giroflier par chromatographie en phase gazeuse couplé à spectrométrie de masse nous a permis d'identifier plusieurs composés dont nous citons seulement les composés principaux par ordre d'élution. Nos résultats sont donnés dans la **figure 3.18** et au **tableau 3.2**.

# Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle



**Figure 3.18:** Chromatogramme de l'huile essentielle extraite du clou de girofle obtenu par CG/ MS.

Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle

**Tableau 3.2** : Temps de rétention, surface mesurée, composition et masse molaire des différents composés obtenus par analyse chromatographique en phase gazeuse de l'huile essentielle du clou de girofle.

| Composé         | Temps de rétention (mn) | Surface mesurée | X(%)* | MM (g/mol) |
|-----------------|-------------------------|-----------------|-------|------------|
| Eugénol         | 11.77                   | 576396          | 47.57 | 163.9      |
| β-caryophyllène | 13.20                   | 429144          | 35.42 | 204.0      |
| Isoeugénol      | 14.04                   | 43441           | 03.60 | 163.9      |
| Eugényl acétate | 16.07                   | 162618          | 13.42 | 206.0      |

$$X(\%)^* = \frac{MA_X}{\sum MA_i}$$

D'après ces résultats, 96.45% des composants de l'huile essentielle du clou de girofle représentant la somme des pourcentages des composants obtenus ont été identifiés dont 51.2% sont des phénols, 35.4% des sesquiterpènes et 13.4% des esters. Les composants majeurs de cette huile sont : l'eugénol (47.6%), le bêta caryophyllène (35.4%), l'acétate d'eugényle (13.42%) et le cis/trans isoeugénol (03.6%).

Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Palacions *et al.* [81] qui ont examiné la composition chimique des huiles essentielles des clous de girofle. Ils ont trouvé 3 constituants majoritaire avec une prédominance de : l'eugénol (63.26%), bêta caryophyllène (22.62%) et l'acétate d'eugénol (6.28%) et l'absence du cis/trans isoeugénol.

D'après la littérature si on compare la composition chimique des huiles essentielles des clous de girofle obtenues par différentes méthodes d'extraction. Ils ont trouvé que l'eugénol (65.87%), le bêta caryophyllène (11.10%), et l'acétate d'eugénol (19.00%) sont prédominants dans les huiles essentielles obtenues par extraction par fluide à l'état supercritique [82] tandis que leurs valeurs étaient respectivement de 87.00 % ,3.56% et 8.01% dans le cas d'extraction par distillation à la vapeur (**Tableau 3.3**) [80].

D'après ces résultats, on remarque que la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce clou de girofle d'*Eugenia Caryophyllata* (le giroflier) est différente de celle obtenue dans de nombreux travaux sur la même espèce dans les différentes régions dans le monde, avec une prédominance des composés : eugénol et bêta caryophyllène dans la plupart des cas mais à des proportions différentes.

Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle

Cette différence de composition est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction.

**Tableau 3.3.** Composition chimique de différentes huiles essentielles extraites du giroflier.

| Auteurs/Référence              | Composé (%)         |                    |                        |                   |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|------------------------|-------------------|
|                                | Eugénol             | Acétate d'eugényle | $\beta$ -caryophyllène | Isoeugénol        |
| Tomaino <i>et al.</i> /[83]    | 82.60 <sup>b</sup>  | -                  | -                      | -                 |
| Guan <i>et al.</i> /[84]       | 48.82 <sup>a</sup>  | 13.84 <sup>a</sup> | 36.94 <sup>a</sup>     | -                 |
| Bhuiyan <i>et al.</i> /[85]    | 49.71 <sup>a</sup>  | -                  | 18.94 <sup>a</sup>     | -                 |
| Palacios <i>et al.</i> /[81]   | 63.26 <sup>a</sup>  | 6.28 <sup>a</sup>  | 22.62 <sup>a</sup>     | -                 |
| Alma <i>et al.</i> / [80]      | 87.00 <sup>b</sup>  | 8.01 <sup>b</sup>  | 3.56 <sup>b</sup>      | -                 |
| Srivastava <i>et al.</i> /[86] | 70.0 <sup>a</sup>   | 2.1 <sup>a</sup>   | 19.5 <sup>a</sup>      | 0.8 <sup>a</sup>  |
| Lee, Shibamoto/[87]            | 89.20 <sup>b</sup>  | 8.60 <sup>b</sup>  | -                      | -                 |
| Clifford <i>et al.</i> /[88]   | 14.74 <sup>b*</sup> | 3.28 <sup>b*</sup> | 0.13 <sup>b*</sup>     | -                 |
| Porta <i>et al.</i> /[82]      | 65.87 <sup>c</sup>  | 19.00 <sup>c</sup> | 11.10 <sup>c</sup>     | -                 |
| Nos résultats [89]             | 47.60 <sup>a</sup>  | 13.40 <sup>a</sup> | 35.40 <sup>a</sup>     | 3.60 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup>: Hydro-distillation. <sup>b</sup>: Distillation à la vapeur. <sup>c</sup>: Extraction par fluide supercritique (CO<sub>2</sub> SC). \* : pourcentage en masse.

