

N° d'ordre :FS / UMBB / 2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أمحمد بوقرة بومرداس
Université M'Hamed Bougara de Boumerdès



Faculté des Sciences - Département de Chimie

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Organique

Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Présenté et soutenu par

CHEBAB Imane et GAOUAOUI Loubna

Thème

**Extraction, analyse physico-chimique, évaluation de l'activité antioxydante et étude
théorique de l'huile essentielle de giroflier**

Le 14 Juillet 2022

Devant les membres de jury :

Nadjib Benosmane	Professeur	FS-UMBB	Président
Souhila Bouaziz-Terrachet	Professeur	FS-UMBB	Promoteur
Karima Dehak	Professeur	FS-UMBB	Examineur
Linda Loucif Seiad	Maitre de conférences A	FS-UMBB	Examineur

Année universitaire : 2021 /2022

Dédicace

{Quiconque emprunte un chemin pour acquérir la connaissance Allah lui facilite le chemin de paradis}

Le prophète Mohamed □

A ma mère, que Dieu lui fasse miséricorde

A mon chère papa pour ses encouragements et leur soutien

A mes sœurs chahla, Basma et mon frère Fares

A mes deux meilleures amies kahina et Asma qui m'ont vraiment encouragé depuis le début pour réaliser ce modeste travail

Je tiens également à remercier mon binôme Imane pour sa patience et sa ténacité durant les bons et parfois durs moments qu'on a passés ensemble.

Loubna

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A mon défunt père

J'aurais souhaité votre présence en ce moment pour partager ma joie. Tu m'as toujours fait preuve d'amour et d'affection. Tu es toujours présent dans mon esprit et dans mon cœur.

Tu as toujours été pour moi un héritage précieux, puisse le seigneur te réserver une place à ses côtés

A ma chère mère

Tous les mots ne pourraient témoigner de ma gratitude, aussi je te dédie ce mémoire aussi. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mes chers frères et sœurs, qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A tous mes amies

A mon binôme Loubna.

IMANE

Remerciement

AU NOM D'ALLAH CLEMENT LE MISE RICOR DIEUX PAIX ET SALAM SUR SON
PROPHETE MOHAMED

الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا ان هدانا الله

Nous tenons à remercier Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour achever ce travail.

Nous tenons tout d'abord, à remercier notre encadreur **Mme. Bouaziz-Terrachet Souhila** professeur au département de chimie de la faculté des sciences (UMBB) pour avoir accepté de nous encadrer, et qui a proposé le thème de ce mémoire, ainsi qu'elle nous a accompagnés durant toute la période de cette étude avec beaucoup de patience et de savoir-faire. Sa gentillesse, sa disponibilité et ses qualités humaines nous ont été d'une aide précieuse.

Nos remerciements les plus vifs à Monsieur **Nadjib Benosmane**, professeur au département de chimie de la faculté des sciences (UMBB), de nous faire l'honneur de présider ce jury.

Nous remercions également professeur **Karima Dehak**, et docteur **Linda Loucif Seiad** pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à ceux qui, de près ou de loin, nous ont aidés dans la réalisation de ce travail. Nous manifestons aussi notre appréciation et nos remerciements à tout le personnel enseignant pour tous les efforts consentis pour nous offrir une formation de qualité.

Merci à vous tous

Sommaire

Dédicace.....	
Remerciement	
Abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale.....	1
Chapitre 1: étude bibliographique.....	2
I. Introduction.....	4
II. Clou de girofle : présentation	4
III- L'huile essentielle de clou de girofle	5
IV. Compositions chimiques de l'huile essentielles de giroflier.....	6
IV. 1 Les Phénylpropanoïdes	6
IV. 2 Les sesquiterpènes.....	6
IV. 3 Les esters aromatiques	7
IV. 4 Les Aldéhydes aromatiques	7
IV. 5 Les oxydes sesquiterpéniques	7
V. Procédés d'extraction de l'huile essentielle de clou de girofles.....	8
V.1 Distillation – Evaporation	8
V.2 Extraction au moyen d'un solvant.....	9
V.3 Méthodes d'extraction à froid	9
V.4 Extraction par hydrodistillation.....	9
V.5 Extraction par des techniques innovantes	10
VI. Domaines d'utilisation de l'huile essentielle de clou de girofle	10
VI.1 En thérapeutique.....	10

VI.2 En synthèse chimique.....	11
VI.2.1 Synthèse de la vanilline.....	11
VI.2.2 Synthèse des ciments dentaires	11
VI.2.3 Synthèse d'acétate d'eugényle ou éthanoate d'eugényle	12
Chapitre 2: Extraction d'huile essentielle du clou de girofle.....	11
I . Introduction	Erreur ! Signet non défini.
II. L'extraction d'HE du clou de girofle par hydrodistillation.....	14
II. 1 Matériel végétal utilisé	14
II. 2 Réactifs et solvants	14
II. 3 Mode opératoire.....	15
2 ^{ème} étape : le relargage	16
3 ^{ème} étape : La décantation (extraction liquide-liquide)	16
4 ^{ème} étape : Le séchage	17
5ème étape : l'évaporation	18
II. 4 Calcul du rendement en huile essentielle	19
II. 5 La chromatographie sur couche mince (CCM)	19
II. 5.1 Le principe de la CCM	19
II. 5.2 Mode opératoire.....	20
II. 5.2.1 Préparation de la plaque.....	20
II. 5.2.2 L'analyse sur l'UV- visible	20
III- Etude des propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de clou de girofle.....	21
III .1 Les propriétés physiques	21
III .1.1 La densité relative	21
III .1.2 Indice de réfraction.....	22
III .2 Les propriétés chimiques.....	22
III .2.1 Le potentiel hydrogène (pH)	22
III .2.2 Indice d'acide	22

III .2.3 L'indice de saponification :	23
III .2.4 L'indice d'ester.....	24
IV- Etude biologique : Détermination expérimentale de l'Activité antioxydante	25
IV .1 Principe de DPPH	25
IV .2 Préparation des solutions	26
IV .3 Mesure des absorbances.....	26
IV .4 Calcul des pourcentages d'inhibition.....	26
IV .3 Détermination de la concentration efficace (IC50).....	27
IV .4 Détermination du pouvoir anti-radicalaire	27
V- Résultats et discussions.....	27
V .1 Analyse visuelle de l'huile essentielle de clou de girofle extraite.....	27
V .1 Calcul du rendement en huile essentielle	28
V .2 La chromatographie sur couche mince (CCM)	29
V .3 Etude des propriétés physico-chimiques d'HE d'eugénol.....	31
V .3.1 Les propriétés physiques	31
V .3.1.1 La densité :	31
V .3.1.2 L'indice de réfraction	31
V .3.2 Les propriétés chimiques.....	32
V .3.2.1 Le potentiel hydrogène (pH)	32
V .3.2.2 L'indice d'acide.....	32
V .3.2.3 L'indice de saponification	32
V .3.2.4 Indice d'ester	32
V .4 Détermination expérimentale de l'activité antioxydante.....	33
V .4.1 Détermination de la concentration efficace (IC50)	34
VI. Conclusion :	35
Chapitre 3: Etude bio-informatique de quelques propriétés thérapeutiques de l'eugénol.....	34
I. Introduction :.....	37

II- Le Docking moléculaire	37
II.1 Le Docking rigide	37
II.2 Le Docking semi-flexible	37
II. 3 Le Docking flexible	38
III- Etat actuel des connaissances sur les cibles biologiques étudiées	38
III.1 Les NADPH oxydases (Nox)	38
III.2 L'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2)	38
III.3 La cyclooxygénase (COX)	39
III.4 La thymidylate kinase (TMK).....	39
IV- Méthodologie suivie	39
IV.1 Structures de départ.....	39
IV .1.1. Préparation des cibles.....	39
IV.1.2 Préparation de la structure de l'eugénol.....	41
IV.1.3 Protocole de docking.....	41
V- Résultats et discussions	42
Partie A : NADPH oxydase (NOX)	43
I. Visualisation des conformations obtenues.....	43
I.1 Mode de liaisons de l'eugénol	43
Partie B : Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ACE2)	46
I. Visualisation des conformations obtenues du docking avec l'ACE2	46
I.1 Mode de liaisons de l'eugénol avec l'ACE2.....	46
Partie C : Inhibition de la protéine cyclooxygénase 2.....	49
1-Conformations obtenues du docking avec la COX-2	49
2-Mode de liaisons de l'eugénol avec la COX-2	49
Partie D : Inhibition de l'enzyme Thymidylate Kinase (TMK)	52
1-Conformations obtenues du docking avec la TMK	52
2-Mode de liaisons de l'eugénol avec la protéine TMK	52

VI. Conclusion	55
Conclusion générale	57
Références bibliographiques	59
Résumé :	65

Abréviations

% : pourcentage

[O] : oxydation

Å : angstroms

ACE2: enzyme de conversion de l'angiotensine2

Afnor : Association française de normalisation

C° : degré Celsius

CCM : chromatographie sur couche mince

Cl : centilitre

COX: cyclooxygénase

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

G : gramme

Hcl : acide chlhydrique

Ia : indice d'acide

IC50 : Concentration efficace

Ie : indice d'ester

Is : indice de saponification

Mg : milligramme

Min : minute

ml : millilitre

NaDPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

nD²⁰ : indice de réfraction à 20°

NOX: NADPH oxydases

N° : numéro

PAR : Pouvoir Anti Radicalaire

PDB: protein data bank

pH : Potentiel d'hydrogène

R : rendement

Rf: rapport frontal

ROS: reactive oxygen species

TMK: thymidylate kinase

UMBB: université M'Hamed Bougara

UV: ultraviolet

Liste des tableaux

Tableau 1:Noms scientifiques portés par le giroflier.	5
Tableau 2:structures des principaux constituants de l'huile essentielle de clou de girofle.....	8
Tableau 3 : propriétés physico-chimiques des produits chimiques utilisés dans notre procédé d'extraction.....	14
Tableau 4 : caractéristiques visuelles de l'huile essentielle extraite. Erreur ! Signet non défini.	
Tableau 5 : Les solvants, la masse de clou de girofle, utilisés dans ce travail ainsi que la masse d'HE obtenue, la durée de l'expérience et le rendement calculé Erreur ! Signet non défini.	
Tableau 6 : Rapport frontal (Rf) mesuré sur la plaque de silice de la CCM pour les deux huiles, commerciale et extraite.....	31
Tableau 7: concentration (mg/ml) et les valeurs plateaux fixées pour chaque solution.....	33
Tableau 8 Caractéristiques des cibles biologiques étudiées ainsi que leurs ligands expérimentaux.	40
Tableau 9: Structures des ligands expérimentaux. Erreur ! Signet non défini.	
Tableau 10 : résidus du site actif des cibles biologiques étudiées.....	41
Tableau 11 : énergie de liaison (kJ/mol), Liaisons hydrogène, interactions de Van der Waals, et les interactions hydrophobes prédites entre l'eugénol et la NOX. Erreur ! Signet non défini.	
Tableau 12: énergie de liaison (KJ/mol), Liaisons hydrogène, interaction Van der Waals, interaction Alkyl, et interaction hydrophobes prédites entre l'eugénol et l'ACE2.	47
Tableau 13: Energie de liaison (KJ/mol), liaison Hydrogène, interaction de Van der Waals, et les interactions hydrophobes prédites entre l'eugénol et la COX-2.....	50
Tableau 14 : Energie de liaison (KJ/mol), liaison Hydrogène, interaction de Van der Waals, et les interactions hydrophobes prédites entre l'eugénol et la TMK.. Erreur ! Signet non défini.	

Liste des figures

Figure 1 : A- arbre giroflier. B-Fleurs de girofle.....	5
Figure 2: montage de l'hydrodistillation.	10
Figure 3: Synthèse de vanilline.	11
Figure 4: Déshydratation de l'hydrate de zinc.	11
Figure 5: préparation de ciment.....	12
Figure 6: Synthèse d'acétate d'eugényle.....	12
Figure 7 : l'hydrodistillation du clou de girofle.	16
Figure 8:A-montage de la décantation, la phase aqueuse (de couleur laiteuse) est en dessus de la phase organique (transparente). B- Récupération de la phase organique (l'HE de clou de girofle +solvant).	17
Figure 9: A- le séchage (ajout de $MgSO_4$). B- la filtration.	18
Figure 10: L'évaporateur rotatif.	18
Figure 11 : la chromatographie sur la couche mince.....	20
Figure 12 : dosage d'HE de clou de girofle par Hcl.....	23
Figure 13 : Le chauffage à reflux.	24
Figure 14 : Réaction de test DPPH (2,2-diphényl-1-Picryl Hydrazyl)	25
Figure 15 : A- image illustrant la solution DPPH dissout dans l'éthanol. B-spectrophotomètre UV-Vis que nous avons utilisé dans notre travail.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 16 : l'huile essentielle de clou de girofle	28
Figure 17: Résultats de la CCM deux huiles étudiées, commerciale (A) et extraite (B).	30
Figure 18 : évolution du pourcentage d'inhibition de DPPH par les différentes solutions en fonction du temps.	33
Figure 19 : pourcentage d'inhibition de DPPH par les solutions préparées avec l'huile essentielle.	34
Figure 20: interface graphique du logiciel iGemdock.....	42
Figure 21 : superposition des conformations de l'eugénol issues du docking, représentée en stick colorées, et celle du ligand expérimental, représentée en balles et stick vertes. Le backbone de la protéine est représenté en rubans lignes (colorées).....	43
Figure 22: représentation A- 3D et B- 2D du mode de liaison de l'eugénol dans le site actif de la NOX.	45
Figure 23:superposition des conformations de l'eugénol issues du docking et celle du ligand expérimental XX5.	46

Figure 24 : représentation A-3D et B-2D du mode de liaison de l'eugénol dans le site actif de la ACE2.	48
Figure 25 : superposition des conformations de l'eugénol issues du docking et celle du ligand expérimental.	49
Figure 26: représentation A-3D et B-2D du mode de liaison de l'eugénol dans le site actif de la COX-2.	51
Figure 27: superposition des conformations de l'eugénol issues du docking et celle du ligand expérimental 4gfd.	52
Figure 28 : représentation A-3D et B-2D de mode de liaison de l'eugénol dans le site actif de la TMK.	54

Introduction générale

Introduction générale

Notre environnement regorge de nombreuses plantes médicinales très utiles au quotidien pour plusieurs fins. Elles sont une source précieuse pour l'être humain car elles contiennent des composés chimiques qui peuvent être utilisés dans la phytothérapie.

La phytothérapie est une branche de la médecine qui repose sur l'utilisation de plantes médicinales à des fins thérapeutiques. Ces plantes regorgent d'agents antioxydants contenus dans les essences extraites et les huiles essentielles.

L'huile essentielle de clou de girofle, constituée essentiellement d'eugénol (80%), est utilisée depuis des décennies comme anti-inflammatoire, antioxydante, antimicrobienne et antiallergique. Cependant, le mécanisme d'action de cette essence végétale permettant d'expliquer ses nombreuses propriétés thérapeutiques sont encore mal connus.

Les travaux présentés dans ce mémoire sont divisés en deux parties distinctes. La première est une partie expérimentale. Elle porte sur l'extraction, l'étude physico-chimique, la détermination de l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle de clou de girofle. La deuxième partie de ce travail est une partie théorique. Elle porte sur une étude bio-informatique de quelques propriétés thérapeutiques de l'eugénol. L'objectif de cette partie est de comprendre le mode de fonctionnement de l'huile essentielle de clou de girofle au sein de l'organisme. Pour cela, des études de docking moléculaire du principe actif de cette huile avec quatre cibles biologiques impliquées dans les pathologies du stress oxydatif, de l'inflammation, de l'allergie respiratoire et de la croissance des microbes telles que les bactéries.

Après une introduction générale où nous présentons le but du travail, ce mémoire s'articule autour de trois chapitres suivis d'une conclusion générale.

Dans le premier chapitre, nous avons résumé les résultats de notre recherche bibliographique concernant le clou de girofle, la plante, sa répartition géographique, les effets thérapeutiques, ses utilisations traditionnelles et les généralités sur les huiles essentielles.

Le deuxième chapitre illustre le matériel, la démarche expérimentale suivie pour l'extraction d'huile essentielle de clou de girofle, les méthodes employées dans les analyses physico-chimiques, la chromatographie sur couche mince (CCM) et dans la détermination de l'activité antioxydante.

Le troisième chapitre concerne l'étude bio-informatique de quelques propriétés thérapeutiques de l'eugénol en utilisant le docking moléculaire pour déterminer le mode de liaison le plus probable, les interactions ainsi que l'énergie de liaison de l'eugénol avec quatre

cibles biologiques impliquées dans les pathologies du stress oxydatif, de l'inflammation, de l'allergie respiratoire et de la croissance des microbes telles que les bactéries.

Chapitre I :Etude bibliographique

I. Introduction

Malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies souvent mortelles, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos grands-parents [1]. La plupart des espèces végétales, qui poussent dans le monde entier possèdent des effets thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent en douceur sur l'organisme. Ces plantes sont utilisées aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie.

Les huiles essentielles sont un exemple des espèces végétales utilisées dans plusieurs domaines de la vie notamment en thérapeutique. Dans ce chapitre, nous présentons les résultats de notre recherche bibliographique sur l'huile essentielle de clou de girofle. Son obtention, sa production et son utilisation dans différents domaines sont également évoqués.

II. Clou de girofle : présentation

Le clou de girofle, appelé aussi en latin *Syzygium aromaticum*, est une épice obtenue à partir des boutons floraux du Giroflier ou girofle. Ce dernier est une plante de la famille des Myrtaceae et du genre *Syzygium* d'où son nom *Syzygium aromaticum*. Il est cultivé dans de nombreux pays tropicaux, en particulier à Zanzibar, à Madagascar, en Indonésie, au Sri Lanka et en Malaisie. Le girofle est un petit arbre à feuilles persistantes ayant une forme conique ou pyramidale et une taille allant de 12 à 15 mètres de hauteur (Figure 1A).

Les boutons floraux du Giroflier sont de couleurs rouges ont une forme de clou, d'où le nom de « clou de girofle » (figure1B). Ils sont cueillis au moment où ils contiennent le plus d'essence c'est-à-dire lorsqu'ils sont roses et les pétales pas encore ouverts pour donner ce que l'on appelle les clous de girofle. Ces clous sont récoltés après 6 à 8 ans de culture de l'arbre à une cadence de deux fois par an et séchés au soleil jusqu'à ce qu'ils deviennent brun rouge.



Figure 1 : A- arbre giroflier. B-Fleurs de girofle.

Comme beaucoup d'espèces, le giroflier a porté plusieurs noms scientifiques avant d'être *Syzygium aromaticum* [2-4].

Tableau 1:Noms scientifiques portés par le giroflier.

Nom scientifique	Référence
<i>Eugeniacyrophyllata</i> Thunb	[5]
<i>Eugeniacyrophyllus</i>	[6]
<i>Eugenia caryophyllus</i>	[6]
<i>Jambosacyrophyllus</i>	[5]
<i>Myrtuscaryophyllus</i> Spreng	[5]
<i>CaryophyllusAromaticus</i> L.	[6]

Actuellement, les noms *Syzygium aromaticum* et *Eugenia caryophyllus* sont tous les deux employés.

III- L'huile essentielle de clou de girofle

Une huile essentielle, appelée aussi essence végétale, est un extrait liquide, concentré en substances végétales, hydrophobe d'une plante obtenue par extraction. Ces huiles sont utilisées depuis l'antiquité dans la vie courante de nos ancêtres. L'huile essentielle de clou de girofle est l'une des huiles essentielles les plus utilisées en raison de ses nombreuses vertus lui valent le dicton.

L'Huile Essentielle de Clou de girofle est un liquide huileux de couleur jaune légèrement brun très peu soluble dans l'eau et insoluble dans l'eau salée. L'huile essentielle de clou de girofle est Elle peut être obtenue à partir des racines, des rameaux, des feuilles, des fleurs et les fruits mais la composition diffère. En effet, le rendement en huile essentielle est très élevé pour les clous de girofles (15 à 20%) contre 1 % pour les rameaux et 2 à 3 % pour les feuilles [7], ce qui justifie l'utilisation des clous dans l'extraction.

Il est bien de noter que parmi toutes les Huiles Essentielles connues, l'huile essentielle de clou de girofle possède la plus grande capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ROS), ce qui la rend extrêmement efficace dans la lutte contre les radicaux libres. En effet, 30 cl d'Huile Essentielle de clou de girofle équivaut à la capacité antioxydante de 1,3 kg de carottes [8].

