

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour l'obtention

Du diplôme de Master Académique

Intitulé

*Activité antibactérienne de l'huile
essentielle de clou de girofle sur la bactérie
responsable des caries dentaires*

Présenté par : SEDDIKI ISSAM ; SLIMANI CHADA LOUBNA ; MOHAMED SEGHIR
ZEYNEB ; SLINI CHAIMA.

Soutenu le **12/06/2024** devant le jury composé de :

Dr. GUETOUACHE Mourad	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Pr. MEDJEKAL Samir	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr. SELLOUM Mounir	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur

Année universitaire : 2023 /2024

Dédicace

À mes parents, **SEDDIK & HOURIA**, qui ont été une source constante de soutien, d'amour et d'encouragement tout au long de ce parcours. Votre foi en moi et votre soutien indéfectible ont été la fondation de mon succès. Cette thèse vous est dédiée à tous les deux pour tous les sacrifices que vous avez faits et pour votre amour inconditionnel.

À mes sœurs, **MERIEM & ROUEYA**, et à mon frère, **ZAKARIA**, qui m'ont aidé tout au long de ces années d'éducation.

À mes oncles, **SAMIR, RIYAD, et NASSER**, pour leur soutien et leurs encouragements.

لإخوتي في الله: لعلاوي محمد / ربيعي فارس لعموري / كحول سيد أحمد أيوب / جعفر الحاج اليزيد

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers mes directeurs de thèse, **Dr. HARRAR ABDENASSER, Dr. DEHIMI KHADIDJ, Pr. HAFSA CHERIF, Pr. MEDJEKAL Samir** pour leurs conseils éclairés, leur expertise et leur patience tout au long de ce processus. Vos orientations précieuses m'ont permis de développer mes compétences et de repousser mes limites. Je vous suis profondément reconnaissant pour votre mentorat.

Un merci spécial à mon ÉQUIPE, **CHAIMA, CHADA LOUBNA, ZEYNEB**, qui ont partagé cette aventure avec moi. Votre soutien mutuel, vos discussions stimulantes et vos encouragements constants ont rendu ce parcours encore plus mémorable. Vous avez été une source d'inspiration et de motivation.

Enfin, cette réussite est le fruit d'un effort collectif, et je suis honoré de partager cette thèse avec vous tous. Merci à chacun d'entre vous pour avoir contribué à mon succès académique.

ISSAM

Dédicace

En ce moment de réussite académique, je tiens à rendre hommage à ceux qui ont façonné mon esprit et veillé sur mon cœur.

*À mes chers parents, **Abdelkader** et **Leila**, dont la bienveillance et la sagesse ont été les fondations de mes rêves. Particulièrement à ma mère, dont la tendresse et la résilience ont nourri mon désir de savoir.*

*À mon frère **Mohamed**, compagnon de joies et de peines, dont la force tranquille a été mon refuge. À ma sœur **Mouna**, dont les rires et les encouragements ont illuminé ma vie.*

*À ma tante, la **Pr. Hafsa Cherif**, étoile guide dans mon parcours, et à son mari, le **Pr. Allaoua Silini**, pour leur soutien indéfectible et leurs conseils éclairés.*

*À mes mentors, **Dr. Dehimi Khadidja** et **Pr. Medjkal Samir**, qui ont forgé mon esprit. Leur passion pour la recherche et leur dévouement à l'excellence ont éclairé mon chemin.*

*À mon équipe, **Zeyneb, Issam et Chaima** qui a partagé les longues heures de travail et les moments de découverte, je dois une grande part de mes accomplissements. Votre esprit de collaboration et votre amitié sincère ont enrichi les idées de cette thèse.*

Enfin, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce voyage intellectuel, je vous adresse mes chaleureux remerciements. Que ce mémoire reflète notre travail commun et notre passion partagée pour la connaissance.

Chada Loubna.

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères à mon cœur mon père **MOURAD**, pour ta sagesse, ton soutien et ton amour inconditionnel, ce mémoire est le témoignage de ma gratitude. Je te remercie pour tout le soutien que tu m'as apporté depuis mon enfance et j'espère que tes bénédictions seront toujours avec moi.

À la personne la plus gentille qui soit, ma mère **FATIHA**. Je tiens à exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as faits pour mon éducation et mon bien-être. Que ce modeste travail soit l'accomplissement de tes souhaits formulés, le fruit de tes innombrables sacrifices. Que Dieu le Très-Haut te donne la santé, le bonheur et une longue vie.

À mes chères sœurs **HADJER, MERIEM et AMIRA** que dieu les protèges.

À mon grand pères et grand mères **Lallah Yarhamhoum**.

À toute ma famille, Ma tante, oncles, cousins et cousines, petit et grand sans exception.

À tous mes amis et tous ceux que j'aime.

Dédicace spéciale au **Dr. HARRAR ABDENASSER, Pr. MEDJEKAL Samir**, je vous suis infiniment reconnaissant pour votre investissement dans ce travail et pour la confiance, votre amabilité, votre sérieux, votre compétence, votre patience et surtout pour vos précieux conseils et connaissances.