### **3.15. Matériel et méthodes**

#### **3.15.1. Matériel végétal**

L'huile essentielle étudiée est extraite à partir des clous de girofle (sec) d'*Eugenia Caryophyllata* (le giroflier).

#### **3.15.2. Méthodes d'analyse**

##### **3.15.2.1. Extraction de l'huile essentielle**

Lors de l'hydrodistillation, le matériel végétal se trouve immergé dans l'eau qui dissout plusieurs constituants de l'huile essentielle. Le montage utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle des clous du girofle est celui de l'hydrodistillation. Il est constitué d'une chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon, un ballon en verre contenant l'eau bouillante distillée est séparé de la cuve qui contient la matière végétale à extraire, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, un collecteur (erlenmeyer) en verre également qui reçoit les extraits de la distillation.

##### **3.15.2.1.2. Procédé d'extraction**

La matière végétale (clou de girofle d'*Eugenia Caryophyllata* (le giroflier)) a été soumise à une hydrodistillation pendant 6 h. Le ballon rond de 500 ml contenant l'eau bouillante distillé vers 250 ml est séparé de la cuve (colonne) qui contient 100 g des clous de girofle ont été broyés au mortier) à extraire relié a un réfrigèrent, le ballon a été chauffé dans un chauffe ballon. 50 ml d'eau distillé ont été rajoutés plusieurs fois goutte a goutte a l'aide d'une ampoule pour le montage devient pas sec pendant 6 h de reflux. La vapeur d'eau entraîne l'huile essentielle. Les vapeurs sont décondensées à l'aide d'un réfrigérant à eau, et récupérées dans un erlemeyer : l'huile essentielle et l'eau n'étant pas miscibles. La distillation est poursuivie jusqu'à obtention d'environ 500 ml de distillat qui comporte deux phases distinctes : la phase aqueuse et la phase organique. On ajoute 4 g de chlorure de sodium (NaCl) pour saturer le distillat. L'extraction par solvant permet d'extraire l'huile essentielle de l'eau : on utilise pour cela un solvant non miscible à l'eau, et dans lequel l'huile essentielle est très soluble. Transférer le distillat dans l'ampoule à décanter et extraire avec le cyclohexane (3x100ml). Les phases organiques sont rassemblées et séchées avec du sulfate de magnésium anhydre (MgSO<sub>4</sub>) puis filtrer. La phase organique est évaporée à l'évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'une huile jaunâtre. L'huile essentielle obtenue est

Propriétés de quelque huile essentielle. Composition de l'huile essentielle extraite du clou de girofle

gardée au réfrigérateur à 4 °C et à l'obscurité. (m = 10.45 g, Rdt = 10.45 % pour le clou de girofle).

### 3.15.2.1.3 Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme **AFNOR (1986) [90]**, le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = \frac{M'}{M} \times 100$$

**RHE** : rendement en huile essentielle de clou de girofle ;

**M'** : masse d'huile essentielle en gramme à partir du clou de girofle ;

**M** : masse de la matière végétale utilisée en gramme et qui vaut 100 g.

### 3.15.2.1.4 Conservation de l'huile essentielle obtenue

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables. C'est pour cela nous les avons conservées à une température voisine de 4 °C, dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière.

## 3.15.3 Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle

### 3.15.3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par analyse CCM a été effectué sur plaque de gel de silice 60 Merck déposé sur des feuilles d'aluminium (indicateur de fluorescence à 254 nm, épaisseur 0,25 mm). Les extraits (l'huile essentielle clou de girofle (sèche dissout dans dichlorométhane ou cyclohexane), sont soumis à une séparation par couche mince avec utilisation toluène/méthanol (95/05) ml comme éluant. Après dépôt de notre extrait sur la plaque, cette de dernière est développée dans une chambre chromatographie, la hauteur de la migration est de 70 mm. Après 15 min de séchage de la plaque à l'air libre. Les composés sont révélés sous irradiations UV à 254 nm. Et après la plaque est exposée à une pulvérisation par une solution de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%) Après 30 min de séchage de la plaque dans une étuve à 60°C, voir la coloration des spots ou révélées à l'iode. Les R<sub>f</sub> des spots ont été enregistrés. On utilise l'eugénol commercial ou l'acétate d'eugényle synthétisé ou les deux comme références.

### 3.15.3.2 Chromatographie en phase gazeuse couplé aux spectres de masse

L'analyse CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

L'étude analytique de l'huile essentielle des clous de girofle a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse de type Finnigan Thermo Quête par injection de 0.2µl d'extrait à l'aide d'une micro-seringue. Le mode d'injection (Split) doit être rapide pour éviter les élargissements des pics.