IV. Compositions chimiques de l'huile essentielles de giroflier

La composition chimique de l'huile essentielle de clou de girofle dépend fortement des conditions de production et de la qualité d'huile. Elles sont produites à partir des clous renferment à l'état frais environ 15 à 20% d'huile essentielle, dont 78 à 98% d'eugénol, 5,0 et 14,0 % pour le β -caryophyllène et de 4,0 à 15,0 % pour l'acétyleugénol (acétate d'eugényle).

IV. 1 Les Phénylpropanoïdes

L'eugénol, le composé prépondérant dans les huiles essentielles du giroflier, appartient aux phénylpropanoïdes [9]. Ce sont des composés fortement anti-infectieux (bactéricides, virucides et parasitiques). L'eugénol figure parmi les trois « phénols » les plus puissants dans les huiles essentielles et qui sont lecarvacrol, le thymol, et l'eugénol, le moins toxique [10]. L'eugénol est un principe actif qui, à la différence des autres phénols, possède un pouvoir anesthésiant.

IV. 2 Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont de grosses molécules et trop lourdes du coup ne sont pas entraînées dans le distillat dans un processus de distillation. Elles ne sont donc pas quantitativement majoritaires dans les huiles essentielles. Le β -caryophyllène constitue un exemple de sesquiterpène présent dans l'huile essentielle de giroflier (5 à 14 %). Les sesquiterpènes sont des molécules calmantes et anti-inflammatoires [11]. L'huile essentielle de giroflier contient d'autres sesquiterpènes comme l' α -humulène < 1%, camphène 1 %, et le γ -pinène < 1% [12].

IV. 3 Les esters aromatiques

Dans le cas de l'huile essentielle de clou de girofle, les esters aromatiques sont les acétates d'eugényle issu de l'eugénol. Un autre exemple d'ester aromatique est le salicylate de méthyle, qui lui est présent en très petite quantité dans l'huile essentielle (<1%) [12]. Au même titre que l'eugénol, l'acétate d'eugényle possède des propriétés antibactériennes.

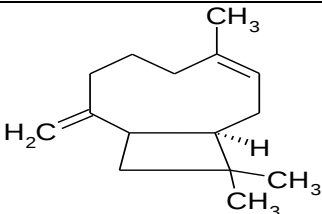
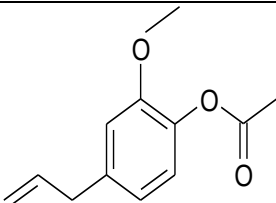
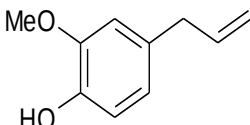
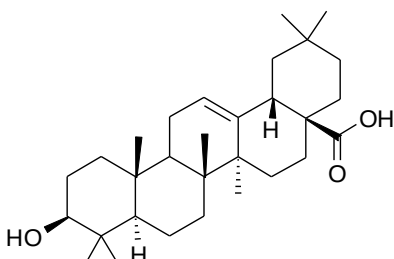
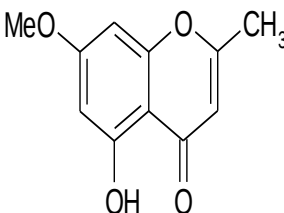
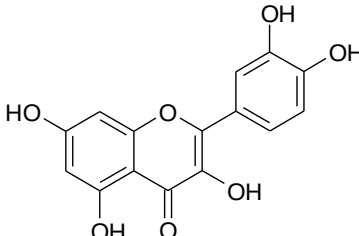
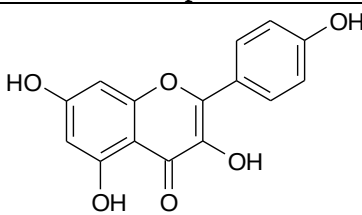
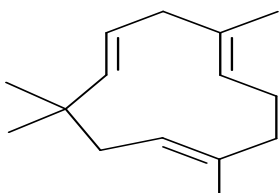
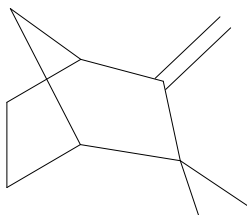
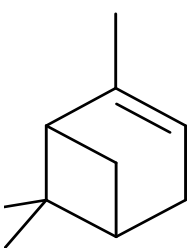
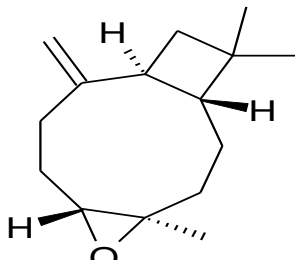
IV. 4 Les Aldéhydes aromatiques

L'oxydation de l'eugénol aboutit à la formation d'un aldéhyde aromatique : la vanilline. C'est par le biais de ce procédé que l'arôme artificiel de la vanille a été synthétisé durant de nombreuses années.

IV. 5 Les oxydes sesquiterpéniques

Ces molécules sont issues de l'oxydation des sesquiterpènes, et sont peu représentées dans les huiles essentielles. Leurs propriétés restent mal connues, mais il s'agirait de molécules anti-inflammatoires et faiblement anxiolytiques [9]. Parmi elles, l'oxyde de caryophyllène qui est présent dans l'HE de clou de girofle (< 1%).

Tableau 2: structures des principaux constituants de l'huile essentielle de girofle.

β-Caryophyllène	Acétate d'eugényle	Eugénol
		
Acide Oléanolique	Eugénine	Quercétol
		
Kaempférol	α-humulène	Camphène
		
γ-pinène	L'oxyde de caryophyllène	
		

V. Procédés d'extraction de l'huile essentielle de clou de girofle

Il existe plusieurs procédés d'extraction des huiles essentielles mais la plus utilisée est la distillation [13]. Parmi ces méthodes, nous pouvons citer :

V.1 Distillation – Evaporation

Dépend de l'intérêt porté aux produits séparés, dans la distillation, on récupère la phase vapeur alors que dans l'évaporation c'est la phase solide ou liquide qui est le produit intéressant.

Co-distillation avec vapeur d'eau, Co-distillation avec un fluide autre que l'eau, évaporation – concentration, Rectification, Distillation sèche. [14]

V.2 Extraction au moyen d'un solvant

Cette technique est utilisée notamment dans le cas de certains organes de végétaux trop fragiles tels que les fleurs qui ne supportent pas l'entraînement à la vapeur ou à l'hydrodistillation. On distingue deux types d'extraction : l'extraction solide/liquide et l'extraction liquide/liquide. Ces techniques peuvent être utilisées à froid (l'enfleurage à froid) ou à chaud (enfleurage à chaud).

V.3 Méthodes d'extraction à froid

Cette méthode est utilisée dans l'extraction d'essence agrumes contenus dans les zestes. Elle consiste à frotter sur des parois garnies de picots les fruits. L'huile est recueillie à l'aide d'une éponge puis soigneusement filtrée.

V.4 Extraction par hydrodistillation

C'est une méthode très ancienne et facile à réaliser. Dans ce procédé, le matériel végétal est immergé directement dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité, Figure 2. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

La durée d'une hydrodistillation peut atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe sur le rendement mais également sur la composition de l'extraction [15].

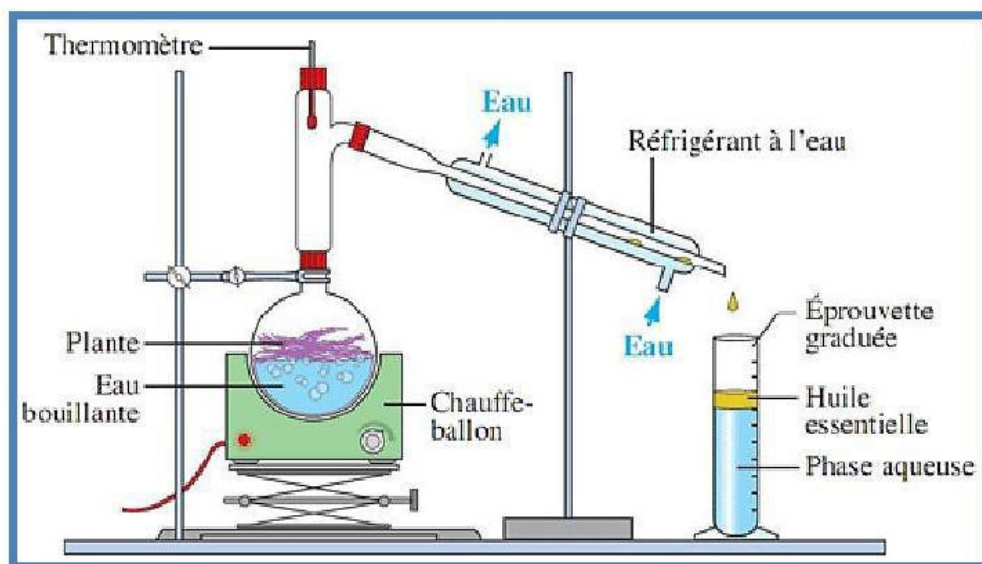


Figure 2: montage de l'hydrodistillation.

V.5 Extraction par des techniques innovantes

Ce sont des méthodes modernes qui répondent aux exigences actuelles en termes de durabilité, de répétabilité, de respect de l'environnement et de vitesse. Parmi ces méthodes nous pouvons citer l'extraction par des solvants supercritiques, l'Extraction par Détente Eclair [16], la Détente Instantanée Contrôlée [17-18], extraction par ultrasons [19]. Et Extraction assistée par Micro-ondes [20-22].

VI. Domaines d'utilisation de l'huile essentielle de clou de girofle

VI.1 En thérapeutique

L'huile essentielle de clou de girofle est un utilisé comme un remède de grand-mère dans plusieurs domaines de la vie courante. Il soulage les douleurs musculaires, les rhumatismes et il a de propriétés anti-inflammatoires, redonne de l'énergie et permet de lutter contre la fatigue. Il est utilisé comme un antidépresseur. Il est également utilisé contre les douleurs, la sciatique, les problèmes rhumatologiques, comme antibactérien, antifongique, antioxydant, anesthésiant local dans le soin des plaies, Anti-infectieuse, analgésiques, antalgique [23].

Cependant, malgré les nombreux effets thérapeutiques de L'huile essentielle de clou de girofle, il faut rester prudent dans son utilisation. En effet, un surdosage de L'huile essentielle de clou de girofle peut entrainer des troubles gastro-intestinaux légers, tels que des vomissements, des nausées ou des diarrhées [24]. Elle peut aussi être irritante pour les voies

respiratoires ce qui oblige à la diluer pour l'appliquer sur la peau. De plus, les personnes hypertendues doivent l'utiliser avec la plus grande prudence car elle peut augmenter la tension artérielle. [9]

VI.2 En synthèse chimique

VI.2.1 Synthèse de la vanilline

La structure de la vanilline a été déterminée en 1874 par Tiemann et Hermann, et a été synthétisée pour la première fois par Erlenmeyer en 1876 à partir de l'eugénol. Il s'agit donc d'hémisynthèses (synthèses réalisées à partir de composés naturels possédant déjà une partie de la molécule visée). 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 (Figure3) [25].

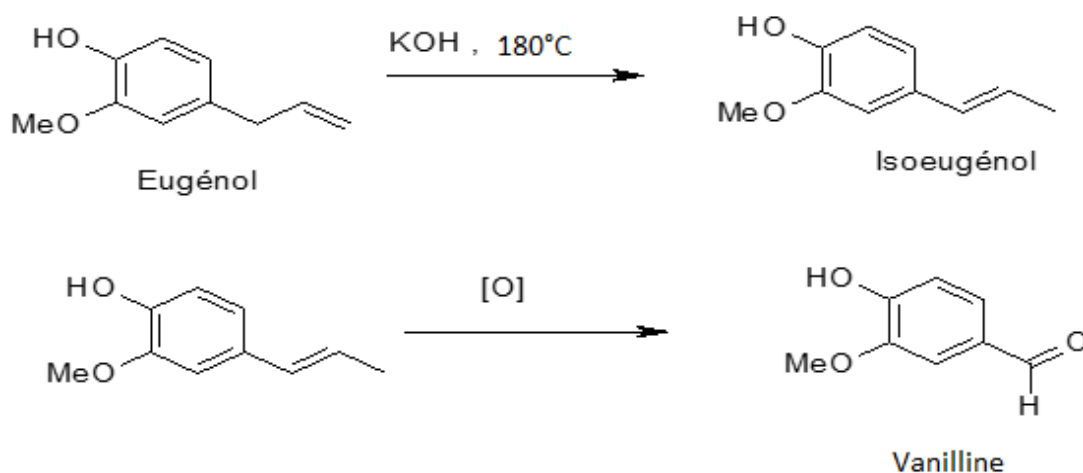


Figure 3: Synthèse de vanilline.

VI.2.2 Synthèse des ciments dentaires

La synthèse des ciments dentaires s'en mélangeant l'oxyde de zinc et l'eugénol [26]. La réaction suivante est utilisée pour déshydrater l'hydrate de zinc à une température d'environ 300 °C, en utilisant la réaction suivante (Figure4).

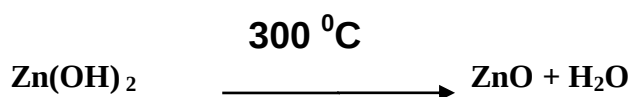


Figure 4: Déshydratation de l'hydrate de zinc. [26]

Le ciment obtenu par la réaction de chélation qui se produit entre les deux groupements méthoxyle et l'atome de zinc central (Figure5). [27]

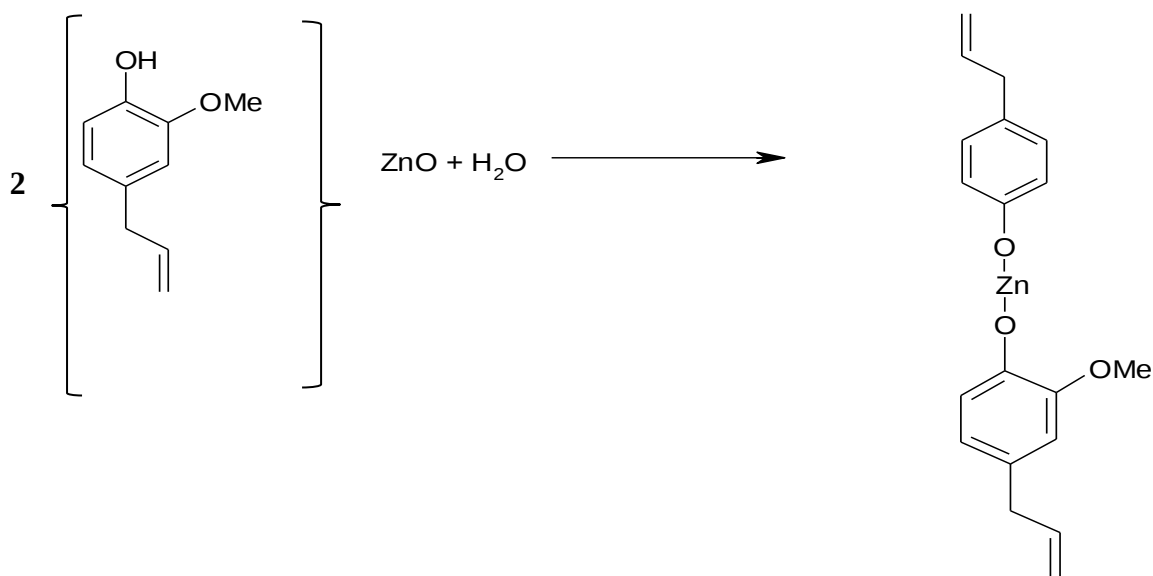


Figure 5: préparation de ciment. [27]

VI.2.3 Synthèse d'acétate d'eugényle ou éthanoate d'eugényle

L'acétate d'eugénol, aussi connu sous le nom d'éthane d'eugénol, est un ester présent naturellement dans le clou de girofle. Il n'existe pas d'acétate d'eugénol dans le commerce. En conséquence, la production d'ester implique une réaction de transformation impliquant l'anhydride acétique et l'huile essentielle de clou de girofle (Figure 6). [28]

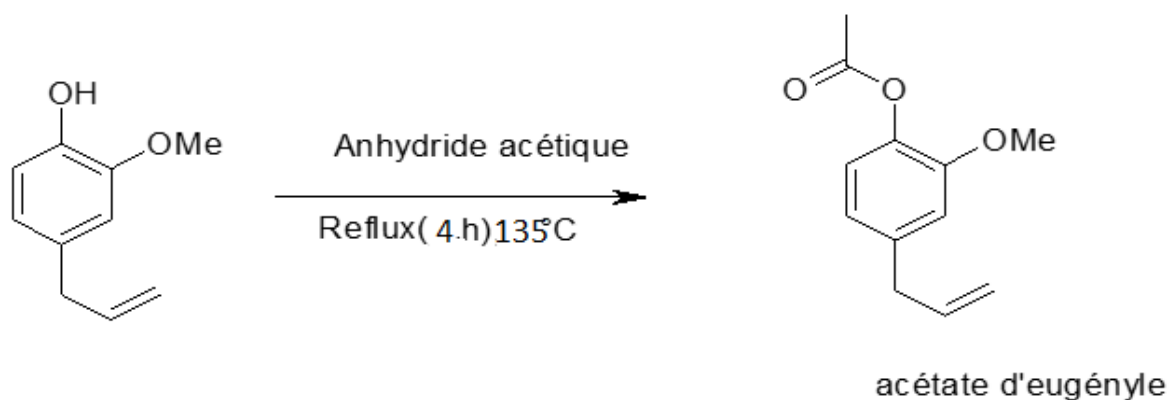


Figure 6: Synthèse d'acétate d'eugényle. [28]

Chapitre II : Extraction d'huile essentielle du clou de girofle

I. Introduction

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I, l'huile essentielle de clou de girofle est utilisée depuis l'antiquité pour ses nombreuses vertus culinaires et médicinales. Ses propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes font d'elle le remède miracle et le produit phare de toute la planète. Cette huile essentielle regorge d'antioxydants naturellement actifs qui permettent de piéger les radicaux libres responsables de toutes les maladies pouvant toucher l'organisme.

Dans ce chapitre, nous avons utilisé l'hydrodistillation pour extraire l'huile essentielle de clou de girofle en utilisant trois solvants extracteurs différents. Pour vérifier la qualité et la pureté de l'huile extraite, nous avons utilisé plusieurs moyens d'analyse et caractérisation comme la chromatographie sur couche mince (CCM), des analyses physico-chimiques (densité, indice de réfraction, PH, indice d'acide, indice de saponification, indice d'ester). Les résultats obtenus rentrent dans la fourchette de valeurs recommandées par les normes AFNOR (Association française de normalisation). Dans le but de vérifier le pouvoir antioxydant de l'huile extraite dans le cadre de ce travail, nous avons déterminé son activité de piégeage du radical DPPH (diphényl-picrylhydrazyle).

II. L'extraction d'HE du clou de girofle par hydrodistillation

II. 1 Matériel végétal utilisé

La plante médicinale utilisée dans ce travail est le clou de girofle sous forme de poudre. Elle est importée de l'étranger et est disponible sur le marché algérien en raison de sa grande utilisation par la population dans plusieurs domaines de la vie notamment en thérapeutique, le cosmétique et en chimie organique.

II. 2 Réactifs et solvants

Les produits et les solvants utilisés dans l'extraction de l'huile essentielle de clou de girofle ainsi que les propriétés physico-chimiques comme la masse molaire, la densité, la solubilité, la température d'ébullition et la miscibilité à l'eau sont listées dans le tableau 3.

Tableau 3 : propriétés physico-chimiques des produits chimiques utilisés dans notre procédé d'extraction

Produits et solvants :	M (g/mol)	Densité (g/cm ³)	Température d'ébullition	Solubilité	Miscibilité à l'eau
L'eau distillée	18.015	0.98471	100		
NaCl	58.44	2.16		Soluble	Miscible
MgSO ₄	120.366	2.66		Soluble	Miscible
Dichlorométhane	84.93	1.34	40	Peu soluble dans l'eau	Non miscible
Cyclohexane	84.16	0.89	80	Insoluble dans l'eau	Non miscible
Méthanol	32.04	0.791	65	Soluble	Miscible
Eugénol	168	1.039-1.045	253	Faible et décroît avec la T	Non miscible

II. 3 Mode opératoire

1^{er} étape : Extraction par hydrodistillation

L'extraction de l'huile essentielle de clou de girofle a été faite par la méthode d'hydrodistillation, que nous avons défini dans le chapitre I. Nous avons utilisé les boutons floraux de clou de girofle secs que nous avons mixé à l'aide d'un moulin à café. Pour cela, nous avons effectué trois essais avec trois solvants extracteurs différents.