À mon chères équipe, **ISSAM, CHADA LOUBNA & ZEYNEB**, avec qui j'ai partagé ce travail, les bons moments et les moments difficiles, ainsi que de nombreux souvenirs inoubliables.

Merci à chacun et à chacune qui a contribué de près ou de loin à mon succès académique et à ce travail.

CHAIMA

Dédicace

*A mes chers parents **MOHAMED** et **NORA** que j'aime trop, aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être. Sans eux je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui. Je les dédie pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et tout le soutien et l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études.*

*A ma sœur **ISMAHANE** et son mari, aux mes frères **ILYAS**, **OUSSAMA** et **ISHAQ**, aux femmes de mes frères, qui ont toujours été là pour m'assister et m'encourager. Leur présence a été une source inébranlable de force*

*Aux fils de ma sœur et aux fils de mes frères, **IKRAME**, **MERIEM**, **AMINE**, **AHLAM**, **HADIL**, **KINAN**, **ASSIL**, **AMANI**, que j'aime beaucoup, que Dieu les protège pour moi.*

*Dédié à mon défunt cousin **HAMOUDI** qui attendait mon succès auprès de moi. Que Dieu ait pitié de lui et lui accorde une place spacieuse au Paradis.*

Aux mes proches amies, pour leur amitié précieuse et inestimable.

*Je dédie et remercie s'étendant également notre encadrant, Pr. **MEDJKAL Samir**, et tous mes enseignants durant les années d'étude.*

*À **Chada**, **Issam** et **Chaima**, notre collaboration a été le pilier de notre projet. Nous avons fait une belle expérience mémorable. Merci d'avoir créé des souvenirs inoubliables.*

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

ZEYNEB

Remerciement

أولاً وقبل كل شيء، نشكر الله العليّ القدير والرحيم، الذي أعطانا القوة والصبر في هذا العمل المتواضع.

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre superviseur, le **Prof. MEDJEKAL Samir**, pour nous avoir accordé le grand honneur de superviser et guider ce travail.

De même, nous exprimons notre appréciation aux membres du jury **GUETOUACHE Mourad, SELLOUM Mounir** pour nous avoir accordé l'honneur et la chance d'examiner et de réviser notre humble travail.

Nous tenons également à remercier chaleureusement le **Dr. ABDELNASSER HARRAR, Dr. DEHIMI KHADIDJA**, pour ses efforts tout au long de cette année.

Cela a été un immense privilège de bénéficier de leur sagesse profonde, de leur connaissance exceptionnelle et de leur guidance inestimable.

Nous remercions **Pr. CHERIF Hafsa /Pr. SILINI Allaoua** pour leurs conseils et pour avoir fourni les éléments manquants.

Nous remercions les ingénieurs de laboratoire, dirigés par le chef **Kamel Seghiri**

Nous exprimons notre gratitude envers également tous les **membres administratifs du département de microbiologie et de biochimie**, en particulier, ainsi que de la **Faculté des sciences naturelles et de la vie en général**, qui ont contribué sans relâche au bon déroulement de nos études tout au long de nos années de licence.

Nous ne pouvons pas ignorer les contributions inestimables de nos **familles**, dont le soutien indéfectible a été la pierre angulaire de notre progrès. Leur amour et leur encouragement inébranlables nous ont propulsés en avant, et nous leur devons une dette de gratitude pour leur présence dans nos vies.

En conclusion, nous sommes extrêmement reconnaissants pour le soutien collectif et l'encouragement que nous avons reçus de tous ceux qui ont fait partie de notre parcours. Votre croyance en nos capacités a été une source constante de motivation, et nous exprimons notre gratitude la plus profonde pour avoir rendu cette reconnaissance vraiment magnifique.

ISSAM & CHADA LOUBNA & ZEYNEB & CHAIMA

Sommaire

Résumé	i
Liste des abréviations	ii
Liste des figures	iii
Liste des tableaux.....	v
Introduction.....	1
Chapitre I. Etude bibliographique	2
I.1. Généralités sur bucco-dentaire.....	2
I.1.1. Définition	2
I.1.2. Composition de la muqueuse buccale.....	2
I.1.3. Fonctions de la muqueuse buccale.....	3
I.1.4. Système immunitaire buccale	3
I.1.5. Les principales pathologies bucco-dentaires	5
I.2. Caries dentaires.....	6
I.2.1. Définition	6
I.2.2. Les facteurs responsables de la carie dentaire	6
I.2.3. Épidémiologie	8
I.2.4. Caractéristiques cliniques	8
I.2.5. Physiopathologie.....	9
I.2.6. Formation de la matrice de la plaque dentaire	9
I.2.7. Événements biochimiques dans la plaque dentaire.....	11
I.2.8. Méthodes de diagnostic.....	14
I.2.9. Traitement	16
I.2.10. Prévention	16
I.3. Bactéries responsables de la carie dentaire	17
I.3.1. Composition microbienne de la plaque dentaire.....	17
I.3.2. Streptococcus.....	19