- ❖ Le gaz vecteur est l'hélium (He) d'un débit de 0.3ml/min ;
- ❖ La colonne utilisée est une colonne capillaire de type (RTX 5MS) en silice fondue instrument, de 25m de longueur et de 0.25mm de diamètre intérieur. Epaisseur de la phase stationnaire : 0.25µm ;
- ❖ La programmation de la température de la colonne est comme suit : la température initiale d'injection est de 70°C pendant 2 mn, puis s'élève par palier de 10°C/mn à 210°C pendant 20mn ;
- ❖ Le détecteur utilisé pour cette analyse est du type « Finnigan Trace », la température 250° C.

L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données NIST qui permet l'identification des composés. Le temps de sortie de chaque pic, le « temps de rétention », caractérise qualitativement la substance concernée. L'aire limitée par ces pics permet de mesurer la concentration de chaque composé séparé.

Les analyses de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont été effectuées sur un appareil de chromatographie en phase gazeuse GC « Finnigan Trace Ultra Gas » équipé d'un injecteur PTV en mode splitless, l'hélium servant de gaz vecteur, d'une colonne capillaire en silice fondue RTX-5MS (longueur : 15 m ; diamètre : 0,25 mm ; phase stationnaire 5 % de phényl-silicone ; épaisseur du film : 0,25 µm), couplé à un spectromètre de masse « Finnigan Trace » (EI 70eV), la ligne de transfert étant portée à 250°C. La programmation du four est la suivante : 70°C lors de la première minute puis montée en température de 70 °C à 210°C à une vitesse de 10°C par minute. La température finale est maintenue pendant 15 minutes.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

## Références bibliographiques

- [1] a) G. Pierangeli, G. Vital, L. Windell Rivera. *J Medic Plants Res.* **2009**, 3 (7), 511.  
b) F.C. Akharaiyi, B. Boboye. *J Nat Prod.* **2010**, (3), 27-34.
- [2] J. BHarbone, Phytochemical methods. Qguide to modern techniques of plants analysis. *Third edition.* **1998**. ISBN:0-412-57260-5(HB)and 0-412-57270-2 (PB).
- [3] J. Bruneton. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. *Tec & Doc, Lavoisier, Paris.* **1993**, 915.
- [4] AFNOR. Recueil de normes : les huiles essentielles. *Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse.* AFNOR, Paris. **2000**, p 440.
- [5] R. Anton, A. Lobstein. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec & Doc, Paris.* **2005**, p 522.
- [6] I. Laib . Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. *Mémoire de magister en Sciences Alimentaires.* Université Mentouri Constantine. **2011**.
- [7] S. Combrinck, G.W.Du Plooy, R.I. McCrindle, B.M. Botha. Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of botany.* **2007**, 99 (6), 1111-1119.
- [7'] K. Khenaka. Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. *Mémoire de Magister En Microbiologie Appliquée.* Université Mentouri Constantine. **2011**.
- [8] N. Karray-Bouraoui, M. Rabhi, M. Neffati, B. Baldan, A. Ranieri, B. Marzouk . Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Industrial Crops and Products.* **2009**, 30, 338-343.
- [9] T. Deroin. Biologie florale d'une Annonaceae introduite en Côte d'Ivoire: *Canangadiagnosis* and epidemiology of fungal infections. **1988**, 36 (1), 249-257.
- [10] J. Mann. Secondary metabolism. *Clarendon Press, Oxford.* **1987**, p374.
- [11] J.L. Guignard , L. Cosson, L. Henry. Abrégé de phytochimie. *Masson, Paris.* **1985**, p224.
- [12] T. Barrata, D .Dorman, S. Deans, C. Figueiredo, J. Barroso , G. Ruberto. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal.* **1998**, 13, 235-244.
- [13] P. Belaiche. L'aromatogramme. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. *M.S.A. Editeur, Paris.Tome 1.* **1979**, p 204.

- [14] M.C. Pibiri. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de Doctorat, Lausanne, Canada*. **2006**, p 177.
- [15] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology*. **2008**, 46, 446–475.
- [16] R. Croteau, T.M. Kutchan, N.G. Lewis. Natural products (secondary metabolites). *American Society of Plant Physiologists*. **2002**, 1250-1268.
- [17] K. Amlan, J.S. Patra. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. **2010**, 71, 1198–1222.
- [18] S. Calsamiglia, M. Busquet, P.W. Cardozo, L. Castillejos, A. Ferret. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. **2007**, 90, 2580–2595.
- [19] P. Maihebiau. La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. **1994**, p 635.
- [20] C. Benchaar, S. Calsamiglia, A/V. Chaves, G.R. Fraser, D. Colombatto, T.A. McAllister. Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. **2008**, 14, 209–228.
- [21] N.S. Sangwan, A.H. Farooqi, F. Shabih, R.S. Sangwan. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. **2001**, 34, 3–21.
- [22] T. Bernard, F. Periau, O. Brav, M. Delmas, A. Gaset. Extraction des huiles essentielles. *Chimie et Technologie. Information chimie*. **1988**.
- [23] C. Bourrel. Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. *Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, France*. **1993**.
- [24] C. Besombes. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse Doctorat. Université de La Rochelle*. **2008**, 41-45.
- [25] Maffei, Sacco. Perfumer and flavorist. *Flavour and Fragrance Journal*. **1997**, 13, 61.
- [26] N.S. Fantino. Etude du polymorphisme au d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia Mill.*)- Détermination de critères précoces de sélection. *Thèse de doctorat. Université de La Rochelle*. **1990**, 41-45.
- [27] H.S. Huang, L.H. Chang, T.T. Jong, Y.F. Nien, C.M.J. Chang. Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa Linn.*, and purification of turmerones. *Separation and Purification Technology*. **1995**, 47, 119-125.