Dans le premier essai, un mélange de 10 g de clou de girofle dans 200 ml d'eau distillée et quelques grains de pierre ponce (utilisé pour régler l'ébullition) est chauffé jusqu'à ébullition pendant 3 heures dans un ballon de 250ml surmonté d'un réfrigérant. Dans le deuxième, nous avons chauffé un mélange de 20 g de matière végétale et 200 ml d'eau distillée et quelques grains de pierre ponce jusqu'à ébullition pendant 3h30min heure dans un ballon de 250 ml surmonté d'un réfrigérant. Dans le troisième essai, un mélange de 30 g de clou de girofle et 200 ml d'eau distillée et quelques grains de pierre ponce est chauffé jusqu'à ébullition pendant 4 heure dans un ballon de 250 ml surmonté d'un réfrigérant. Dans les trois essais, nous avons veillé à ce que la température ne dépasse pas 100 °C. A la fin des manipulations, nous avons récupéré un liquide de couleur blanchâtre. Le montage de l'hydrodistillation est présenté sur la figure 7.



Figure 7 : l'hydrodistillation du clou de girofle.

2ème étape : le relargage

A l'issue de l'étape d'hydrodistillation, nous avons récupéré, dans chaque essai, un liquide de couleur blanchâtre constitué d'eau, d'eugénol et d'acétyle d'eugénol. Afin de rendre les composés organiques moins solubles dans l'eau, nous avons introduit 10 g de NaCl dans un erlenmeyer contenant le distillat. Cette étape, appelée le relargage, nous permet de séparer le distillat en deux phases non miscibles constituées d'une phase aqueuse supérieure (l'eau salée) et d'une phase organique inférieure (l'huile essentielle et le solvant extracteur). Les deux phases ainsi obtenues sont facilement séparables par décantation.

3ème étape : La décantation (extraction liquide-liquide)

Afin de séparer les deux phases obtenues dans l'étape précédente, nous les avons introduits dans une ampoule à décanter avec 10 ml du solvant extracteur, le dichlorométhane pour le premier essai et le cyclohexane pour le deuxième essai. Dans les deux essais, après le temps de décantation, nous avons récupéré la phase organique contenant l'huile essentielle et le solvant extracteur (Figures 8A et 8B). Dans les deux essais, cette opération est répétée deux fois pour faire passer le maximum d'huile essentielle dans le solvant extracteur. Dans le troisième essai, nous avons introduit le distillat dans un erlenmeyer avec 30 ml de méthanol. Le mélange est introduit dans l'évaporateur rotatif à 90 °C pendant 5 minutes. Cette étape nous a permis de d'obtenir deux phases distinctes, une phase organique inférieure qui est

l'huile essentielle et une phase supérieure, c'est la phase aqueuse. A l'aide d'une ampoule à décanter, nous avons récupéré la phase inférieure qui est l'huile essentielle de clou de girofle.

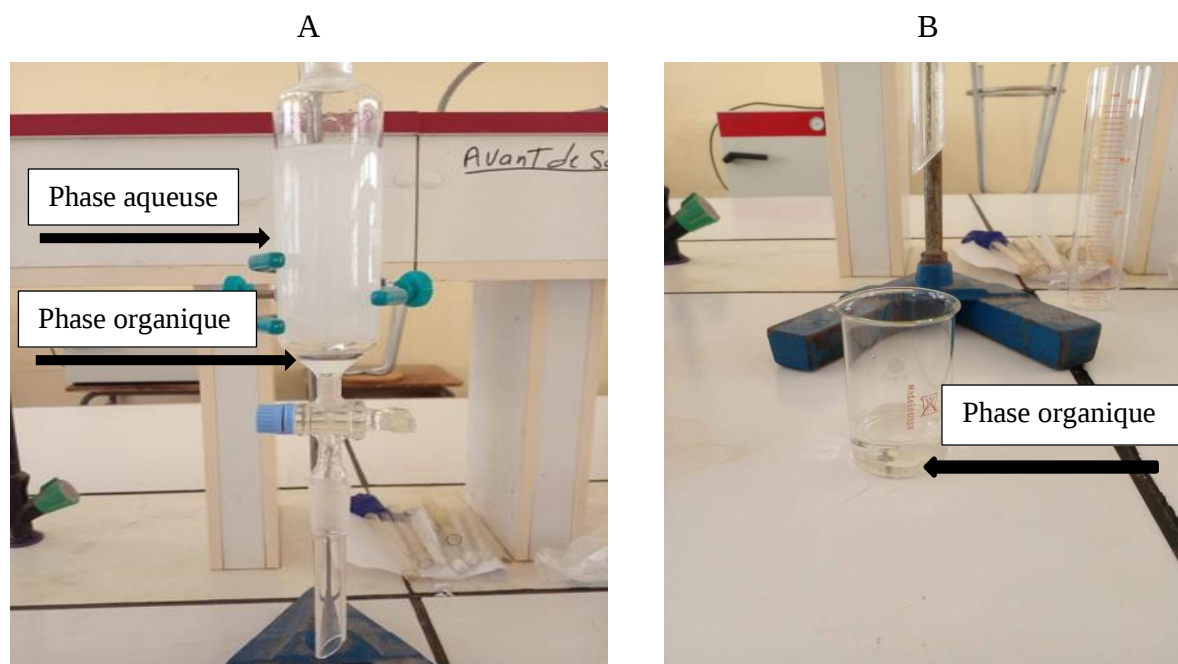


Figure 8: A-montage de la décantation, la phase aqueuse (de couleur laiteuse) est en dessus de la phase organique (transparente). B- Récupération de la phase organique (l'HE de clou de girofle + solvant).

4ème étape : Le séchage

Afin d'éliminer les traces d'eau contenue dans la phase organique, constituée d'huile essentielle de clou de girofle et de solvant extracteur, que nous avons récupérée dans les deux premiers essais, nous l'avons séché en utilisant un agent desséchant, le sulfate de magnésium (Figure 9A), puis filtrée pour éliminer les cristaux de sulfate de magnésium (Figure 9B). Nous avons réalisé les mêmes étapes avec l'huile essentielle récupérée dans le troisième essai. Après filtrage, nous avons récupéré un liquide dense de couleur jaune pâle qui est l'huile essentielle de clou de girofle.

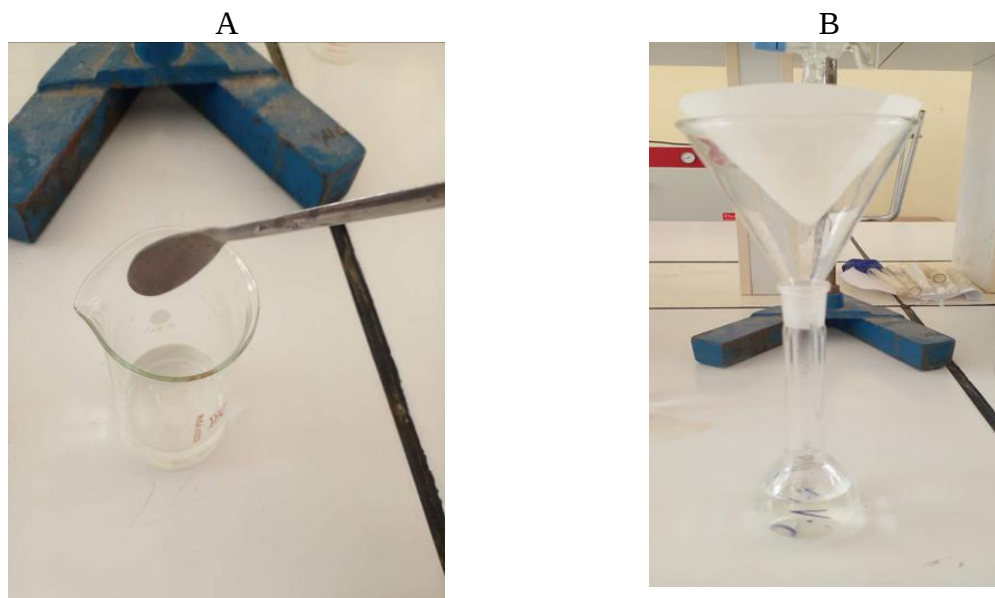


Figure 9: A- le séchage (ajout de MgSO_4). B- la filtration.

5ème étape : l'évaporation

Par la suite, à l'aide d'un évaporateur rotatif de type RVO 004 à température 90°C , nous avons récupéré l'huile essentielle de clou de girofle à partir des phases organiques récupérées dans les deux premiers essais (figure 9).



Figure 10: L'évaporateur rotatif.

II. 4 Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse d'huile extraite et la masse du matériel végétal utilisé. Dans ce travail, nous avons calculé le rendement pour chaque essai afin de voir l'efficacité des solvants utilisés. Le rendement, exprimé en pourcentage (%), est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{m_{HE}}{m_P} * 100 \quad (1)$$

Avec : R : rendement en huile essentielle

m_{HE} : masse d'huile essentielle

m_P : masse de la plante

II. 5 La chromatographie sur couche mince (CCM)

II. 5.1 Le principe de la CCM

Pour effectuer la séparation d'un mélange de composés liquides, le mélange est déposé sur une plaque rigide recouverte d'un solide absorbant poreux appelé la phase stationnaire (Figure 11). La phase stationnaire est généralement faite d'une plaque en verre, de plastique ou d'aluminium recouverte d'une mince couche poreuse de silice (le plus utilisé), d'alumine ou de cellulose. Le bas de la plaque est mis en contact avec un solvant, appelé la phase mobile ou l'éluant, dans la cuve à chromatographie qui migre par capillarité sur la phase stationnaire. Selon les interactions polaires entre le composé et l'éluant choisi, les composés migrent plus ou moins haut sur la plaque et peuvent être ainsi séparés les uns des autres [1].



Figure 11 : la chromatographie sur la couche mince.

II. 5.2 Mode opératoire

II. 5.2.1 Préparation de la plaque

Dans ce travail, nous avons utilisé des plaques CCM gel de silice avec un support en aluminium. L'éluant que nous avons utilisé est un mélange de cyclohexane et d'éthanol avec un rapport de 5 : 1 . Après repérage de la ligne de départ, nous avons introduit deux gouttes de l'huile de clou de girofle commerciale sur le point A et deux gouttes de l'huile essentielle de clou de girofle extraite sur le point B. Par la suite, la plaque est introduite dans un bécher, contenant l'éluant que nous avons préparé, couvert d'un verre de montre. Une fois la phase mobile est arrivée à une ligne située à 1 cm du bord de la plaque (appelée front de l'éluant), la plaque est retirée du bécher et est séchée à l'air.

II. 5.2.2 Révélation sur l'UV

Une fois la plaque séchée, pour la révélation, nous avons utilisé la technique de visualisation sous une lampe UV. L'identification des constituants de l'huile essentielle a été faite par comparaison avec l'huile essentielle commerciale de clou de girofle et des rapports frontaux (R_f) obtenus de la littérature [2].

Ainsi, les composés alcooliques terpéniques et les pinènes tels que : α -terpineol, α -pinène, limonène, p-cymène, terpinène ont des R_f compris entre 0.2 et 0.5. Les esters tels que les acétates donnent des valeurs de R_f supérieures à 0.6.

Pour calculer le R_f , nous avons utilisé la relation suivante :

$$R_f = \frac{d}{D} \quad (2)$$

Avec :

d : la hauteur atteinte par l'espèce chimique

D : la hauteur atteinte par l'éluant (appelée aussi front de l'éluant)

III- Etude des propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de clou de girofle

III .1 Les propriétés physiques

La détermination des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles constitue un moyen de vérification et de contrôle de leur qualité.

III .1.1 La densité relative

La densité des huiles essentielles est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique d'un autre corps pris comme référence à la même température (20°C). Pour les liquides et les solides, le corps de référence est l'eau pure. Ce paramètre physique constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une huile essentielle et peut donner un aperçu sur la naturalité des produits ainsi que l'altération de ces derniers. D'après la norme AFNOR la densité relative des huiles essentielles est comprise entre 1,03 et 1,065 à 20°C. Dans ce travail, nous avons déterminé la densité de notre huile essentielle au moyen d'une éprouvette de 10 ml. Ainsi, le volume prélevé est de 10 ml pour l'huile et l'eau distillée. Par la suite la densité a été calculée en utilisant la relation suivante

$$d = \frac{m_1 - m_0}{m - m_0} \quad (3)$$

Avec

m_1 : est la masse en g de l'éprouvette contenant 10ml d'huile essentielle

m_0 : est la masse en g de l'éprouvette vide

m : est la masse en g de l'éprouvette contenant 10ml d'eau distillée.

III .1.2 Indice de réfraction

L'indice de réfraction (I_r) reflète le changement de direction subi par un rayon lumineux passant d'un milieu optique à un autre (par exemple de l'air à l'huile essentielle). D'après la norme AFNOR l'indice de réfraction est situé entre 1,460-1,476. La détermination de l'indice de réfraction de notre huile essentielle, a été réalisée en utilisant un refractomètre de type HI 96801. Cet indice est mesuré à une température égale à 22.6 °C. Pour calculer la valeur correspondante 20°C, nous avons utilisé la relation (4).

$$I_r^{20} = I_r^T + 0.0045 * (T - 20) \quad (4)$$

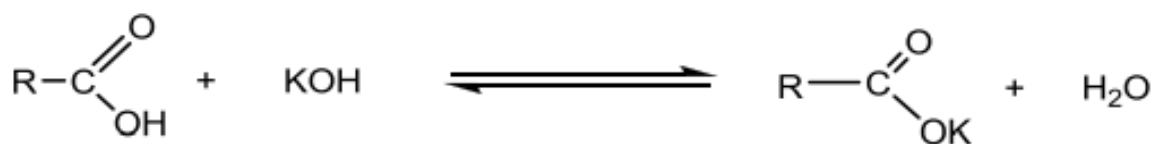
III .2 Les propriétés chimiques

III .2.1 Le potentiel hydrogène (PH)

Le pH est une grandeur chimique sans unité. Il permet de mesurer l'activité de l'ion hydrogène dans une solution. Cette grandeur nous renseigne sur l'acidité ou la basicité d'une solution. Rappelons que, d'après la norme AFNOR, le pH d'une huile essentielle est compris entre 4 et 6. Nous avons déterminé le pH de notre huile à l'aide d'un PH-mètre de type HANNA.

III .2.2 Indice d'acide

L'indice d'acide correspond à la masse nécessaire d'hydroxyde de potassium KOH (en milligramme) qu'il faut ajouter à un gramme d'huile, afin de neutraliser tous les acides libres qu'elle contient [3]. L'équation de la réaction traduisant ce dosage s'écrit :



Ce paramètre nous renseigne sur la fraîcheur d'une huile essentielle et nous permet de déterminer son altération, de vérifier sa qualité et sa dégradation avec le temps durant le stockage [4]. Il est considéré comme l'un des critères de la pureté d'une huile essentielle [5]. Il varie en fonction de la température à laquelle l'analyse est faite. Cet indice peut être utilisé pour toutes les huiles essentielles, sauf pour celles qui sont riches en lactones. La norme

AFNOR (Association Française de Normalisation) de l'indice d'acide est située entre 0.84 et 3.74 [3].

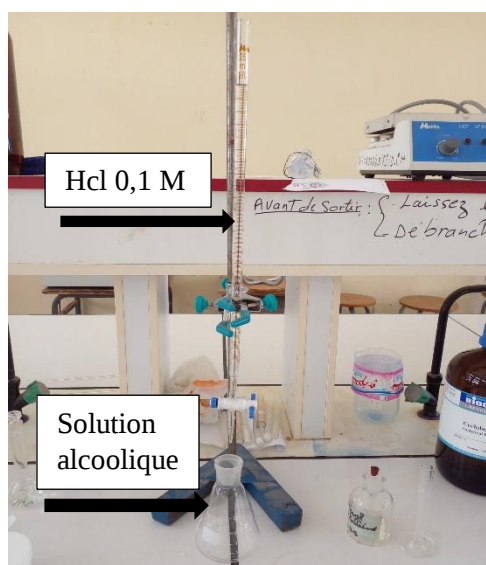


Figure 12 : dosage d'HE de clou de girofle par Hcl

Ainsi, pour déterminer l'indice d'acide, nous avons titré une solution contenant 1 g de notre huile essentielle et quelques gouttes de l'indicateur coloré, la phénolphthaléine, par une solution d'hydroxyde de potassium alcoolique KOH de concentration 0.114 mol/l.

III .2.3 L'indice de saponification :

L'indice saponification est la masse, en milligramme, de potasse (KOH) nécessaire pour saponifier les esters et neutraliser les acides libres non estérifiés dans 1 g d'huile essentielle. Son principe repose sur le chauffage du mélange contenant 1g d'huile essentielle et un volume connu de solution de KOH alcoolique puis un dosage avec l'acide chlorhydrique HCl. Les équations des réactions pouvant avoir lieu dans ce dosage sont les suivantes :



Par la suite, l'indice de saponification I_s est calculé par la formule suivante :

$$I_s = \frac{(V_T - V_{HCl}) * (C_{HCl} * 56.1)}{m} \quad (5)$$

Où

V_T : le volume de HCl versé au témoin (solution KOH)

V_E : volume de HCl versé pour neutraliser la solution (HE+KOH) en ml

C_{HCl} : concentration d'HCl (0.1M)

Dans ce travail, pour déterminer l'indice de saponification de notre huile essentielle, nous avons préparé une solution contenant 1 g de l'huile essentielle et de 25 ml de KOH alcoolique, préalablement préparée. Cette solution a été chauffée à l'aide d'un chauffe-ballon. Le mélange est alors porté à reflux pendant 30-45min. Une fois cette durée est écoulée, nous avons rajouté quelques gouttes de phénolphtaléine. Par la suite, le mélange obtenu est traité avec l'acide chlorhydrique de concentration 0.1M jusqu'à la disparition de la couleur rose. Le volume versé de l'acide chlorhydrique, appelé échantillon (V_E), est noté. Le volume témoin (V_T) a été déterminé en réalisant le même test à blanc, c'est dire avec une solution contenant uniquement du KOH alcoolique.

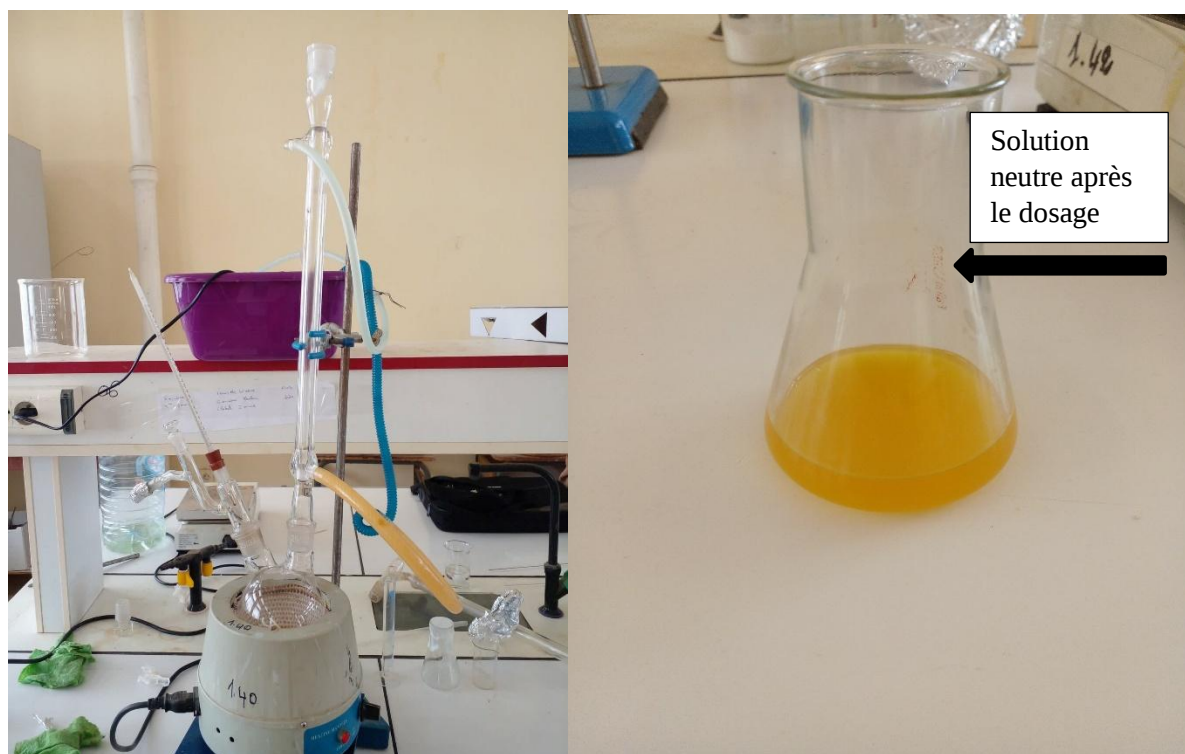
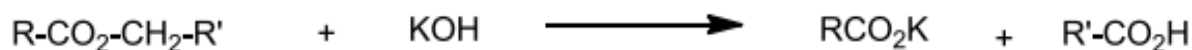


Figure 13 : Le chauffage à reflux.

III .2.4 L'indice d'ester

L'indice d'ester est le nombre de milligramme de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras estérifiés contenus dans 1g d'huile. L'équation de la réaction qui a lieu est la suivante :



L'indice d'ester permet de contrôler la qualité d'huile essentielle. Il est bien de noter que, la grande quantité d'esters renfermés dans une huile essentielle confirme la bonne qualité d'huile essentielle. Cet indice est déduit de l'indice de saponification (Is) et l'indice d'acide (Ia) selon la relation :

$$Ie = Is - Ia \quad (6)$$

IV- Etude biologique : Détermination expérimentale de l'Activité antioxydante

IV .1 Principe de DPPH

L'activité anti-oxydante représente la capacité qu'a un produit à réduire les radicaux libres. La détermination expérimentale de cette grandeur biologique se fait le plus souvent par la méthode de DPPH. Ce dernier, de nom chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle), est un radical libre présentant une couleur violette foncée à l'état de radical et une coloration jaune pâle lorsqu'il est piégé par les antioxydants . Il est l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation entre la structure et l'activité anti-oxydante des composés phénoliques [6]

Il permet de mesurer la capacité d'un antioxydant (composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH^o par transfert d'un atome d'hydrogène (figure 14).

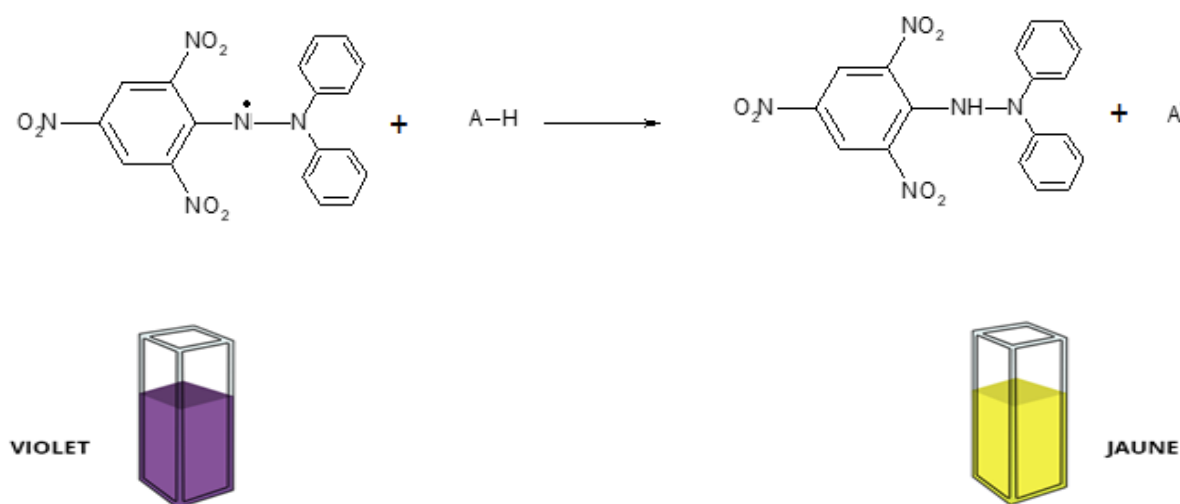


Figure 14 : Réaction de test DPPH (2,2-diphényl-1-Picryl Hydrazyl)

IV .2 Préparation des solutions

Nous avons fait dissoudre 4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol. Cette solution est conservée à l'obscurité et au frais pendant deux heures et demie (Figure 15A). Par la suite, nous avons préparé la solution mère en introduisant 1 g d'huile essentielle dans 25 ml d'éthanol. A partir de cette solution, nous avons préparé, par dilutions dans l'éthanol, plusieurs solutions dites filles de concentrations différentes. Ces solutions sont conservées à l'obscurité et au frais.

IV .3 Mesure des absorbances

Dans des tubes à essais, nous avons introduit 3 ml de la solution de DPPH et l'éthanol. A l'aide d'un spectrophotomètre de type vis -7220G (Figure 15B), nous avons suivi l'absorbance de la solution témoin constituée de DPPH dissout dans l'éthanol à 517 nm. La lecture s'est faite chaque minute jusqu'à atteindre une valeur constante.

Dans le but d'étudier l'inhibition du DPPH par notre huile essentielle, nous avons préparé des mélanges constitués de 1ml de chaque solution fille avec 3 ml de la solution DPPH que nous avons introduit dans des cuves appelées échantillons puis suivi l'absorbance de la même manière que la solution témoin.

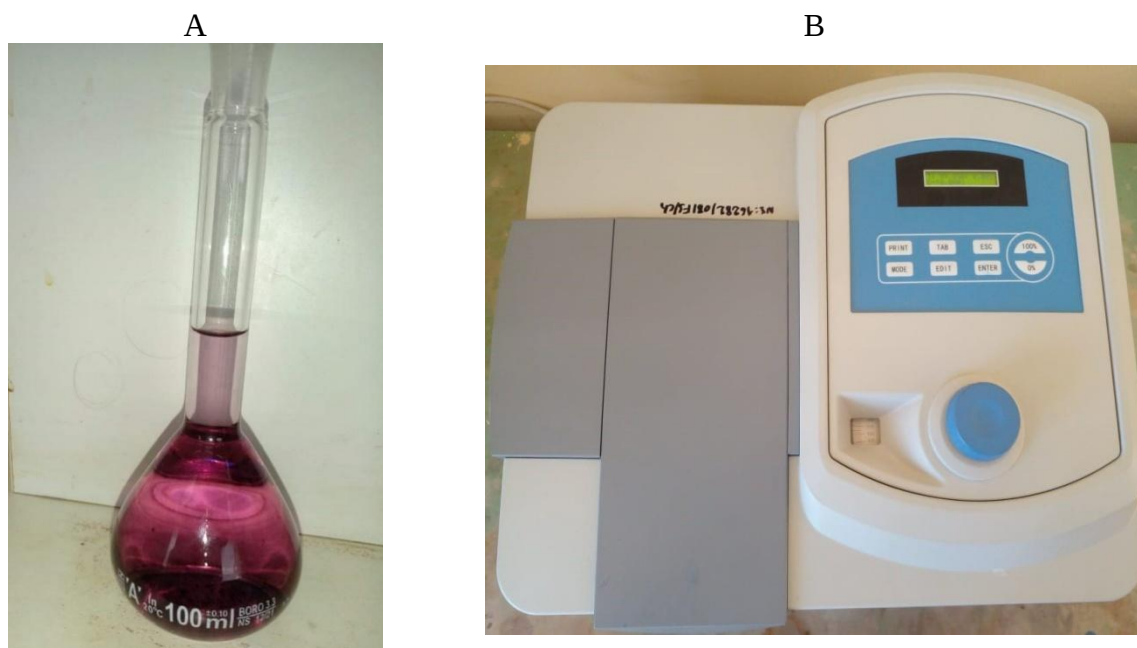


Figure 15 : A- image illustrant la solution DPPH dissout dans l'éthanol. B-spectrophotomètre UV-Vis que nous avons utilisé dans notre travail.

IV .4 Calcul des pourcentages d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition (%) du radical libre DPPH a été calculé avec la formule suivante : [7]

$$PI\% = 100. \frac{(A_{Témoin} - A_{HE})}{A_{Témoin}} \quad (7)$$

PI% : pourcentage d'inhibition exprimé en (%)

$A_{témoin}$: Absorbance de la solution de DPPH sans l'huile

A_{HE} = Absorbance de la solution du DPPH en présence d'huile

IV .3 Détermination de la concentration efficace (IC50)

L'**IC50** est un paramètre qui définit la concentration nécessaire de l'huile essentielle à inhiber de 50% l'activité du radical **DPPH•**. Plus la valeur de l'**IC50** est petite plus l'huile essentielle est considérée comme un antioxydant puissant.

IV .4 Détermination du pouvoir anti-radicalaire

Le pouvoir anti-radicalaire relatif (APR) est inversement proportionnel à la concentration efficace IC50 [8]

$$APR = \frac{1}{IC50} \quad (8)$$

V- Résultats et discussions

V .1 Analyse visuelle de l'huile essentielle de clou de girofle extraite

Selon AFNOR, les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes (huile végétales).



Figure 16 : l'huile essentielle de clou de girofle

Tableau 4 : caractéristiques visuelles de l'huile essentielle extraite.

	Aspect	Couleur	Odeur
Norme AFNOR	Liquide limpide, fluide et mobile	Jaune très pâle à transparent	Fraîche et Camphrée
Huile essentielle de clou de girofle	Liquide limpide	Jaune Claire	Forte et Camphrée caractéristique de clou de girofle

Les résultats portés dans ce tableau montrent que notre huile répond aux normes d'une huile de bonne qualité.

V .1 Calcul du rendement en huile essentielle

Dans ce travail, nous avons effectué l'extraction de l'huile essentielle de clou de girofle en utilisant trois solvants différents à savoir le dichlorométhane (solvant polaire), le cyclohexane (solvant apolaire) et le méthanol (solvant polaire). Afin de vérifier l'efficacité de ces solvants, nous avons calculé le rendement pour chaque essai. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 4 : Les solvants, la masse de clou de girofle, utilisés dans ce travail ainsi que la

	Solvant	Masse de clou de girofle (g)	Masse d'HE obtenue (g)	Durée (heure)	Rendement (%)
1 ^{er} essai	Dichlorométhane	10	0.435	3	4.35
2 ^{eme} essai	Cyclohexane	20	0.836	3h30min	4.18
3 ^{eme} essai	Méthanol	30	1.504	4	5.01

masse d'HE obtenue, la durée de l'expérience et le rendement calculé

L'analyse des résultats reportés dans ce tableau montre que le meilleur rendement est obtenu avec le méthanol, ce qui confirme la bonne solubilité de l'huile essentielle de clou de girofle dans ce solvant. Ce résultat est en bon accord avec les résultats de la littérature qui ont montré que le méthanol est le solvant le plus approprié pour une bonne récupération des composés phénoliques [9]. Néanmoins, la comparaison avec les résultats de la littérature montre que nous avons obtenu un rendement faible (5.01 % contre 11 %) [10]. A noter que le rendement d'extraction d'une huile essentielle dépend de plusieurs facteurs notamment la zone géographique de récolte, la composition du sol, la période de récolte, le stade végétatif de la plante et la méthode d'extraction utilisée [9]. Il convient de noter également que l'hydrodistillation dépend de plusieurs facteurs tels que : le temps d'extraction, la masse du matériel végétal, le volume d'eau....

V.2 La chromatographie sur couche mince (CCM)

A la fin de la chromatographie, la plaque a été sortie de l'éluant puis séchée à l'air. Le résultat est représenté sur la figure 17 et est résumé dans le tableau 6

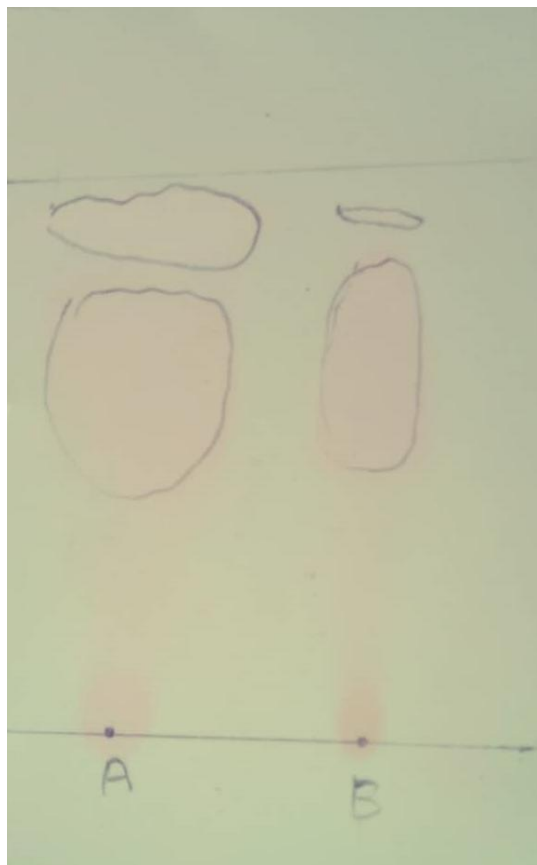


Figure 17: Résultats de la CCM des deux huiles étudiées, commerciale (A) et extraite (B).

Après la révélation UV, nous remarquons la présence deux taches de tailles différentes dans le cas des deux huiles étudiées, commerciale (A) et extraite (B). Les valeurs des rapports frontaux sont consignées dans le tableau 6. Les premières tâches de grandes dimensions, de rapports frontaux proches de 0.5, pour les deux huiles correspondent à l'eugénol puisqu'il est plus adsorbé sur la couche mince donc il migre moins que l'acétate d'eugényle. Les deux autres taches, plus haut sur la colonne des deux produits introduits, correspondent à de l'acétate d'eugényle. Il est bien de noter que la tâche d'en haut obtenue pour l'huile extraite est plus petite que celle de l'huile commerciale ce qui signifie qu'elle contient moins d'acétate d'eugényle. Ceci confirme la pureté de notre huile extraite et sa contenance en eugénol.

Tableau 5 : Rapport frontal (Rf) mesuré sur la plaque de silice de la CCM pour les deux huiles, commerciale et extraite.

Huile	Tache 1		Tache 2	
	Rf	Type de produit	Rf	Type de produit
L'huile extraite	0.47	Eugénol	0.9	Acétyleugénol
L'huile commerciale	0.45	Eugénol	0.95	Acétyleugénol

V .3 Etude des propriétés physico-chimiques d'HE d'eugénol

L'étude des propriétés physico-chimiques de nos extraits nous permet de faire une comparaison avec les résultats de la littérature et de vérifier la pureté de notre extrait.

V .3.1 Les propriétés physiques

V .3.1.1 La densité relative

La densité est un paramètre physique nécessaire pour vérifier la pureté d'une huile essentielle. Dans ce travail, nous avons déterminé la densité de l'huile extraite en utilisant la relation (3). La valeur que nous avons obtenue est 0.975 à 22.6°C. La correction de la densité à la température d'étalonnage de 20°C est faite en utilisant la relation (8)

$$d_{20}^{20} = d_{20}^t \pm 0.06(t - 20) \quad (8)$$

La valeur de la densité corrigée est de l'ordre de 1.035 à la température de 20°C. Ce résultat est en accord avec la norme AFNOR NFT7, dont la valeur reportée est comprise entre 1,03 et 1,065 à 20°C. Cependant, notre résultat est légèrement différent de la valeur reportée dans la littérature qui oscille entre 1.065 à 1.066 [10]. Cette différence dans la valeur de la densité peut s'expliquer par la présence de traces de solvant dans l'huile extraite.

V .3.1.2 L'indice de réfraction

Pour déterminer l'indice de réfraction de notre huile essentielle, nous avons utilisé un réfractomètre de type HI 96801. La valeur obtenue à 22.6 °C est 1.494. A l'aide de la relation (4), nous avons calculé l'indice de réfraction correspondant à 20°C. La valeur obtenue est de 1.495. Ainsi, notre huile essentielle montre un indice de réfraction compris dans la fourchette de valeurs établie par la norme AFNOR ce qui témoigne sa pureté [11]

V .3.2 Les propriétés chimiques

V .3.2.1 Le potentiel hydrogène (PH)

La valeur de pH pour l'huile essentielle de clou de girofle, extraite dans le cadre de ce travail, affichée sur le PH-mètre est égale à **4.89**. Le résultat de pH obtenu confirme le caractère acide de notre huile essentielle extraite de clou girofle. Il convient de souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques du coup peut influencer les propriétés anti oxydante et antibactériennes de l'huile essentielle. Cependant, nous pouvons dire que notre huile a un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes et permet son utilisation comme conservateur alimentaire.

V .3.2.2 L'indice d'acide

L'indice d'acide témoigne de la « fraîcheur » d'une huile essentielle et permet de vérifier sa qualité, notamment en ce qui concerne sa dégradation avec le temps durant le stockage à température ambiante. [12]

Dans ce travail, le volume de la solution KOH alcoolique versé est égal à 0.2 ml et l'indice d'acide correspondant vaut 1.28 g. Ce résultat montre que notre huile se caractérise par une faible valeur de l'indice d'acide qui est comprise dans la plage des valeurs établit par AFNOR. Rappelons qu'une huile essentielle à faible valeur de l'indice d'acide caractérise la pureté et la stabilité de l'huile.

V .3.2.3 L'indice de saponification

L'indice de saponification nous renseigne sur la masse moléculaire moyenne des acides gras entrant dans la composition de l'huile.

Nous avons calculé l'indice de saponification (I_s) en utilisant la relation (5). Ainsi, la valeur d' I_s calculé vaut **187.56 mg** de KOH/g d'huile. Cette valeur est proche des valeurs de la norme fixée par CODEX alimentaire, qui est de 188-194 mg de KOH/g d'huile.

V .3.2.4 Indice d'ester

Nous avons calculé l'indice d'ester de notre huile essentielle à partir de l'indice de saponification I_s et l'indice acide I_a (relation 6). La valeur d' I_s obtenue vaut **186,28**. Ce résultat signifie que notre huile contient une quantité appréciable d'acides gras libres. Rappelons qu'une grande quantité d'esters renfermés dans une huile essentielle confirme la bonne qualité de celle-ci.

V.4 Détermination expérimentale de l'activité anti-oxydante

A l'aide d'un spectromètre de type vis -7220G, nous avons suivi l'évolution de l'absorbance de la solution témoin et les différentes solutions filles que nous avons préalablement préparées. La courbe représentant l'évolution du pourcentage d'inhibition du DPPH résiduel en fonction du temps est donnée sur la figure 18.

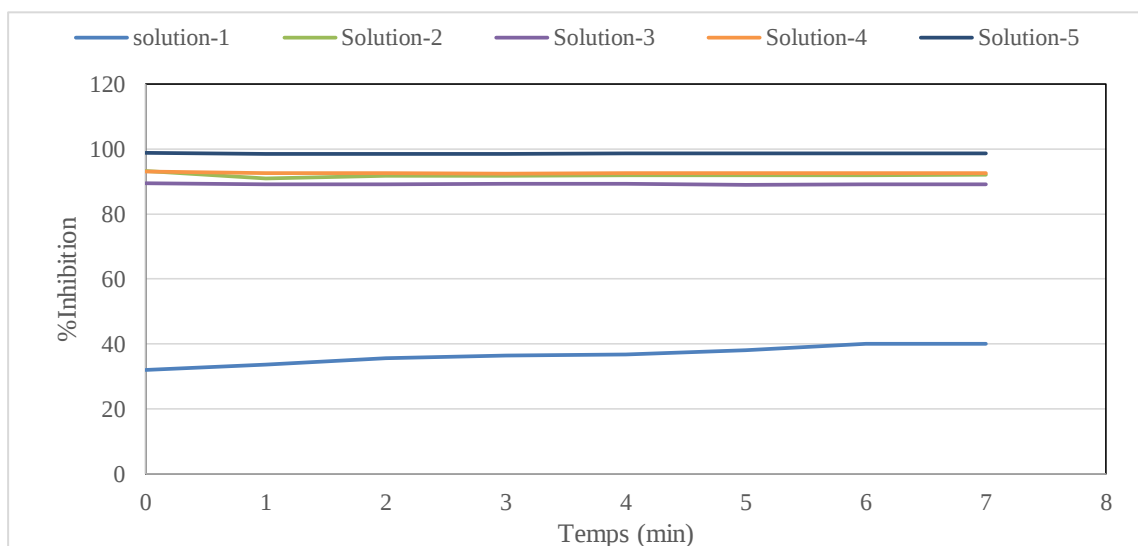


Figure 18 : évolution du pourcentage d'inhibition de DPPH par les différentes solutions en fonction du temps.

Les résultats reportés sur cette figure montrent que le pourcentage d'inhibition du DPPH (0.04 mg/ml) atteint les valeurs plateaux rapidement. La courbe de l'évolution de DPPH° résiduel nous a permis de repérer les valeurs plateaux, que nous avons reportées dans le tableau 7, pour chaque solution.

Tableau 6: concentration (mg/ml) et les valeurs plateaux fixées pour chaque solution

Les solutions	La concentration en (mg/ml)	La valeur plateau
1	0.016	40.83
2	0.04	90.95
3	0.08	89.18
4	0.16	92.64
5	0.2	98.61

Afin d'étudier l'évolution de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration, nous avons reporté les valeurs plateaux en fonction de la concentration de chaque solution, figure 19.