- [28] A.S.Carette. La lavande et son huile essentielle. *Thèse de doctorat.Universté de Toulouse*. **2000**, p100.
- [29] D. Vokou, S. Kokkini, JM. Bressiere. *Origanum onites*( Lamiaceae) in Greece Distribution , volatile oil yield, and composition . *Economy botanic*. **1988**, 42, 407-412.
- [30] P. Franchomme, D. Pénoel, ME.Reverdy. Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique : matière, énergie, information.L'aromathérapie exactement. *R.J. Editeur. Limoges*. **1990**, 2, 73-227.
- [31] P. Maihebiau. La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. *Lausanne*. **1994**, p 635.
- [32] S. Inouye .Laboratory evaluation of gaseous essential oils (part 1). *International journal of Aromatherapy*. **2003**, 45, 22-35.
- [33] M.Valnet. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. *Journal of Food Microbiology*. **2005**, 85, 73-81.
- [34] M. Lahlou. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. **2004**, 18, 435-448.
- [35] F. Richard. Manuel des corps gras. *Paris, Ed: Lavoisier, Tec.&Doc*. **1992**, p 1228-1242.
- [36] J.L. Multon. Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. *Lavoisier Technique & Documentation, Paris,Apria*. **1982**,1, p 576.
- [37] D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe. Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. *Marcel Dekker, Inc. New York*. **1996**, p 65.
- [38] S. Caillet, M.Lacroix. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*). **2007**, p 1- 8.
- [39] C.F.Carson, T.V. Rilley, F. Bosque. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*. **2002**, 78, 264-269.
- [40] PM.Davidson. Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology*. **1997**, 43, 148-155.
- [41] S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markham, H.C. Bell, J.F. Gustafson, J.R. Warmington, S.G. Wyllie. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tee tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. **2000**, 88, 170-175.
- [42] K. Wendakoon, N.A. Saguchi. Methods of asses quality and stability of oils and fatcontaining foods. *AOCS. press, champaign*. **1995**.

- [43] S.D. Cox, J.F. Gustafson, J.R. Warmington, S.G. Wyllie. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Malaleuca alternifolia* essential oils. *Journal of Applied Microbiology* . **1991**, 88, 170-175.
- [44] H J D. Dorman, S G. Deans. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **2000**, 88, 308-316.
- [45] MJ. Garner. Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles in Parfumes cosmétiques, arômes. **1977**, 14, 31-40.
- [46] M. Piocho. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimiques, activité pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire, Université du Québec a Chicoutimi, Canada.**2008**.
- [47] D.L. Pavia. GM. Lampman. GS. Kriz. Introduction to organic laboratory techniques. W.B. Saunders Co. Philadelphia, USA. **1976**, 567-573.
- [48] E. Biocchio.*Parfum Cosmét. Arômes*. **1985**, 63, 61-68.
- [49] MA. Martinez-Sosa. Thèse de l'Institut National de Sciences Appliquées. Toulouse France. **1981**.
- [50] Kh. Nait Achour. Etude de la composition chimique des essences quatre espèces d'eugalyptus poussant dans les régions de Tizi ousou. *Mémoire de magister en chimie* .Université Tizi-Ouzou.**2012**.
- [51] Z. Hellal. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes des *Citrus*.Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). *Mémoire de magister en biologie* .Université Tizi-Ouzou.**2011**.
- [52] R.Wijesekara, CM. Ratnatunga, K. Durbeck. The distillation of essential oils. *Manufacturing and plant Construction Handbook*. Eschborn, Federal Republic of Germany, Protrade, Department of foodstuffs & Agricultural Products. **1997**.
- [53] N. Bousbia. Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. *Thèse en co-Tutelle en chimie*. Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Ex – INA El Harrach – Alger).**2011**.
- [54] A. Basil, M.M. Jimenez-carmona, A.A. Clifford. Extraction of rosemary by super heated water. *Journal of food chemistry*. **1998**, 46, 5205-5209.
- [55] G.Légrand. 1993. Manuel de préparateur en Pharmacie. Masson, Paris.
- [56] A. Dapkevicius, R .Venskutonis, TA. Van Beek, JPH. Linssen. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science Food and Agriculture*. **1998**, 77(1), 140-146.

- [57] NS. Kim, DS. Lee. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* . **2002**, 98, 31-47.
- [58] L. Lagunez Rivera. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse. **2006**,15-35.
- [59] N. Aghel, Y. Yamini, A. Hadjiakhoondi , S. Mahdi Pourmortasavi. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta*. **2004**, 62, 407-411.
- [60] M.D. Luque de Castro , M.M Jiménez-Carmona. Conventional techniques for the isolation of valuable essential oils. *Trends Anal Chem*. **1998**, 17, 441.
- [61] L.Gámiz-Graci, MD. Luque de Castro. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*. **2000**, 51, 1179-1185.
- [62] OM. Zel, F. Gogus, A.C. Lewis. Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*. **2003**, 82, 381-386.
- [63] C.Deng, N.Yao, A.Wang , X.Zhang. Determination of essential oil in a traditional Chinese medicine, *Fructus amomi* by pressurized hot water extraction followed by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **2005**, 236-237.
- [64] S. Hemwimon, P. Pavasant, A. Shtiprux. Microwave – assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology*. **2007**, 54, 44-50.
- [65] R. Paris, M. Godon. Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. *Ed. Masson, Paris*.**1979**.
- [66] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman. Principes d'analyse instrumentale. 1<sup>ère</sup> édition, *Ed. De Boeck Université*. 2003, 945.
- [67] J. Tranchant. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. *Ed. Masson* .Paris. **1995**.
- [68] P. Longevialle. Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris. **1981** ,32- 35.
- [69] E. Constantin. Spectrométrie de masse.Lavoisier Tec & Doc, Paris. **1996**,1-14.
- [70] D. Pradeau, Y. Cohen. L'analyse pratique du médicament. *Ed.médicales internationales*. 1992,418-428.

- [71] R. Schroder, Kaffee, Tee Kardamom Tropische, Gewurze.Geschichte, Vebreitung, Anbau, Ernte, Aufbereitung, Struttgart .**1991**.
- [72] R .Deininger, Z.Phytother. **1991**, 12(6), 205-212.
- [73] W. Guan, S. Li, R. Yan. *Food Chemistry*. In Press, Corrected Proof, Available online 25 April **2006**.
- [74] M Gopalakrishnan . *J Sci Food Agric*. **1990**, 50 ,111-117.
- [75] WD. Koller, Z. Lebensm. *UntersForch*. **1981**, 173, 99-100
- [76] H. Raghavenraa, B.T. Dewar. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. **2006**,74 , 23-27.
- [77] P. Lebeau, G. Courtois. *Traité de pharmacie chimique – Tome II, Masson et C<sup>ie</sup>*.**1929**.
- [78] H.M. Tavish , D. Harris. An economic study of essential oil production in the UK.*for the government industry Forum for non-food crops*. (UK) **January 2002**.
- [79] C. Boutekdjiret. F. Bentahar, R. Belabbes, JM. Bessiere. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation .*Flavour and Fragrance Journal*. **2003**, 18, 481-484.
- [80] M.H.Alma, M. Ertas, S. Nitz, H. Kollmannsberger. *BioResources*.**2007**, 2, 265-269.
- [81] S.M. Palacios, A. Bertoni, T. Ross, R. Santander, A. Urzua. *Molecules*. **2009**, 14 ,451-454.
- [82] G.D. Porta, R. Taddeo, E. D'urso, E. Reverchon. *Technol*. 1998, 31, 454-460.
- [83] A. Tomaino,F. Cimino, V. Zimbalatti, V. Venuti, V. Sulfaro, A. Pasquale. A. Saija. *Food Chem*. **2005**, 89, 549-554.
- [84] W. Guan, S.Li R. Yan, S. Tang. C. Quan. *Food Chem*.**2007**, 101, 1558-1564.
- [85] M.N.I. Bhuiyan, J. Begum, N.C. Nandin, F. Akter, J. Afri. *Plant Sci*. **2010**, 4, 451-454.
- [86] A.K. Srivastava, S.K. Srivastavakv. Syamsundar. *Flav Fra J*.**2005**, 20, 51-53.
- [87] K.G. Lee, T. Shibamoto. *Food Chem*.**2001**, 74, 443-448.
- [88] A.A. Clifford, A. Basile, SHR. Al-Saidi. *Fresenius J. Anal. Chem*.**1999**, 364, 635-637.
- [89] F. Memmou, R. Mahboub. Composition of Essential Oil from Flower of Clove. *Journal of Scientific Research in Pharmacy*. **2012**, 1(2), 33-35.
- [90] AFNOR. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. **1986**, p 57.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## *Conclusion*

Les travaux de recherche entrepris au cours de ce projet de ma thèse de Doctorat auront permis, dans un premier lieu, de mettre en lumière le potentiel pharmacologique de dérivés de l'eugénol et l'huile essentielle extraite du clou de girofle.