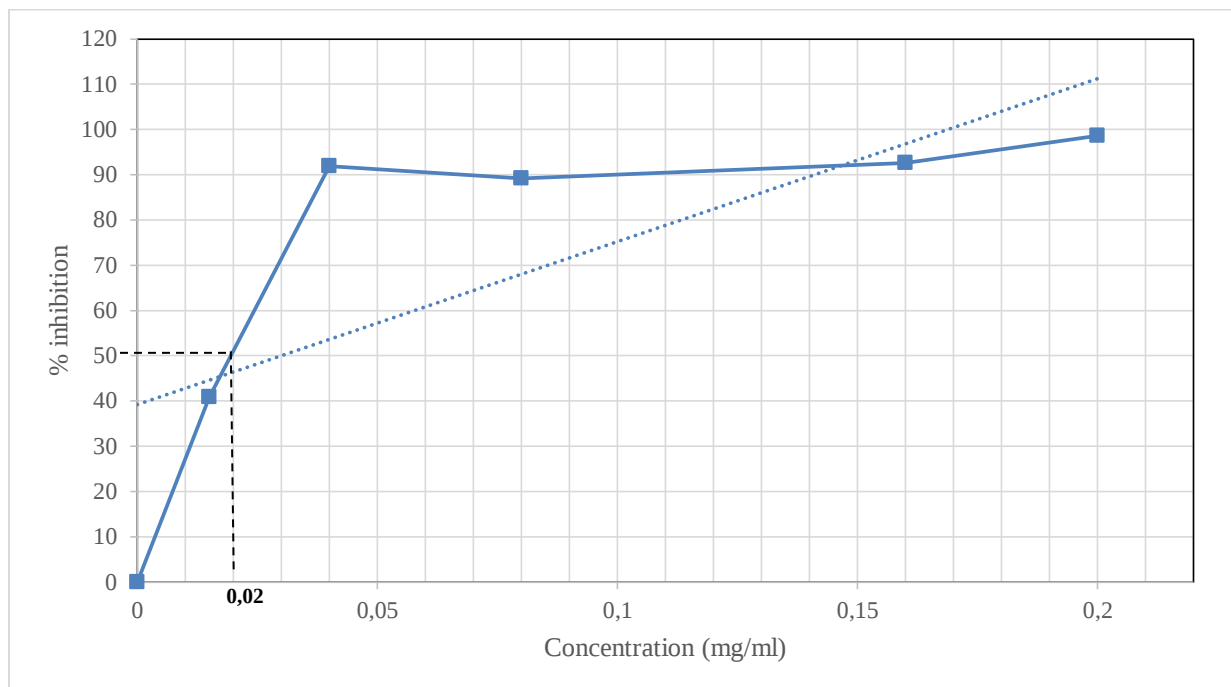


Figure 19 : pourcentage d'inhibition de DPPH par les solutions préparées avec l'huile essentielle.

L'analyse des résultats reportés sur la figure 19, montre que le pourcentage d'inhibition de DPPH par l'huile essentielle est significatif à l'entour de 41% pour la concentration de 0.016 mg/ml. Ce pourcentage d'inhibition augmente jusqu'à 92% avec des concentrations supérieures à 0.04 mg/ml. A partir d'une concentration de 0.16 mg/ml, le pouvoir d'inhibition est de l'ordre de 93% et augmente jusqu'à 98%. Ce résultat signifie que l'huile essentielle extraite a un bon effet scavenger vis-à-vis des radicaux DPPH.

V .4.1 Détermination de la concentration efficace (IC50)

L'**IC50** ou la concentration inhibitrice est la concentration de l'HE nécessaire pour réduire l'activité de DPPH initiale de 50%. Les valeurs d'IC50 sont déterminées graphiquement par la méthode de la régression linéaire des graphes tracés sur la figure 19. Ainsi pour réduire l'activité de DPPH initiale de 50% il faut utiliser **0.02** mg/ml de l'huile essentielle. La valeur de l'IC50 déterminée dans ce travail est très proche de celle trouvée par l'équipe de Houari et qui est de l'ordre de 0.0256 mg/ml [13].

Au vu de ce résultat, nous pouvons dire que l'huile essentielle de clou de girofle détient une bonne capacité anti-oxydante. Ceci est directement lié à sa plus grande teneur en agents piègeurs de radicaux libres agissant comme antioxydants.

V.4.2 Détermination du pouvoir anti-radicalaire

Le pouvoir anti-radicalaire relatif (APR) est inversement proportionnel à la concentration efficace (IC50) [13].

A partir de la valeur d'IC50, nous pouvons calculer APR. En effet, la valeur obtenue de l'APR est de 50 ml/mg. Il est bien de noter que, plus les valeurs d'APR s'éloignent de Zéro, plus le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle est grand.

VI. Conclusion

Dans ce travail, nous avons réalisé des essais d'extraction par hydrodistillation et d'études physico-chimique de l'huile essentielle de clou de girofle. L'activité anti-oxydante de l'huile extraite a été également étudiée. Cette huile essentielle présente un grand intérêt médical, pharmaceutique et cosmétique.

La caractérisation visuelle de notre huile nous a conduits à des caractéristiques (couleur, odeur, et aspect) en accord avec celles retrouvées dans la littérature. Le rendement optimal d'extraction a été de 5 % obtenu avec méthanol comme solvant.

L'étude des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction, PH, indice d'acide, indice de saponification, indice d'ester) nous a permis de mettre en évidence la qualité de notre huile de clou de girofle. La plupart de ces propriétés sont dans l'intervalle de la norme AFNOR, indiquant ainsi la pureté de l'huile que nous avons extraite. La valeur faible de l'indice d'acide obtenu (1.28) traduit la stabilité de notre HE.

L'huile essentielle extraite dans le cadre de ce travail, montre une activité antioxydante, déterminée par la technique DPPH, très importante avec des valeurs d'IC50 (0.02 mg/ml) intéressantes.

Chapitre III : Etude bio-informatique de quelques propriétés thérapeutiques de l'eugénol

I. Introduction :

L'interaction entre une cible et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. La connaissance de la structure des cibles biologiques permet aux chercheurs de mieux comprendre le mode de liaison mis en jeu lors de l'interaction entre une protéine et son ligand. Il est donc primordial d'étudier ces interactions pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre les deux molécules.

Dans ce chapitre, nous avons utilisé la méthode de docking moléculaire pour prédire le mode de liaison le plus stable, l'affinité de l'eugénol et les interactions mises en jeu avec quatre cibles biologiques. L'objectif de cette partie est d'expliquer, à l'échelle atomique, quelques effets thérapeutiques de l'eugénol notamment, l'effet antioxydant, anti-inflammatoire, anti-COVID-19 et antibactérien.

II- Le Docking moléculaire

Le docking moléculaire, appelé aussi ancrage ou amarrage ou arrimage moléculaire en français, est une méthode de drug design (conception de médicament) basée sur la structure de la cible (receptor-based). Elle permet de placer une petite molécule, dite ligand, dans le site actif d'une macromolécule, dite récepteur ou cible [1]. L'objectif de cette approche consiste à prédire la conformation viable et l'orientation relative d'une molécule au sein de sa cible. Le plus souvent, la simulation se fait dans un champ de force simplifié permettant de prédire l'énergie d'interaction entre le ligand et la protéine, dont le but est de classer les différents résultats obtenus. On peut distinguer trois types de docking :

II.1 Le Docking rigide

Dans ce cas, la cible et le ligand sont traités comme entièrement rigides. Ainsi, seules les translations et les rotations du ligand dans le site de liaison sont permises. Le docking rigide s'apparente au modèle de type « serrure-clé » où ni le ligand ni la cible ne subissent de réarrangement conformationnel suite à leur interaction.

II.2 Le Docking semi-flexible

Dans ce type de docking, le ligand est traité flexible afin d'explorer toutes ses conformations et la cible reste rigide durant l'assemblage. Un des avantages de ce type de docking est qu'il nécessite un temps de calcul relativement court mais il ne tient pas compte des changements conformationnels requis par la cible. [2]

II. 3 Le Docking flexible

Dans ce cas, le ligand est considéré flexible mais la flexibilité permise à la cible est limitée exclusivement aux chaînes latérales des résidus du site actif. De nombreuses études et des rapports utilisant ce type de docking ont été reportés dans la littérature et ont conduit à des résultats concluants. [3-4]

III- Etat actuel des connaissances sur les cibles biologiques étudiées

III.1 Les NADPH oxydases (Nox)

Les NADPH oxydases (Nox) sont des protéines transmembranaires dont l'unique fonction est de réduire l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde O_2^- qui donnera par la suite les espèces radicalaires ROS (reactive oxygen species) oxydantes et toxiques [5]. Il est bien de noter que les ROS sont produites en excès dans les maladies chroniques, les pathologies de vieillissement et du stress oxydatif. De plus, les ROS sont à l'origine de plusieurs maladies telles que le cancer, l'arthrose, le diabète, les maladies cardiovasculaires... Ainsi, l'inhibition de cette protéine pourra limiter la production des ROS.

III.2 L'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2)

L'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) est une enzyme exprimée par les cellules de divers organes incluant, les poumons, les vaisseaux, le cœur, le rein et l'appareil digestif.[6-9]. De ce fait, elle joue un rôle physiologique important dans la régulation du cœur, des reins et de la pression sanguine, qui assure l'homéostasie hydrosodée et la pression artérielle. [9]

Récemment, il a été démontré que pour que le coronavirus (COVID-19) puisse entrer dans une cellule et l'interférer, il faut qu'il reconnaisse un récepteur présent dans la cellule [10]. Cependant, l'ACE2 semble être la porte d'entrée du COVID-19 dans l'organisme humain. Ainsi, l'ACE2 a été identifiée comme cible potentielle pour le traitement de la maladie liée au COVID-19. Il est bien de noter que le COVID-19 est une maladie respiratoire infectieuse provoquée par un virus de la famille des coronaviridae (SARS-CoV-2), qui a frappé le monde depuis décembre 2019. L'origine de cette maladie, qui a émergé dans la ville de Wuhan dans la province du Hubei en Chine, est encore inconnue. Elle s'est rapidement propagée d'abord en Chine puis dans le monde entier provoquant ainsi une épidémie mondiale.

III.3 La cyclooxygénase (COX)

L'inflammation est une réaction naturelle de l'organisme correspondant à une série d'évènements cellulaires qui se produit en réponse à une agression tissulaire. Au cours de cette réaction des médiateurs cellulaires, ou les prostaglandines (PGs), sont produits dans les sites enflammés après dégradation de l'acide arachidonique (ACD) par l'enzyme cyclooxygénase (COX) [11]. Deux isoenzymes sont décrites dans la littérature : COX-1 et COX-2. La COX-1 est normalement présente dans l'organisme alors que la COX-2 est produite au niveau des sites de l'inflammation [12]. Ces enzymes sont inhibées par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), médicaments largement prescrits dans le monde en raison de leurs propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires [13].

III.4 La thymidylate kinase (TMK)

La thymidylate kinase (ou TMK) est une protéine enzymatique de type phosphotransférase présente dans les cellules. Elle est essentielle pour la réplication de l'ADN, pour la croissance et la survie des cellules. Cette protéine est présente chez les virus et les eucaryotes supérieurs. L'inhibition de la fonction TMK bactérienne bloque la biosynthèse de l'ADN et entraîne par conséquent la mort cellulaire [14]. Ainsi, l'inhibition de cette protéine entraîne le blocage de la synthèse des bactéries par l'ADN. Ceci la rend une cible thérapeutique valable pour le développement de nouveaux médicaments antibactériens [15-17].

IV- Méthodologie suivie

IV.1 Structures de départ

IV .1.1. Préparation des cibles

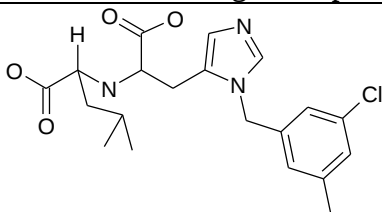
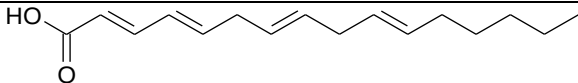
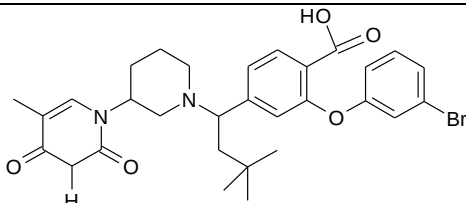
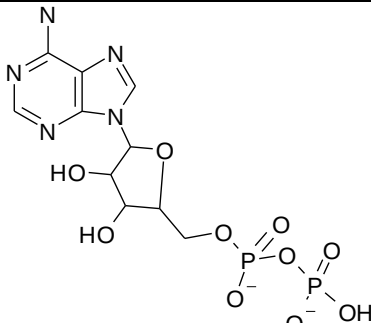
Les coordonnées des protéines ACE2, COX-2, TMK, NOX sont obtenues à partir d'une structure cristallographique disponible dans la banque de données des protéines (PDB : Protein Data Bank) [18]. Nous avons choisi les structures codées 1R4L, 1CVU, 4GFD, 2CDU, de résolutions égale à 3.00 Å, 2.40 Å, 1.80 Å, 1,80 Å respectivement, correspondant aux complexes ACE2/XX5, COX-2/ACD, TMK/OYB, NOX/ADP. Les caractéristiques des cibles biologiques étudiées sont reportées dans le tableau 8.

Tableau 7 : Caractéristiques des cibles biologiques étudiées ainsi que leurs ligands expérimentaux.

Cible	Code PDB	Nombre de chaines	Résolution (Å)	Nombre d'acide aminés de la chaîne A	Ligand expérimental
Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE2)	1R4L	2 chaines (A, B)	3.00	596	XX5
Cyclooxygénase-2 (COX-2)	1CVU	2 chaines (A, B)	2.40	550	ACD
Thymidylate Kinase (TMK)	4GFD	1 chaîne (A)	1.80	188	OYB
NADPH oxydase (NOX)	2CDU	2 chaines (A, B)	1,80	451	ADP

Les structures chimiques ainsi que les codes des ligands expérimentaux de chaque cible sont données dans le Tableau 9.

Tableau 8: Structures des ligands expérimentaux.

Cible	Ligand expérimental	Structure 2D de ligand expérimental
Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE2)	XX5	
Cyclooxygénase-2 (COX-2)	ACD	
Thymidylate Kinase (TMK)	OYB	
NADPH Oxydase (NOX)	ADP	

Une seule chaîne de chaque structure, 1R4L, 1CVU, 4GFD et 2CDU, dépourvue des molécules d'eau et du ligand, est sélectionnée pour les calculs de docking. Une fois le ligand est retiré, les hydrogènes manquants sont ajoutés.

Avant de retirer le ligand expérimental du complexe, nous avons pris le soin de relever tous les résidus qui sont à une distance inférieure à 8 Å, du centre de chaque ligand. Les résidus sélectionnés sont donnés dans le tableau 10. Notons que, tous les acides aminés situés à une distance égale à 8 Å du centre du ligand expérimental forment le site actif de chaque cible.

Tableau 9 : résidus du site actif des cibles biologiques étudiées.

Chaîne	Résidus
1R4L (A)	Tyr515, Arg514, Arg273, Tyr510, Phe504, Thr371, Asp368, Lys363, Met360, His354, Pro346
1CVU (A)	Try385, Ser530, Leu531, Met535, Leu117, Ser38, Ile345
4GFD (A)	Ser97, Arg70, Gln101, Arg92, Tyr100, Leu52, Arg48, Pro38, Phe66, Val51, Ile47
2CDU (A)	Pro120, Ile122, Ile155, Ile178, Gly180, Ser157, Cys242, Phe245, Gly161, Gly158, Gly156, Asp179, Gly244, Ile243, Val214, His181, Tyr188, Tyr159, Ile160, Lys187, Lys213

IV.1.2 Préparation de la structure de l'eugénol

Nous avons dessiné la structure de l'eugénol à l'aide du logiciel d'Avogadro [19]. Par la suite, nous avons effectué l'optimisation de la géométrie en utilisant les paramètres par défaut de ce logiciel. Il est bien de noter qu'une optimisation de la géométrie d'une molécule consiste à la relaxer et minimiser son énergie. La structure ainsi obtenue a été enregistrée en extension pdb. Notons que l'extension pdb regroupe des informations concernant les atomes constituant la molécule notamment, les types d'atomes, les longueurs de liaison, les angles, les angles dièdres....

IV.1.3 Protocole de docking

A l'aide de l'interface graphique d'iGEMDOCK [20], nous avons préparé et déterminé les paramètres optima que nous avons utilisés dans le cadre de ce travail. Ainsi, nous avons

utilisé la fonction score de iGEMDOCK, avec une population de 200 unités, 70 générations et 10 solutions.

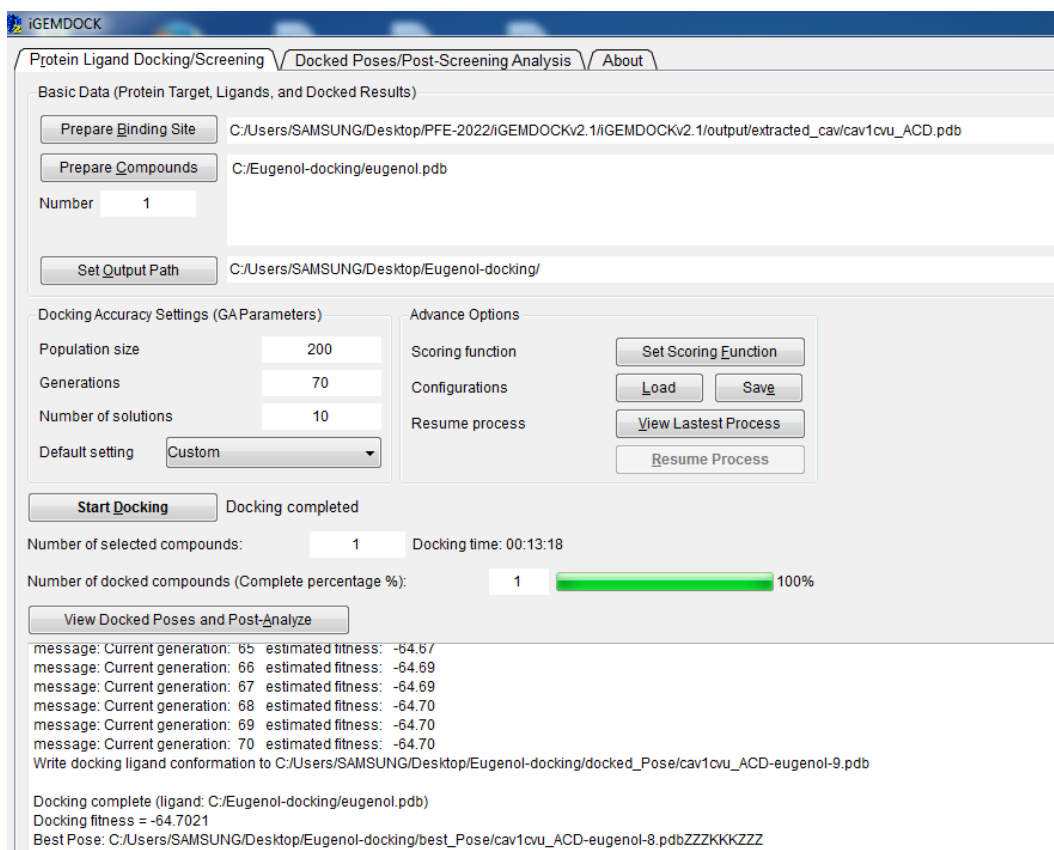


Figure 20: interface graphique du logiciel iGemdock.

V- Résultats et discussions

Les calculs de docking ont généré, pour chaque cible, dix complexes contenant des conformations différentes de l'eugénol dans les sites actifs. La visualisation de ces conformations a été faite à l'aide du logiciel Discovery studio 2016 Client [21]. En effet, la plupart des conformations générées s'insèrent bien dans les sites actifs présents dans les complexes cristallographiques. Nous avons analysé en détails les différents modes de liaison prédits par nos calculs de docking de l'eugénol et les quatre cibles étudiées 1r4l, 1CVU, 4gfd, 2CDU. Les énergies de liaisons calculées par le docking sont négatives ce qui signifie que l'eugénol peut inhiber les cibles étudiées de manière spontanée [22]. Le choix du meilleur mode de liaison a été fait suivant la superposition des conformations avec celle du ligand expérimental, le nombre de liaisons hydrogène, le nombre d'interactions hydrophobe, et l'énergie de liaison eugénol-cible. Nous exposerons, dans ce qui suit, nos résultats pour chacune des cibles étudiées.

Partie A : NADPH oxydase (NOX)

Dans ce travail, nous avons réalisé les calculs de docking avec la cible NADPH oxydase (NOX), protéine responsable de la production des espèces radicalaires ROS (reactive oxygen species) qui sont à l'origine de plusieurs maladies. L'objectif de cette partie est d'expliquer les activités anti-oxydantes observées expérimentalement avec l'huile essentielle de clou de girofle à 70% d'eugénol.

I. Visualisation des conformations obtenues

La visualisation des différentes conformations obtenues, montre que ces dernières se superposent bien sur la structure du ligand expérimental (ADP). L'analyse des résultats montre que la conformation 1 de l'eugénol issue du docking présente plus d'interactions favorables avec les acides aminés du site actif de la NOX et la plus petite énergie de liaison eugénol-NOX. Ce résultat nous a poussées à choisir cette conformation pour la suite de notre étude.

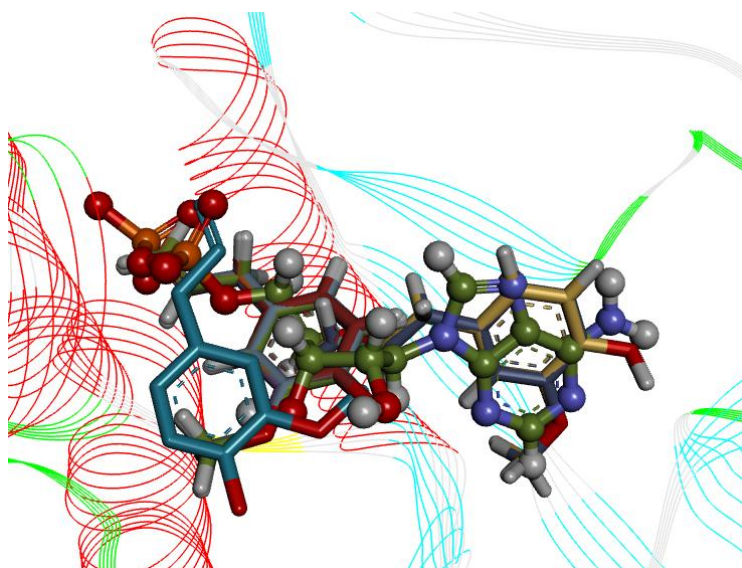
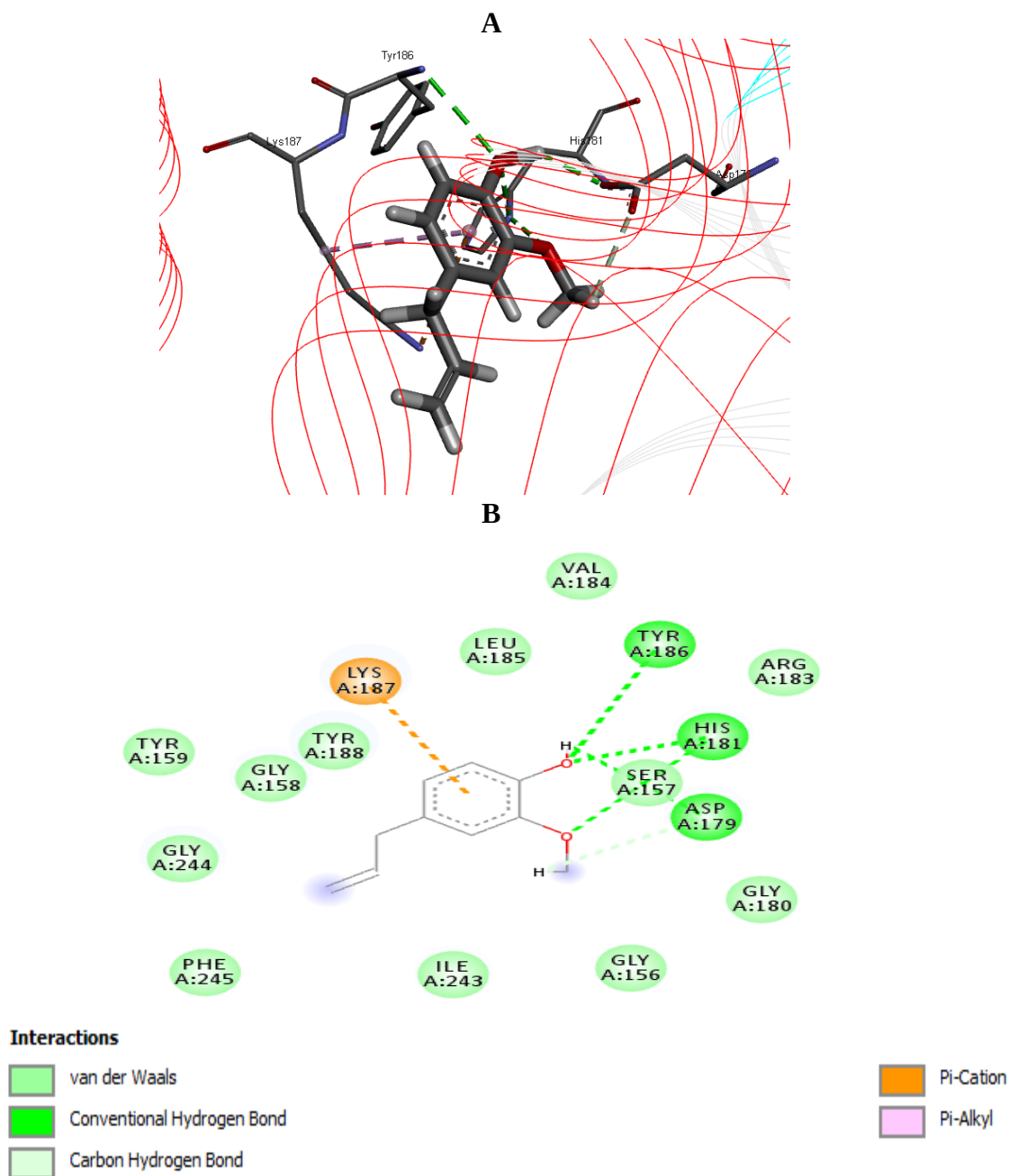


Figure 21 : superposition des conformations de l'eugénol issues du docking, représentée en stick colorées, et celle du ligand expérimental, représentée en balles et stick vertes. Le backbone de la protéine est représenté en ribbons lignes (colorées).

I.1 Mode de liaisons de l'eugénol

Dans le mode de liaison bioactif de l'eugénol avec la NOX, la liaison oléfinique ($C=C$) interagit avec les résidus hydrophobes Gly244, Phe245 et Ile243. La Lysine (Lys187),

grâce à son groupement NH_2 de la chaîne latérale, est impliquée dans des interactions hydrophobes de type π -Cation avec le groupement phényle de l'eugénol (Figure 22 et Tableau 11). Le même groupement est entouré par les résidus Leu185, Val184, Gly180, Gly156, Gly158 permettant des interactions hydrophobes. Les deux carbones de la chaîne latérale de l'acide aminé Lysine (Lys187) se trouve à une distance ($4.21\text{\AA}$) du cycle aromatique



d'eugénol conduisant à une interaction hydrophobe de type alkyle.

Figure 22: représentation A- 3D et B- 2D du mode de liaison de l'eugénol dans le site actif de la NOX.

L'oxygène du groupement acide (COOH) de l'acide aminé Aspartique (Asp179) se trouve à une distance $d=2,69 \text{ \AA}$ de CH_3 du groupement méthoxyle (OCH_3) d'eugénol conduisant à une interaction favorable de type hydrogène-carbone. L'oxygène du groupement COOH de l'acide Aspartique (Asp179) forme une liaison hydrogène avec le groupement OH d'eugénol à $d(\text{O} \cdots \text{H})=3,28 \text{ \AA}$. Le groupement guanidinium de l'acide aminé Histidine (His181) forme deux liaisons hydrogène avec l'oxygène de la fonction alcool $d(\text{H} \cdots \text{O})= 2,77 \text{ \AA}$ et l'oxygène du groupement méthoxyle $d(\text{H} \cdots \text{O})= 2,61 \text{ \AA}$ de l'eugénol. Une autre liaison hydrogène est observée entre l'hydrogène du groupement NH_2 de l'acide aminé Tyrosine (Tyr186) et l'oxygène de la fonction alcool de l'eugénol $d(\text{H} \cdots \text{O})= 2,28 \text{ \AA}$.

Tableau 10 : énergie de liaison (kJ/mol), Liaisons hydrogène, interactions de Van der Waals, et les interactions hydrophobes prédites entre l'eugénol et la NOX.

Liaisons hydrogène	Autres interactions	Energie de liaison (kJ/mol)
1. Asp179 (COOH) : OH d'eugénol $d(\text{O} \cdots \text{H})=3,28 \text{ \AA}$ 2. His181 (guanidinium) : alcoolOH d'eugénol $d(\text{H} \cdots \text{O})= 2,77 \text{ \AA}$ 3. His181 (guanidinium) : OCH_3 d'eugénol $d(\text{H} \cdots \text{O})= 2,61 \text{ \AA}$ 4. Tyr186 (NH_2) : OH (fonction alcool) d'eugénol $d(\text{H} \cdots \text{O})= 2,28 \text{ \AA}$	Van der Waals : Leu185, Val184, Arg183, Gly180, Gly156, Ile243, Phe245, Gly244, Gly158, Tyr159, Tyr188 Alkyl : Lys187 et eugénol (cycle aromatique) π-Cation : Lys187 (NH_2) et eugénol (cycle aromatique) Carbone-hydrogène : Asp179 (COOH) et eugénol (OCH_3) $d=2,69 \text{ \AA}$	-66.214

Ainsi, la mise en évidence des résidus pertinents intervenants dans la liaison de l'eugénol avec les acides aminés du site actif de la NOX, stabilisant le complexe eugénol-NOX, permet d'interpréter les activités anti-oxydantes que nous avons observées expérimentalement.

Partie B : Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ACE2)

I. Visualisation des conformations obtenues du docking avec l'ACE2

La visualisation des différentes conformations obtenues montre que ces dernières se superposent aisément avec la conformation du ligand expérimental (XX5). L'analyse des résultats montre que la conformation **8** de l'eugénol issue du docking présente plus d'interactions favorables avec les acides aminés du site actif de l'ACE2. Ce résultat, nous a guidées dans le choix de cette conformation (conformation 8) pour la suite de notre étude.

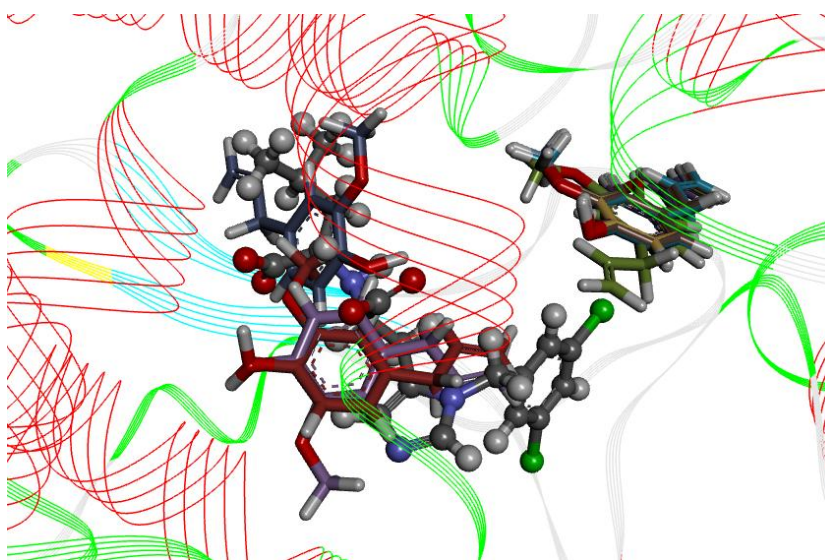


Figure 23:superposition des conformations de l'eugénol issues du docking et celle du ligand expérimental XX5.

I.1 Mode de liaisons de l'eugénol avec l'ACE2

Dans le mode de liaison bioactif de l'eugénol avec l'ACE2, le groupement éthylène (C=C) d'eugénol interagit avec les parties hydrophobes des résidus His345, Pro346. Ces deux interactions favorisent des liaisons stabilisatrices de type π -alkyle entre le groupement éthylène d'eugénol et le cycle aromatique imidazole de l'acide aminé Histidine (His345, $d = 3.96 \text{ \AA}$) et alkyle avec les trois atomes de carbone du cycle tétrahydropyrrole de Pro346 ($d = 4.24 \text{ \AA}$). De plus, l'Arginine (Arg273), grâce à son groupement NH_2 de la chaîne latérale, est impliquée dans des interactions hydrophobes de type π -Cation avec le groupement phényle de l'eugénol (Figure24 et Tableau 12). L'oxygène de la fonction acide (COOH) de l'acide aminé Glutamique (Glu375) se trouve à une distance égale $d = 3.75 \text{ \AA}$ du cycle aromatique d'eugénol, conduisant à une interaction favorable de type π -Anion. Le carbone du cycle

aromatique imidazole de l'acide aminé Histidine (His374) se trouve à une distance égale à $d = 2,92 \text{ \AA}$ du groupement hydroxyle d'eugénol, permettant une interaction de type carbone hydrogène. L'oxygène du groupement acide (COOH) de l'acide aminé Glutamine (Glu406) se trouve à une distance de $d = 2,71 \text{ \AA}$ de l'hydrogène du groupement méthoxyle d'eugénol, conduisant à une interaction de type carbone hydrogène.

Tableau 11: Energie de liaison (KJ/mol), liaisons hydrogène, interaction Van der Waals, interaction Alkyl, et les interactions hydrophobes prédites entre l'eugénol et l'ACE2.

Liaisons hydrogène	Autre interactions	Energie de liaison (KJ/mol)
Glu 406 (COOH) : OCH_3 d'eugénol $d(\text{O} \cdots \text{H}) = 2,74 \text{ \AA}$ Arg518 (NH ₃) : OH d'eugénol $d(\text{N} \cdots \text{H}) = 3,036 \text{ \AA}$. Arg518 : OCH_3 d'eugénol $d(\text{N} \cdots \text{H}) = 3,074 \text{ \AA}$.	Van der Waals: Glu 402, His 505, Tyr 515. Alkyl : Pro346 et l'eugénol (le radical éthylène). π-Cation : Arg 273 (C=C) l'eugénol (cyclearomatique). Carbone-hydrogène : His374 et eugénol $d(\text{C} \cdots \text{OH}) = 2,92 \text{ \AA}$ Glu 406 (COOH) : OCH_3 d'eugénol $d(\text{O} \cdots \text{H}) = 2,71 \text{ \AA}$ Thr371 (HO---CH ₃) = $3,01 \text{ \AA}$	-65.059

Le groupement hydroxyle de l'acide Thréonine (Thr371) interagit avec l'hydrogène du groupement méthoxyle d'eugénol à $d = 3,01 \text{ \AA}$, conduisant à une interaction favorable de type hydrogène-carbone. L'hydroxyle du groupement acide (COOH) de l'acide aminé Glutamique (Glu406) forme une liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène du groupement méthoxyle d'eugénol qui se trouve à une distance $d(\text{O} \cdots \text{H}) = 2,74 \text{ \AA}$. De plus, l'atome d'azote du groupement guanidinium de l'acide aminé Arginine (Arg518) forme deux liaisons hydrogène avec l'oxygène de la fonction alcool $d(\text{H} \cdots \text{O}) = 3,036 \text{ \AA}$ et l'oxygène du groupement méthoxyle $d(\text{H} \cdots \text{O}) = 3,079 \text{ \AA}$ de l'eugénol.

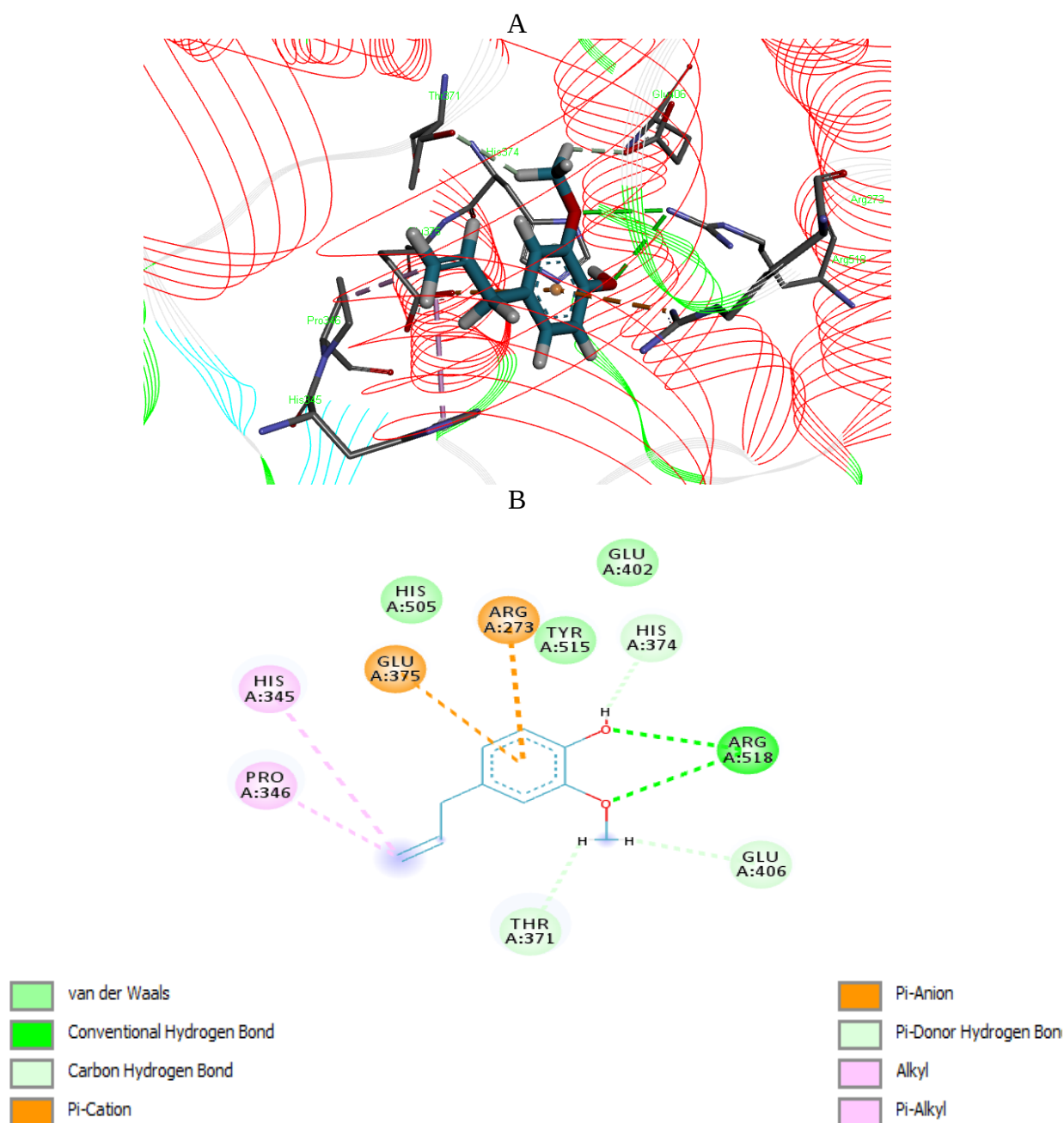


Figure 24 : représentation A-3D et B-2D du mode de liaison de l'eugénol dans le site actif de la ACE2.

Ainsi, les résultats de nos calculs de docking donnent une interprétation, en termes d'interactions intermoléculaires pouvant avoir lieu entre la cible ACE2 et l'eugénol, de l'effet thérapeutique observé par l'utilisation des clous de girofle comme remède naturel pour

renforcer le système immunitaire, contre les allergies notamment respiratoires et dans le cas du traitement de la maladie de la COVID-19.

Partie C : Inhibition de la protéine cyclooxygénase 2

1-Conformations obtenues du docking avec la COX-2

L'analyse des résultats, obtenus par nos calculs de docking, montre que l'eugénol s'insère bien dans le site actif de la COX-2 présent dans le complexe cristallographique 1CVU (Figure 25). La visualisation des différentes conformations montre que la conformation **9** de l'eugénol issue du docking présente plus d'interactions favorables avec les acides aminés du site actif de la COX-2. Ainsi, cette conformation a été choisie pour la suite de notre étude.