Nous avons réalisé plusieurs travaux de recherche de ma thèse de doctorat qui sont devisés en trois parties. La première partie consiste à préparé des dérivés de l'eugénol (6-bromoéugénol, et l'acétate d'eugényle) qui ont révélé des activités biologiques intéressantes et remarquables et peuvent être utilisés comme intermédiaires réactionnels. Dans cette partie, nous avons vu un certain nombre de méthode efficaces pour réaliser la préparation des dérivés de l'eugénol (6-bromoéugénol, acétate d'eugéyle). Chaque méthode à ses avantages et ses défauts, et notre but est de trouver un protocole simple, utilisable sur une gamme de substrat la plus large possible.

Pour la préparation de 6-bromoéugénol, nous avons appliqué la réaction de monobromation régiosélective de noyaux aromatiques qui est décrite dans la littérature. Les procédures expérimentales suivantes ont été appliquées pour évaluer la performance de la 6-bromoéugénol et d'établir, si possible des relations, structure-activité.

Pour la préparation d'acétate d'eugényle, nous avons appliqué la réaction d'estérification.

Dans la deuxième partie, nous avons employé les produits préparés pour l'évaluation de l'activité antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH• et l'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode du disque.

Dans ce présent travail, deux méthodes de l'évaluation de l'effet antioxydant ont été utilisées à savoir la méthode de HPTLC et la méthode du DPPH•.

La méthode de HPTLC confirme analytiquement le pouvoir antioxydant dans la mesure où une décoloration des taches du mauve au jaune a été observée. D'autre part, l'étude

du pouvoir antioxydant de : 6-bromoéugénol, eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle de clou de girofle (sec) (ainsi que l'acide ascorbique comme témoin) par la méthode de piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Les propriétés antioxydantes ont été mesurées et mises en évidence par la concentration d'inhibition IC50 et par l'étude de la cinétique de réduction. Les résultats de la capacité de piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> est très intéressante avec : IC50<sub>BrEu</sub> = 34.270 µg/mL, IC50<sub>AcAs</sub> = 54.888 µg/mL, IC50<sub>Eu</sub> = 130.485 µg/mL, et IC50<sub>AcEu</sub> = 0 µg/mL et IC50<sub>HE</sub> = 200 µg/mL respectivement avec des temps de réaction TEC50<sub>BrEu</sub> = 1.45min, TEC50<sub>AcAs</sub> = 0.95min, TEC50<sub>Eu</sub> = 1.55min et TEC50<sub>AcEu</sub> = 34min, qui corrént avec leurs structures chimiques. Nous obtenons ainsi l'ordre décroissant de l'activité antioxydante suivant l'indice EAR : vitamine C (acide ascorbique) > 6-bromoéugénol > eugénol > huile essentielle du clou de girofle (sec).

L'évaluation de l'effet antibactérienne de: 6-bromoéugénol, eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle de clou de girofle (sec) a été réalisé par la méthode de diffusion sur le milieu gélosé en utilisant trois souches bactériennes: *Pseudomonas aeruginosa* (S1), *Escherichia coli* (S2) et *Staphylococcus aureus* (S3).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée pour les différentes souches microbiennes. La souche de *Staphylococcus aureus* ne montre aucune sensibilité pour l'eugénol, l'acétate d'eugényle (source eugénol commercial) et l'acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec)) ; par contre elle a été la plus sensible au 6-bromoéugénol et l'huile essentielle de clou de girofle (sec) avec une CMI de 0.5 mg/mL. La souche *Escherichia coli* a été la plus sensible à l'huile essentielle de clou de girofle (sec), l'eugénol, l'acétate d'eugényle (source eugénol commercial) et le 6-bromoéugénol avec des CMI de 0.5 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL et 1 mg/mL respectivement. Cette souche ne montre aucune sensibilité pour l'acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec)). La souche *P. aeruginosa* montre une sensibilité très efficace et remarquable pour tous les extraits (huile essentielle de clou de girofle (sec), eugénol, acétate d'eugényle (source eugénol commercial), acétate d'eugényle (source l'huile essentielle de clou de girofle (sec) et 6-bromoéugénol) avec des CMI de 0.25 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL et 0.25 mg/mL respectivement.

Les résultats obtenus dans ce travail pour: le 6-bromoéugénol, l'éugénol, l'acétate d'eugényle et l'huile essentielle de clou de girofle (sec) pourraient constituer une base pour la mise au point d'une nouvelle génération d'agents antioxydant et antibactérien naturel ou synthétique qui peuvent être utilisés pour l'Homme contre les maladies bactériennes et contre des maladies induites par le stress oxydant.

La troisième partie consiste à réaliser l'extraction d'huile essentielle des clous de girofle par hydrodistillation. Le rendement d'extraction de l'huile essentielle est de 10.45 ±0.2%. L'analyse de la composition chimique par CPG / SM a permis d'identifier quatre composés principaux.