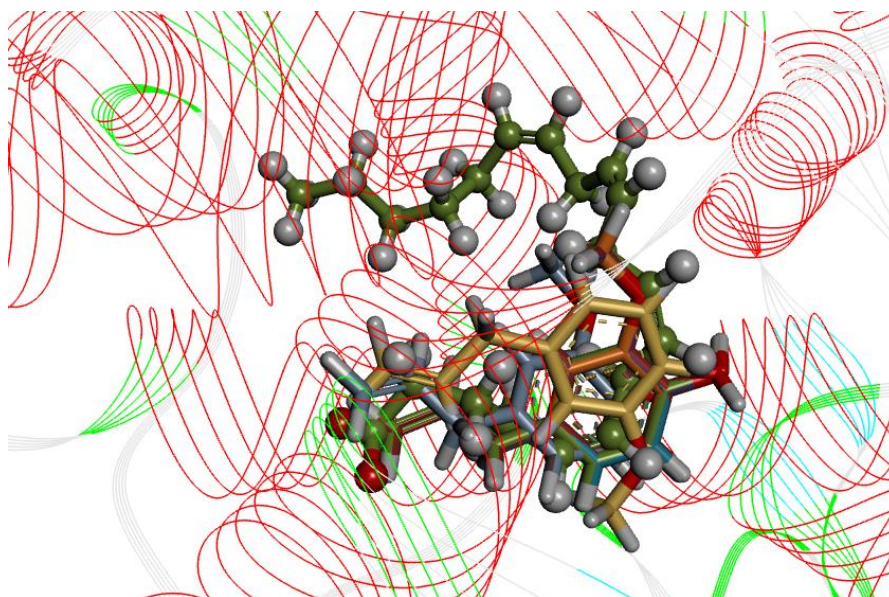


Figure 25 : superposition des conformations de l'eugénol issues du docking et celle du ligand expérimental.

2-Mode de liaisons de l'eugénol avec la COX-2

Dans le mode de liaison bioactif de l'eugénol avec la COX-2, le groupement éthylène (C=C) de l'eugénol forme deux interactions de type π -Alkyl avec les acides aminés du site actif. La première interaction se produit avec le cycle aromatique de l'acide aminé Phényle alanine (Phe205) et la deuxième avec la partie aliphatique de la chaîne latérale de l'acide aminé Valine (Val349). La visualisation de la conformation bioactive montre aussi que cette partie (le groupement éthylène) de l'eugénol forme deux autres interactions Alkyl avec les deux carbones de l'acide aminé Valine (Val344) et les deux carbones de l'acide aminé

Tyrosine (Tyr348). L'oxygène du groupement carbonyle (C=O) du backbone de l'acide aminé Valine (Val523) se trouve à une distance $d(O_H) = 2.45 \text{ \AA}$ de l'hydrogène de la fonction alcool de l'eugénol conduisant à une liaison hydrogène.

Tableau 12: Energie de liaison (KJ/mol), liaison Hydrogène, interaction de Van der Waals, et les interactions hydrophobes prédites entre l'eugénol et la COX-2.

Liaisons hydrogène	Autres interactions	Energie de liaison (KJ/mol)
Val523(C=O) : OH d'eugénol $d(O_H) = 2.45 \text{ \AA}$	Van der Waals : Met522, Gly526, Leu384, Trp387, Phe381, Tyr385, Leu352, Leu534, Ser530. π-Alkyl : Phe205, Val349 (deux carbones) : le cycle aromatique d'eugénol. Alkyl : Val344, Tyr348 (deux carbones) et l'éthylène d'eugénol. $d = 4.12 \text{ \AA}$	-64.713

Des interactions favorables de type Van Der Waals ont eu lieu entre l'eugénol et les acides aminés du site actif de la COX-2, notamment Met522, Gly526, Leu384, Trp387, Phe381, Tyr385, Leu352, Leu534 et Ser530, permettant la stabilisation du ligand dans le site de liaison et l'augmentation de l'affinité de l'eugénol pour cette cible. Néanmoins, une interaction défavorable a été enregistrée entre le groupement hydroxyle de l'eugénol et la fonction amine du backbone de l'acide aminé Ala527. Ce mauvais contact est probablement due à la grosse taille de la structure de l'eugénol, nécessitant ainsi plus d'espace au sein du site actif. Rappelons que nous avons effectué un docking semi-flexible, c'est-à-dire qu'aucune flexibilité n'a été permise pour la cible. Nos résultats sont en bon accord avec les résultats de la littérature qui stipulent que la plupart des résidus conservés prédits dans cette étude établissent des interactions favorables avec d'autres AINS [23-24].

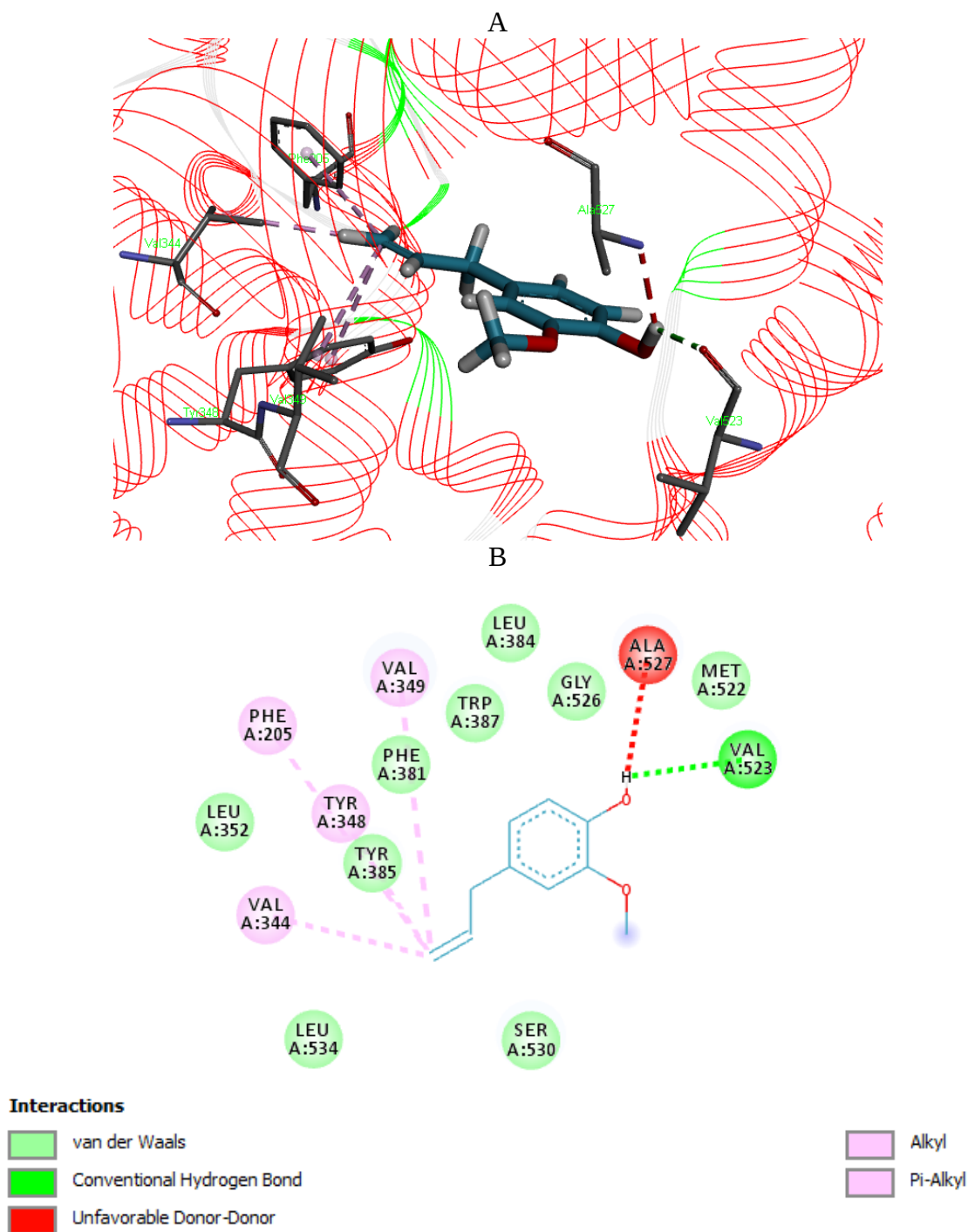


Figure 26: représentation A-3D et B-2D du mode de liaison de l'eugénol dans le site actif de la COX-2.

Au terme de cette étude, et vu le nombre d'interactions favorables mis en jeu entre l'eugénol et la protéine COX-2, nous pouvons considérer que l'effet anti-inflammatoire observé avec l'huile essentielle de clou de girofle est dû à la grande affinité de son principe actif pour la cible impliquée dans l'inflammation.

Partie D : Inhibition de l'enzyme Thymidylate Kinase (TMK)

1-Conformations obtenues du docking avec la TMK

La visualisation des différentes conformations obtenus montre que ces dernières se superposent bien sur la structure du ligand expérimental (4gfd). L'analyse des résultats montre que la conformation 6de l'eugénol issue du docking présent plus d'interactions favorables avec les acides aminés du site actif de la TMK. Donc on peut déduire la plus stable conformation pour la manipulation de notre étude.

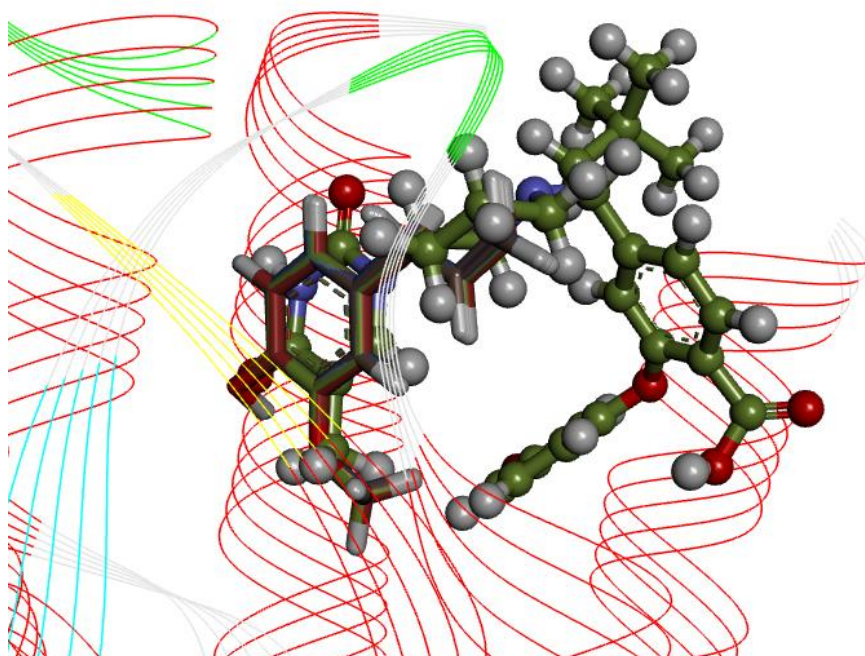


Figure 27: superposition des conformations de l'eugénol issues du docking et celle du ligand expérimental 4gfd.

2-Mode de liaisons de l'eugénol avec la protéine TMK

L'analyse de nos résultats de docking, montre que la conformation la plus favorable d'eugénol est la sixième. Dans le mode de liaison bioactif de l'eugénol avec la TMK, le cycle aromatique de l'eugénol se trouve à une distance de 4,21 Å du cycle aromatique de l'acide aminé Phényle alanine (Phe66) et 3.97Å du cycle aromatique de l'acide aminé Tyrosine (Tyr100), permettant des interactions favorables de type π - π -Stacked et π - π -Shaped, respectivement. Notons que dans une interaction π - π -Stacked, les cycles aromatiques en question se trouvent en position parallèle alors que dans une interaction π - π -Shaped les cycles aromatiques impliqués se trouvent en position perpendiculaire.

Tableau 13 : Energie de liaison (KJ/mol), liaison Hydrogène, interaction de Van der Waals, et les interactions hydrophobes prédites entre l'eugénol et la TMK.

Liaisons hydrogène	Autres interactions	Energie de liaison (KJ/mol)
1. Ser97 (OH): OH d'eugénol d (H__O) = 3, 28 Å. 2. Arg70 (C (NH) ₂ -NH): OCH ₃ d'eugénol d (O__H) = 2,73 Å.	1. Van der Waals : La distance entre la fonction acide terminale de Tyrosine : (Tyr93) se trouve à une distance 4,53Å de l'oxygène de groupement OCH ₃ d'eugénol. 2. L'acide Gln101 3. Carbone-hydrogène : Glu37 (COOH): OCH ₃ d'eugénol d (C__H) = 2, 45 Å. 4. π - π -Stacked : Phe66 5. π - π -Shaped : Tyr100	- 64,713

L'oxygène du groupement acide (COOH) de l'acide aminé Glutamique (Glu37) se retrouve à une distance $d = 2,45 \text{ Å}$ de CH₃ du groupement méthoxyle d'eugénol conduisant à une interaction favorable de type hydrogène-carbone. L'oxygène du groupement hydroxyle (OH) de l'acide aminé Serine (Ser97) forme une liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle (OH) de l'eugénol d(HO__O) = 3,28 Å. Le groupement guanidinium de l'acide aminé Arginine (Arg70) forme une liaison hydrogène avec l'oxygène de groupement méthoxyle d (NH__OCH₃) = 2,73 Å de l'eugénol. Cependant, un mauvais contact entre la chaîne latérale de l'arginine (Arg70) et le groupement hydroxyle de l'eugénol a été constaté. Cette interaction défavorable est probablement due aux inconvénients de la méthode de docking utilisée dans ce travail à savoir la négligence de la flexibilité de la cible biologique.

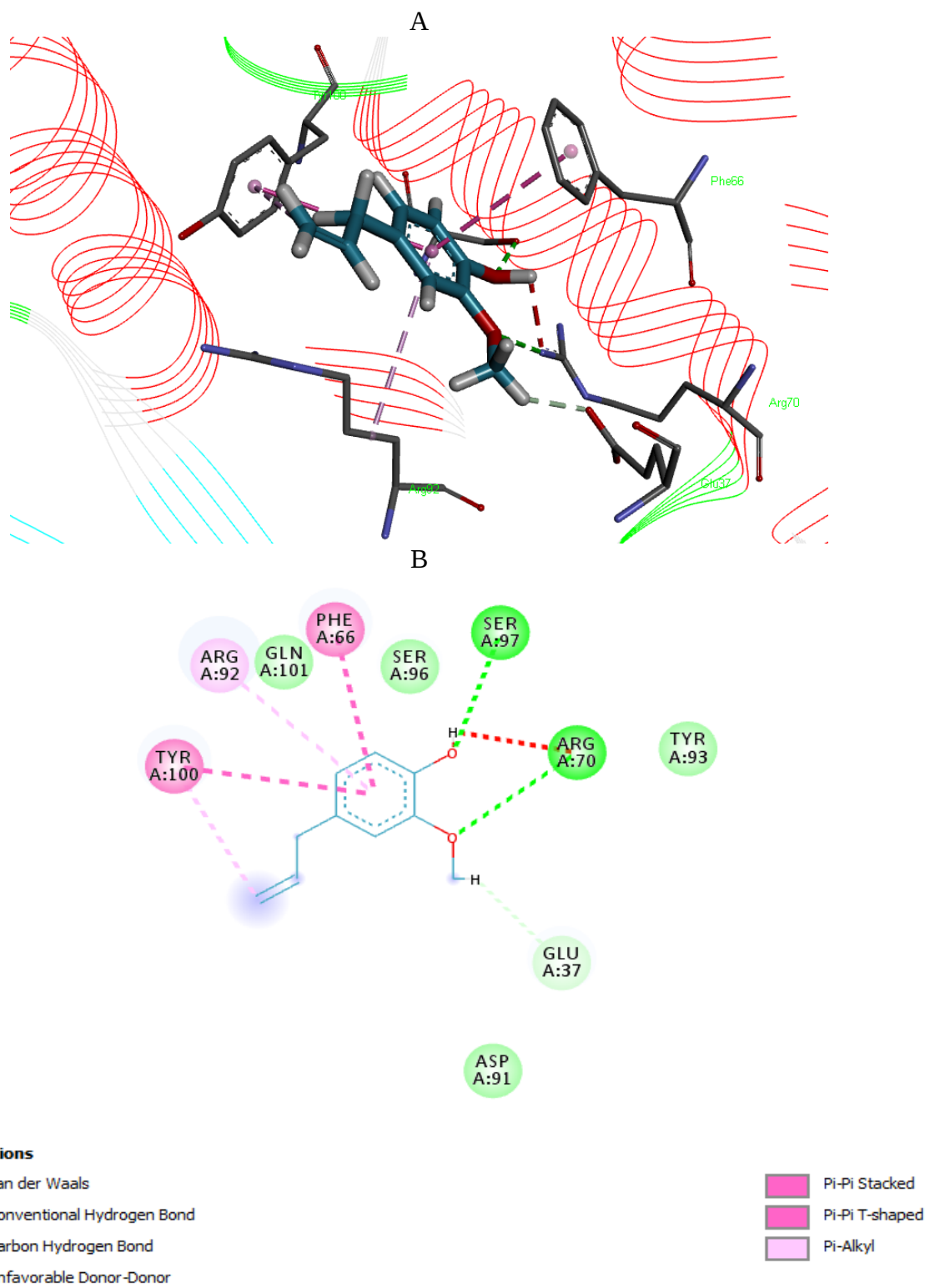


Figure 28 : représentation A-3D et B-2D de mode de liaison de l'eugénol dans le site actif de la TMK.

Ainsi, nous pouvons dire que les résultats de la présente étude ont révélé l'importance des résidus tapissant le site actif de la TMK. De plus, l'effet antibactérien de l'eugénol peut être expliqué par sa grande affinité pour la cible en question.

VI. Conclusion

Ce travail, mené au moyen du docking moléculaire semi-flexible, est consacré à la compréhension du mode de reconnaissance par quatre cibles biologiques, de l'eugénol, le principe actif de l'huile essentielle de clou de girofle.

Dans la première partie, nous avons utilisé la cible NADPH oxydase, une protéine impliquée dans la sécrétion des radicaux libres qui sont à l'origine de plusieurs maladies, dans les simulations de docking. La mise en évidence des résidus pertinents intervenants dans la liaison de l'eugénol avec les acides aminés du site actif de la NOX, notamment **l'Asp179, His181, Tyr186, et Lys187**, nous a permis d'interpréter l'activité anti- oxydante que nous avons observées expérimentalement.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié le mécanisme d'inhibition de la protéine ACE2, cible potentielle pour le traitement de la maladie liée au COVID-19, par l'eugénol. Les résultats montrent clairement la grande affinité de l'eugénol pour cette cible via la mise en évidence des acides aminés impliqués, comme **Glu 406, Arg518, Arg518, His374, Arg 273, et Pro346**, dans la liaison eugénol-ACE2. Ces résultats donnent une interprétation à l'échelle atomique de l'effet thérapeutique observé par l'utilisation des clous de girofle comme remède naturel pour renforcer le système immunitaire, contre les allergies notamment respiratoires et dans le cas du traitement de la maladie de la COVID-19.

Dans la troisième partie de ce chapitre, nous avons essayé d'interpréter l'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle de clou de girofle. Pour cela, nous avons étudié le mode de reconnaissance par la COX-2, protéine impliquée dans la pathologie inflammatoire, de l'eugénol. L'analyse des résultats montre un grand d'interactions favorables entre l'eugénol et les acides aminés du site actif, comme la **Val523, Phe205, Val349, Val344, et Tyr348**. Ceci nous a permis d'avoir un aperçu sur la grande affinité du son principe actif de l'huile essentielle de clou de girofle pour la cible impliquée dans l'inflammation et de comprendre ainsi son effet anti-inflammatoire.

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous avons utilisé la cible TMK, cible thérapeutique valable pour le développement de nouveaux médicaments antibactériens, dans nos calculs de docking. Les résultats de la présente étude ont révélé l'importance des résidus tapissant le site actif de la TMK, notamment, **Ser97, Arg70, Phe66, Tyr100, Glu37**. De plus, l'effet antibactérien de l'eugénol peut être expliqué par sa grande affinité pour la cible en question.

En conclusion, nous pouvons dire que les interactions observées entre l'eugénol et les

différentes cibles étudiées, peuvent être spécifiquement ciblées dans le but de concevoir la structure de nouveaux médicaments plus puissants. Cette étude structurale par le docking constitue une voie dans le développement de nouveaux médicaments.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'extraction, l'étude physico-chimique, la détermination de l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle de clou de girofle. Cette dernière, constituée essentiellement d'eugénol (80%), est utilisée depuis des décennies comme anti-inflammatoire, antioxydant, antimicrobien et antiallergique. Dans le but de comprendre le mode de fonctionnement au sein de l'organisme, des études de docking moléculaire du principe actif de cette huile avec quatre cibles biologiques impliquées dans les pathologies du stress oxydatif, de l'inflammation, de l'allergie notamment respiratoire et de la croissance des microbes tels que les bactéries.

Après avoir résumé les résultats de notre recherche bibliographique concernant l'huile essentielle de clou de girofle, les méthodes de son extraction, sa composition chimique et son utilisation en thérapeutique et en synthèse chimique, nous avons défini la méthode d'extraction ainsi que les méthodes bio-informatiques que nous avons utilisés.