D'après ces résultats, 96.45% des composants de l'huile essentielle des clous de girofle représentant la somme des pourcentages des composants obtenus ont été identifiés dont 51.2% sont des phénols, 35.4% sont des sesquiterpènes et 13.4% sont des esters. Les composants majeurs extraits de cette huile sont : l'éugénol (47.6%), la bêta-caryophyllène (35.4%), l'acétate d'eugényle (13.42%) et le *cis/trans* isoeugénol (03.6%).

## *Perspectives*

A l'issue de cette petite contribution dans le domaine de la recherche, des perspectives peuvent être formulées, notamment :

- ✚ Sur le plan socio-économique, notre travail s'inscrit dans l'amélioration du thérapeutique antioxydant et antibactérienne des produits suivants : 6-bromo-eugénol, eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle de clou de girofle (sec). Ainsi, il est primordial de préparer de nouvelles molécules (présentant une activité biologique potentielle) ainsi que de mettre au point des voies de synthèse toujours plus efficaces et rapides. Parmi les composés d'intérêt, nous synthétisons des composés par la réaction de substitution électrophile aromatique (SEAr). Ainsi, nous souhaitons utiliser des dérivés de l'eugénol et des dérivés du phénol sur des halogénures d'alkyles (Iaires et IIIaires).
- ✚ Tests antioxydants et antibactériennes séparés *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles biologiques.
  - Tests antioxydants *in vitro* (Test du FRAP..... )
  - Tests antibactériens *in vitro* (Par contact direct, par dilution du produit en milieu liquide, et par micro-atmosphère).
- ✚ Evaluation des activités anticancéreuses et antifongiques des composés suivants: 6-bromo-eugénol, eugénol, acétate d'eugényle et huile essentielle de clou de girofle (sec) et d'autres composés de synthèse.

## Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la synthèse de dérivés de l'eugénol et de sa valorisation en tant qu'antioxydant et antibactérien. La préparation de dérivés de l'eugénol est réalisée en deux parties: la première est la synthèse du 6-bromoeugénol par l'action du LiBr sur l'eugénol en présence de  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  et conduit exclusivement au composé *orthomonobromé*. Le rendement du produit isolé est très élevé. Un mécanisme faisant appel à une substitution électrophile par l'anion  $\text{Br}^-$  est postulé, permettant l'interprétation de cette réaction de bromation régiosélective. La deuxième partie est la synthèse de l'acétate d'eugénol par l'action de l'anhydride acétique sur l'eugénol. Les rendements des produits obtenus sont variés. Nous proposons un mécanisme d'estérification.

L'évaluation de l'activité antioxydante de dérivés de l'eugénol par la méthode HPLTC, s'est révélée positive par l'apparition de taches jaunes sur la plaque CCM pulvérisées par le DPPH<sup>•</sup>. L'activité antioxydante des différents produits (6-bromoeugénol, acide ascorbique, eugénol et acétate d'eugényle) a été évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Les propriétés antioxydantes ont été mesurées et mises en évidence par la concentration d'inhibition IC<sub>50</sub> et par la cinétique de réduction. Les résultats de la capacité de piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> sont très intéressantes avec : IC<sub>50</sub><sub>BrEu</sub> = 34.270 µg/mL, IC<sub>50</sub><sub>AcAs</sub> = 54.888 µg/mL, IC<sub>50</sub><sub>Eu</sub> = 130.485 µg/mL, et IC<sub>50</sub><sub>AcEu</sub> = 0 µg/mL, respectivement avec des temps de réaction TEC<sub>50</sub><sub>BrEu</sub> = 1.45min, TEC<sub>50</sub><sub>AcAs</sub> = 0.95min, TEC<sub>50</sub><sub>Eu</sub> = 1.55min et TEC<sub>50</sub><sub>AcEu</sub> = 34min, qui corrént avec leurs structures chimiques. Les résultats obtenus montrent bien que le 6-bromoeugénol est l'antioxydant le plus efficace de cette série de produits.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur trois souches bactériennes selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les diamètres des zones d'inhibition du à la croissance microbienne au tour des disques représentent l'activité antimicrobienne maximale. Les résultats obtenus montrent bien que la souche de *Staphylococcus aureus* se révèle la plus résistante pour tous les échantillons. La souche d'*Escherichia coli* est plus résistante que la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

**Mots clés :** Synthèse de dérivés de l'eugénol, activité antibactérienne, activité antioxydante (HPTLC, DPPH).

## Abstract

This works describe the synthesis of eugenol derivatives and its evaluation as antioxidant and antibacterial. The preparation of eugenol derivatives is made in two ways: the first is the synthesis of 6-bromoeugenol by the action of LiBr on eugenol in the presence of  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  and leads exclusively to monobrominated *ortho* compound. The yield of isolated pure product is very high. A mechanism involves an electrophilic substitution by Br, allowing the interpretation of this regioselective bromination reaction. The second part is the synthesis of eugenyl acetate by acetic anhydride action on eugenol. The yields of pure products are varied between very high and midrange. The derivatives antioxidant activity of eugenol derivatives by HPLTC method was revealed positive by the appearance of the yellow spots on the TLC plates sprayed with DPPH<sup>•</sup>. The antioxidant activity of the various products (6-bromoeugenol, ascorbic acid, eugenol and eugenyl acetate) was evaluated by the method of trapping of the free radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). The antioxidant properties were measured and demonstrated by the inhibition concentration IC<sub>50</sub> and reduction kinetics. The results of the scavenging capacity of DPPH<sup>•</sup> free radical is very interesting with an IC<sub>50</sub><sub>BrEu</sub> = 34. 270 µg/mL, IC<sub>50</sub><sub>AcAs</sub> = 54 .888µ g/mL, IC<sub>50</sub><sub>Eu</sub> = 130. 485µg/mL and IC<sub>50</sub><sub>AcEu</sub> = 0 µg/mL, respectively reaction times TEC<sub>50</sub><sub>BrEu</sub> = 1.45min, TEC<sub>50</sub><sub>AcAs</sub> = 0.95min, TEC<sub>50</sub><sub>Eu</sub> = 1.55min and TEC<sub>50</sub><sub>AcEu</sub> = 34min, correlated with their chemical structures. These results showed well that 6-bromoeugenol is an efficient antioxidant.

The antibacterial activity was determined on three bacterial strains according to the diffusion method on agar. The diameters of the inhibition zones of microbial growth in round discs represent the maxima of the antimicrobial activity. The results fitted well the strain of *Staphylococcus aureus* is proving the most resistant of all the samples. The *Escherichia coli* strain is more resistant than the *Pseudomonas aeruginosa* strain.

**Keywords:** Synthesis of eugenol derivatives, antibacterial and antioxidant activities, (HPTLC, DPPH).

## ملخص

يُدرج هذا العمل في إطار تحضير بعض مشتقات الأوجينول وتقويم قدرتها النشاطية كمضادات للأوكسدة و كمضادات للبكتيريا. تحضير هذه الأخيرة حقق في تركيبتين: الأولى استهلكت في تحضير 6- بروم أوجينول بتفعيل (LiBr) على الأوجينول وبحضور  $\text{Cu}(\text{AcO})_2$  نتج عنهم مركب أحادي البروم في الوضعية أرو لهذا المنتج انطوات هذه التركيبية تحت الية استبدال الإلكتروني بواسطة ايونات البروم. حيث إن نسبة المردودية لهذا المنتج المعزول و النقي كانت جد عالية. اما الثانية استهلكت في تحضير خلاص الأوجينول بتفعيل أنديريد الخليك على الأوجينول انطوات تحت آلية الأسترة. نسبة مردودية المنتجات النقية المعزولة تارحجت بين العالية جدا والمدى المتوسط.

قراءة وتقويم نشاط مضادات الأوكسدة لمشتقات الأوجينول بطريقة HPTLC كشف عن نتائج ايجابية من خلال ظهور بقع صفراء على لوحات التحليل الكروماتوغرافي رشت او ردت بمحلول DPPH<sup>•</sup>.

النشاط المضاد للأوكسدة لمختلف المنتجات (6- بروم أوجينول, حمض الأسكوربيك, الأوجينول, خلاص الأوجينول) قومت عن طريق رصد و محاصرة الجذور الحرة ل: DPPH<sup>•</sup>. تم قياس خصائص مضادة للأوكسدة والتي أظهرتها قيم التراكيز المثبتة IC<sub>50</sub> او الحركة الحدية للارجاج. نتائج قدرة تثبيت و رصد و محاصرة الجذور الحرة ل: DPPH<sup>•</sup> كانت جد قيمت وهي على التوالي:

IC<sub>50</sub> = 34.270 µg/mL, IC<sub>50</sub> = 54.888 µg/mL and IC<sub>50</sub> = 130.485 µg/mL, IC<sub>50</sub> = 0 µg/ml.

أما زمن التفاعل اللازم لتثبيت 50% من التركيز حدد على التوالي:

TEC<sub>50</sub> = 1.45min, TEC<sub>50</sub> = 0.95min, TEC<sub>50</sub> = 1.55min, TEC<sub>50</sub> = 34min,

ارتبطت هذه النتائج بالبنية الكيميائية لهذه المركبات. و أثبتت أن مركب 6- بروم أوجينول جزيء نشيط بيولوجيا.

تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا على ثلاثة سلالات بكتيرية وفقا طريقة الانتشار في الوسط جيلوزي. أقطار مناطق تثبيط النمو الميكروبي المتزايد حول الأفراس المستديرة، والتي تمثل الفعالية القصوى للنشاط مضادات الميكروبات. النتائج أثبتت ان سلالة من المكورات العنقودية الذهبية هي الأكثر مقاومة لجميع العينات. اما سلالة الإشريكية القولونية هو أكثر مقاومة من سلالة الزائفة الزنجارية.

**الكلمات المفتاحية:** تحضير مشتقات الأوجينول, مضادات للأوكسدة (HPTLC, DPPH), مضادات للبكتيريا.