Le travail présenté dans ce mémoire s'est divisé en deux parties distinctes. La première, une partie expérimentale, consiste en l'extraction de l'huile essentielle de clou de girofle en utilisant la méthode d'hydrodistillation. Pour cela, nous avons réalisé trois essais avec trois solvants différents à savoir le dichlorométhane, le cyclohexane et le méthanol. Le calcul des rendements pour les trois essais montre que l'eugénol est plus soluble dans le méthanol. L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) montre que l'huile essentielle extraite dans le cadre de ce travail est constituée essentiellement d'eugénol et des traces d'acétates d'eugénol. Les résultats des analyses physico-chimiques, la densité relative, l'indice de réfraction, le PH, l'indice d'acide, l'indice de saponification, l'indice d'ester, que nous avons effectué rentrent bien dans les fourchettes de valeurs établies par la norme AFNOR. Dans le but d'évaluer le pouvoir antioxydant de notre huile essentielle, nous avons déterminé l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode de DPPH. Les résultats montrent que l'huile essentielle extraite dans le cadre de ce travail détient une bonne activité anti-oxydante.

La deuxième partie de ce travail, divisée en quatre parties, consiste à étudier les modes de liaisons les plus probables et les interactions entre l'eugénol avec quatre cibles biologiques. Dans la première, nous avons utilisé la cible NADPH oxydase, une protéine impliquée dans la sécrétion des radicaux libres qui sont à l'origine de plusieurs maladies, dans les simulations de docking. La mise en évidence des résidus pertinents intervenants dans la liaison de l'eugénol avec les acides aminés du site actif de la NOX, nous a permis d'interpréter l'activité anti-

oxydante que nous avons observées expérimentalement. Dans la deuxième partie, nous avons étudié le mécanisme d'inhibition de la protéine ACE2, cible potentielle pour le traitement de la maladie liée au COVID-19, par l'eugénol. Les résultats montrent clairement la grande affinité de l'eugénol pour cette cible via la mise en évidence des acides aminés impliqués, dans la liaison eugénol-ACE2. Ces résultats donnent une interprétation à l'échelle atomique de l'effet thérapeutique observé par l'utilisation des clous de girofle comme remède naturel pour renforcer le système immunitaire, contre les allergies notamment respiratoires et dans le cas du traitement de la maladie de la COVID-19. Dans la troisième partie, nous avons essayé d'interpréter l'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle de clou de girofle. Pour cela, nous avons étudié le mode de reconnaissance par la COX-2, protéine impliquée dans la pathologie inflammatoire, de l'eugénol. L'analyse des résultats montre un grand d'interactions favorables entre l'eugénol et les acides aminés du site actif. Ceci nous a permis d'avoir un aperçu sur la grande affinité du son principe actif de l'huile essentielle de clou de girofle pour la cible impliquée dans l'inflammation et de comprendre ainsi son effet anti-inflammatoire. Dans la quatrième partie, nous avons utilisé la cible TMK, cible thérapeutique valable pour le développement de nouveaux médicaments antibactériens, dans nos calculs de docking. Les résultats de la présente étude ont révélé l'importance des résidus tapissant le site actif de la TMK. De plus, l'effet antibactérien de l'eugénol peut être expliqué par sa grande affinité pour la cible en question.

En conclusion, nous pouvons dire que les interactions observées entre l'eugénol et les différentes cibles étudiées, peuvent être spécifiquement ciblées dans le but de concevoir la structure de nouveaux médicaments plus puissants. Cependant, le logiciel utilisé dans ce travail ne prend pas en considération la flexibilité de la cible. En revanche, du fait de la grande flexibilité des cibles biologiques, cette étude est insuffisante pour donner une interprétation complète du mécanisme d'inhibition des cibles étudiées. Afin de remédier à ces insuffisances, nous comptons poursuivre ce travail au moyen de techniques bio-informatiques plus poussées permettant d'appréhender la flexibilité des cibles comme la dynamique moléculaire. C'est là que se situe la première perspective de ce travail. Notre deuxième perspective consiste à réaliser d'autres extractions en utilisant des solvants extracteurs qui respectent l'environnement et des plantes médicinales et aromatiques utilisées traditionnellement par la population algérienne.

Références bibliographiques

- [1] Davet P, Rouxel F. Détection et isolement des champignons du sol, Paris.cedex07. 1997, p147.
- [2] Faucon M. Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : fondements & aide à la prescription : monographies : huiles essentielles, huiles végétales, hydrolats aromatiques .Paris Ed. Sang de la Terre. 2012. 879 p.
- [3] Perrier de la bathie H. Flore de Madagascar et des Comores, 152ème famille, Myrtacées. Paris : Firmin-Didot et Cie .1953.1-2 p.
- [4] Amshoff G. Myrtacées. Paris : MNHN1.966. p. 3-4 ; 16.
- [5] MNHN & OFB [Ed]. -présent. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN), 2003. Site web : <https://inpn.mnhn.fr>,
- [6] POWO. Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/>, consulté le 17 février 2021.
- [7] Barbelet S. Le Giroflier : Historique, Description Et Utilisations De La Plante Et De Son Huile Essentielle. Université De Lorraine, 10 Juin 2015. http://docnum.univ-lorraine.fr/public/bupha_t_2015_barbeletsophie.pdf.
- [8] <https://www.decleor.fr/fr/nos-huiles-essentielles/apaisant/clou-de-girofle.html>.
- [9] Werner M, Von Braunschweig R. L'aromathérapie : principes, indications, utilisations. Paris Ed. Vigot ; 2008. 334 p.
- [10] Faucon M. Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : fondements & aide à la prescription : monographies : huiles essentielles, huiles végétales, hydrolats aromatiques. Paris : Ed. Sang de la Terre ; 2012. 879 p.
- [11] Mailhebiau P. La nouvelle aromathérapie : caractérologie des essences et tempéraments humains. Toulouse : Ed. Nouvelle Vie, 1989. 372 p.
- [12] Mailhebiau P, Soulier J, Azemar J. Collège d'aromathérapie Philippe Mailhebiau : étude et prescription de la médecine aromatique. [Avesnelles] : Nouvelles Presses Internationales. 1992. 163 p.
- [13] Guenther E. The essential oils. D. Van Nostrand Co., New York, N.Y1.949
- [14] Peyron L. Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. Chapitre 10, 1992, pp 217 – 238. Cité In : Les arômes alimentaires. Coordinateurs Richard H. et Multon J.-L. Ed. Tec & Doc-Lavoisier et Apria. 438 p.

- [15] Traikia Ahlem et Mansouri Maroua, Mémoire du projet de fin d'étude master2 sur Etude des caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles du clou de girofle et d'eucalyptus spécialité chimie physique et analytique. Université 08 Mai 1945, Guelma, septembre 2020.
- [16] Brat P. Application d'un nouveau procédé d'extraction (jus, pulpe, huile essentielle) : La flash-Détente. Journée professionnelle Cirad-flhor – Conservation et transformation du fruit : nouveaux enjeux, nouvelles techniques. Montpellier – France. 2001 URL : <http://technofruits2001.cirad.fr/fr/brat.htm>.
- [17] Allaf K., Louka N., Bouvier J.M., Parent F. Et Forget J.M., 1994 : Procédé de traitement de produits biologiques en vue de la modification de leur texture, installations pour la mise en œuvre d'un tel procédé et produits ainsi réalisés, French patent n° 93/09728, 1993, International extension PCT FR 94/00975, 1994.
- [18] Rezzoug S.A., Louka N., Maache-Rezzoug Z., Nouviaire A. Et Allaf K. Présentation du séchage couple à la texturation par détente instantanée contrôlée. Application aux produits agro-alimentaires en morceaux 10ème, 1998, pp : 319 – 324. Rencontres scientifiques et technologiques des industries alimentaires, Agoral, Ed. Lavoisier.
- [19] Chemat F., Tomao V. Et Virot M. Ultrasound-assisted extraction in food analysis. In Handbook of Food Analysis Instruments by Semithötles, Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2008. pp. 85 – 103.
- [20] Paré J.R.J., Sigouin M. Et Lapointe J. Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. Brevet européen 1990, EP 398798.
- [21] Paré J.R.J., Sigouin M., Et Lapointe J. Microwave assisted natural product extraction. Brevet américain, 1991. US 5 002 784.
- [22] Paré J.R.J: Microwave extraction of volatile oils. Brevet américain. 1994, US 5 338 557.
- [23] Barbelet S. Le Giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. Mémoire De Fin D'étude Pour Obtenir Le Diplôme d'Etat De Docteur En Pharmacie, Université De Lorraine, 2015.
- [24] Dupont F, Guignard JI. Botanique : les familles des plantes. 15e éd. Issy-les-Moulineaux, Elsevier Masson, 2012. p. 16.
- [25] Chottard J. C, Depey J. C, Leroux .J. P. Chimie fondamentale, Hermann .1999.
- [26] Garibald J.A. i, Greenlaw J. Choi J, Fotovatjah M. Treatment of postoperative pain. CDA Journal.1995, 23, 71-72.
- [27] Colat-Parros J, Jorrdana F, Choussat P.H. Société Francophone de Biomateriaux Dentaires. Date de création du document 2010-2011.

[28] Amanda L, Dos S, Ch O. Gilberto A. Kenneth R. Alan. Crystal Structure Determination for Eugenol Acetate. J Chem Crystallogr. 2009, 39, 655-661.

Chapitre : II

[1] La liberté, Alain, techniques instrumentales en biologie médicale, tome 1

[2] Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M., Plant drug analysis, a thin layer chromatography Atlas, page 38.

[3] AFNOR éditions Norme NF ISO 1242 - Huiles essentielles - Détermination de l'indice d'acide 1999.

[4] Rabiai M. Étude physicochimique et évaluation de l'activité biologique d'une huile essentielle et l'extrait aqueux d'Eucalyptus globulus de la région M'sila, Mémoire de Master, Université M'sila, 2014,.

[5] Hellal Z, Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Magister en biologie spécialité : Biologie Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou, 2010-2011,

[6] a-Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. Nature 1958, 181,1199-1200) ; b-Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 1995, 28, 25-30.

[7] Dung N.T, Kim J.M, Kang S.C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology. 2008. 46:3632-3639.

[8] Prakash D., Upadhyay G, Brahma N., Singh H.B. Antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agriwastes of some varieties of soybean (*Glycine max*), Food Chemistry. 2007.104:783-790.

[9] Bouzid W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane M C et Ayachi A. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de L'Aubepine Monogyne. Lebanese Science Journal. 2011. 12 (1): 59-69.

[10] Louni M, Extraction, Caractérisation Physico-Chimique Et Microbiologique De L'huile Essentielle De Clou De Girofle, Mémoire De Master, UMMTO, 17 Septembre 2013, .

[11] Ramiarantsoa H, Yao-Kouassi P. A, Kanko C, Assi K.M, Djakoure A. L. et Tonzibo F. Z, Chemical Constituents Of The Antidiabetic Plant *Ravenala Madagascariensis*, Ramiarantsoa et al. IJPSR .2014 Vol. 5(12): 5503-5510.

[12] Tchiégang-Meguéni C. Variabilité des caractéristiques physico-chimiques des huiles de extraites des amandes *Balanites aegyptiaca* L. Del. En provenance du Cameroun et du Tchad. *Procédé Biologiques alimentaires*, 2003, 1(1): 11p).

[13] Adli Djallal Eddine H, Effets prophylactique de l'administration d'un extrait de *Syzygium aromaticum* (Clou de girofle) chez les rats wistar en croissance intoxiqués au plomb et au manganèse. Etude biochimique, histologique et neurocomportementale. Thèse de doctorat, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, 2014-2015.

Chapitre : III

[1] Beautrait A. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel. Thèse de Doctorat : chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France. 2008. 122p

[2] Thiriot E. Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. thèse de doctorat d'université : Chimie informatique et théorique. Nancy: Université de Nancy. France. 2009. 291p.

[3] Bouaziz-Terrachet S, Toumi-Maouche A, Maouche B, Taïri-Kellou S, Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: a molecular docking study, *J Mol Model* 16. 1919–1929 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0679-7>.

[4] Halit S, Benazzouz-Touami A, Makhoulfi-Chebli M, Terrachet Bouaziz S, IghilAhriz K, Sodium dodecyl benzene sulfonate-catalyzed reaction for green synthesis of biologically active benzylpyrazolyl-coumarin derivatives, mechanism studies, theoretical calculations, *Journal of Molecular Structure* .2022, 132908. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132908>.

[5] Morel F, Rousset F, Vu M, Nguyen C, Candice Trocme, LaurentGrange, BernardLardy, La NADPH oxydase Nox4, une cible thérapeutique potentielle dans l'arthroseNADPH oxydase Nox4, a putative therapeutictarget in osteoarthritis, *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, Volume 199, Issues 4–5, April–May 2015, Pages 673-687.

[6] Anguiano L, Riera M, Pascual J et Soler M. J. Circulating ACE2 in Cardiovascular and KidneyDiseases, *CurrentMedicinal Chemistry*, 25 Octobre 2017, vol. 24, n° 30, DOI 10.2174/0929867324666170414162841.

[7] Gavin Y. Oudit, Michael A. Crackower, Peter H. Backx et Josef M. Penninger The Role of ACE2 in CardiovascularPhysiology , *Trends in CardiovascularMedicine*, avril 2003, vol. 13, n° 3, p. 93-101. PMID 12691672, DOI 10.1016/S1050-1738(02)00233-5.

- [8] Louise M. Burrell, Colin I. Johnston, Christos Tikellis et Mark E. Cooper, ACE2, a new regulator of the renin–angiotensin system , Trends in Endocrinology and Metabolism, mai 2004, vol. 15, n° 4, 166-169. DOI 10.1016/j.tem.2004.03.001.
- [9] _Úri K, Fagyas M, MányinéSiket I , Attila Kertész, Zoltán Csanádi, Gábor Sándorfi, Marcell Clemens, Roland Fedor, Zoltán Papp, IstvánÉdes, Attila Tóth et Erzsébet Lizanecz, New Perspectives in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) IV: Circulating ACE2 as a Biomarker of Systolic Dysfunction in Human Hypertension and Heart Failure, PLoS One, avril 2014, vol. 9, n° 4. PMID 24691269, DOI 10.1371/journal.pone.0087845
- [10] Kuhn JH, Li W, Choe H, Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2: a functional receptor for SARS coronavirus. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(21):2738-43.
- [11] Williams TJ & Peck MJ. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation, Nature, 1977, 270: 530 – 532.
- [12] Caughey G, Cleland L , Penglis P, Gamble J, James M. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoïd production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2, J Immunol., 2001, 167:2831-8.
- [13] Meade E, Smith W, and DeWitt D .Differential Inhibition of Prostaglandin Endoperoxide Synthase (Cyclooxygenase) Isozymes by Aspirin and Other Non-steroidal Anti-inflammatory Drug, The Journal Biological Chemistry, 1993, 268: 6610-6614.
- [14] Kawatkar S, Keating T, Olivier N, Breen J, Green O, Guler S, Hentemann M, Loch J ,McKenzie A, Newman J, et al. Antibacterial Inhibitors of Gram-Positive Thymidylate Kinase: Structure–Activity Relationships and Chiral Preference of a New Hydrophobic Binding Region. J. Med. Chem., 2014, 57, 4584–4597.
- [15] Vanheusden V, Munier-Lehmann H, Froeyen M, Busson R, Rozenski J, Herdewijn P, Van Calenbergh S. Discovery of Bicyclic Thymidylate Analogues as Selective and High-Affinity Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Thymidylate Monophosphate Kinase. J. Med. Chem., 2004, 47, 6187–6194.
- [16] Abo-Salem H, Abd El Salam H, Abdel-Aziem A, Abdel-Aziz M, El-Sawy E. Synthesis, Molecular Docking, and Biofilm Formation Inhibitory Activity of Bis(Indolyl)Pyridines Analogues of the Marine Alkaloid Nortopsentin. Molecules., 2021, 26, 4112.
- [17] Dechouk L, Bouchoucha A, Abdi Y, Si Larbi K, Bouzaheur A, Bouaziz-Terrachet S. Coordination of new palladium (II) complexes with derived furopyran-3,4-dione ligands: Synthesis, characterization, redox behaviour, DFT, antimicrobial activity, molecular docking and ADMET studies., J. Mol. Struct., 2022, 1257, 132611.

- [18] <https://www.rcsb.org/>.
- [19] Hanwell M, Curtis D, Lonie D, Vandermeersch T, Zurek E, et Hutchison G. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *Journal of Cheminformatics*, 2012, 4:17.
- [20] Hsu K, Chen Y. Lin S. et al. iGEMDOCK: a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis. *BMC Bioinformatics* 12, S33, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S33>.
- [21] Biovia, Dassault Systems, Discovery studio 2016 Client, V-16.1, San Diego: Dassault Systems .2016.
- [22] Hadhoum N, Hadjadj-Aoul F, Smain H, Bouaziz-Terrachet S, Abdoun A, Seklaoui N, Boubrit F, et Mekacher L, Abderrahim W .Design And One-Pot Synthesis Of Some New [3,5-Di(4',5'-Diphenyl-2'-Substituted)-1h-Imidazol-1-Yl]]-1h-1,2,4-Triazole Derivatives : In Silico Admet And Docking Study, Antibacterial And Antifungal Activities Evaluation, *heterocycles*, 2021, 10(102) .1949 – 1968. DOI: 10.3987/COM-21-14503.
- [23] Rowlinson S, Kiefer J, Prusakiewicz J, Pawlitz J, Kozak K, Kalgutkar A, Stallings W, Kurumbail R, Marnett L, *Biol Chem J*.2003, 278:45763–45769 Kiefer J. R, Pawlitz J, Moreland K, Stegeman R, Hood W, Gierse J, Stevens A, Goodwin D, Rowlinson S, Marnett L, Stallings W, Kurumbail R. *Nature* .2000, 405:97–101.
- [24] Bouaziz-Terrachet S, Toumi-Maouche A, Maouche B. et al. Modeling the binding modes of stilbene analogs to cyclooxygenase-2: a molecular docking study. *J Mol Model*, 2010, 16, 1919–1929. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0679-7>.

Résumé

La médecine traditionnelle désigne l'art de se soigner par les plantes médicinales. Ceci consiste à utiliser des essences extraites de ces plantes et des huiles essentielles à des fins médicales ou cosmétiques. Ces huiles essentielles sont obtenues par plusieurs méthodes d'extraction comme l'hydrodistillation. Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur l'extraction, l'étude physico-chimique, la détermination de l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle de clou de girofle. Cette dernière, constituée essentiellement d'eugénol (80%), est utilisée depuis des décennies comme anti-inflammatoire, anti-oxydante, antimicrobienne et antiallergique. Dans le but de comprendre le mode de fonctionnement au sein de l'organisme, des études de docking moléculaire du principe actif de cette huile avec quatre cibles biologiques impliquées dans les pathologies du stress oxydatif, de l'inflammation, de l'allergie respiratoire et de la croissance des microbes telles que les bactéries ont été effectués. Les résultats montrent que l'huile extraite dans ce travail présente un profil antioxydant important et une grande affinité pour la cible impliquée dans le stress oxydant. De plus, les études de docking moléculaire montrent que le principe actif peut être un inhibiteur sélectif des cibles : la COX-2 (impliquée dans l'inflammation), l'ACE2 (considérée comme la porte d'entrée de coronavirus dans l'organisme) et la TMK protéine (une cible des agents antimicrobiens).

Mots clés : extraction, Huiles essentielles, activité anti-oxydante, anti Covid 19 ; anti-inflammatoire.

Abstract:

Traditional medicine refers to health practices, approaches, knowledge and beliefs incorporating medicinal plants. This consists in using essences extracted from these plants and essential oils for medical or cosmetic purposes. These essential oils are obtained by several extraction methods such as hydrodistillation. This work concerns the extraction, the physicochemical study, the determination of the antioxidant activity of the essential oil of clove. This latter, consisting mainly of eugenol (80%), has been used for decades as an anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and anti-allergic. In order to understand how it works in the body, molecular docking studies of the active ingredient of this oil with four biological targets involved in the pathologies of oxidative stress, inflammation, allergy, especially respiratory, and the growth of microbes such as bacteria were performed.

The results show that the oil extracted in this work has a significant antioxidant profile and a high affinity for the target involved in oxidative stress. In addition, molecular docking studies show that the active ingredient can be a selective inhibitor of the following targets: COX-2 (involved in inflammation), ACE2 (considered to be the gateway of coronavirus into the body) and TMK protein (a target of antimicrobial agents).

Keywords: extraction, essential oils, antioxidant activity, anti Covid 19, anti-inflammatory.