I.3.3. Lactobacillus	22
I.4. Clou de girofle	24
I.4.1. Généralités	24
I.4.2. Classification.....	24
I.4.3. Caractéristiques morphologiques.....	25
I.4.4. Nomenclature.....	27
I.4.5. Propriétés biochimiques.....	28
I.4.6. Les activités biologiques de l'huile essentielle de clou de girofle.....	30
Chapitre II. Matériels et méthodes.....	32
II.1. Matériels	32
II.1.1. Matériel végétal	32
II.1.2. Matériel et produits.....	32
II.1.3. La souche bactérienne utilisée	33
II.2. Méthodes	33
II.2.1. Extraction d'huile	33
II.2.2. Activité antibactérienne.....	34
Chapitre III. Résultats et discussion	38
III.1. Le rendement de l'extraction -RHE-.....	38
III.2. Analyses physico-chimiques	38
III.2.1. Etude des propriétés organoleptiques.....	38
III.2.2. Le pH.....	39
III.3. Identification de la souche.....	40
III.4. Résultat de test de catalase.....	40
III.5. Résultat de l'activité antibactérienne	41
III.6. La concentration minimale inhibitrice	43
Conclusion.....	46
Références bibliographiques	47

ملخص

شجرة القرنفل هي نوع من النباتات المزهرة في عائلة Mertaceae و جنس Syzigium، يستخدم أساساً في خصائصه العلاجية في صحة الفم. وتهدف دراستنا إلى تقييم تأثير الزيت الأساسي للقرنفل المستخرج من هذه النبتة على البكتيريا المسؤولة عن تسوس الأسنان. ويتم استخراج الزيت الأساسي عن طريق التقطير المائي، قمنا بجمع البكتيريا من فم مصاب بتسوس بفضل طبيب أسنان في بوسعادة، ثم يتم التعرف عليها وعزلها في مختبرنا. ثم تستخدم طريقة نشر القرص لتقييم النشاط المضاد للبكتيريا. وكان إنتاج الزيت الأساسي 6.08 %، وحُدِّد النشاط المضاد للبكتيريا على سلالة بكتيرية *Streptococcus mutans* (Gram+)، وتتراوح أقطار التثبيط (منطقة التثبيط) بين 15 ملليمترًا و3 ملليمترات، وكان الحد الأدنى للتركيزات المثبطة (MIC) بالنسبة لـ *S. Mutans* هو 0.19. يمكننا أن نستنتج أن القوة المضادة للبكتيريا لزيت القرنفل الأساسي قد يكون لها تأثير أفضل في الجسم الحي على حدوث انخفاض تكوين الأغشية الحيوية في تسوس الأسنان من هذه النتائج، يمكن ملاحظة أن الزيت العطري للقرنفل سيزيجيوم أروماتيكوم له تأثير مضاد للبكتيريا في المختبر على السلالة البكتيرية المدروسة، ومن الممكن أن يكون له تأثير أفضل في الجسم الحي على الحد من تكوين الأغشية الحيوية لتسوس الأسنان.

الكلمات المفتاحية:

شجرة القرنفل، الزيت الأساسي، تسوس الأسنان، النشاط المضاد للبكتيريا، *Streptococcus mutans*.

Abstract

Syzygium aromaticum is a species of flowering plant in the Myrtaceae family and the Syzygium genus, mainly used for its therapeutic properties in oral health. Our study aims to assess the impact of clove essential oil extracted from this plant on the bacteria responsible for dental caries. The essential oil is extracted by hydro-distillation, and the bacteria are collected from a dentist in Bou-Saâda, then identified and isolated in our laboratory. The disk diffusion method is then used to assess antibacterial activity. Essential oil yield was 6.08%, antibacterial activity was determined on a *Streptococcus mutans* (Gram+) bacterial strain, inhibition diameters (inhibition zone) ranged from 3 mm to 15 mm, minimum inhibitory concentration (MIC) for *S.mutans* was 0.19. From these results, we can see that *Syzygium aromaticum* clove essential oil exerts antibacterial power in vitro on the bacterial strain studied and may have a better in vivo effect on the incidence of reduced biofilm formation in dental caries.

Key words: *Syzygium aromaticum*, essential oil, dental caries, antibacterial activity, *Streptococcus mutans*.

Résumé

Syzygium aromaticum est une espèce de plante à fleurs de la famille des Myrtaceae et du genre *Syzygium*, principalement utilisée pour ses propriétés thérapeutiques en santé bucco-dentaire. Notre étude vise à évaluer l'impact de l'huile essentielle de clou de girofle extraite de cette plante sur la bactérie responsable des caries dentaires. L'huile essentielle est extraite par hydro-distillation, et la bactérie est prélevée chez un dentiste à Bou-Saâda, puis identifiée et isolée dans notre laboratoire, la méthode de diffusion sur disque est ensuite utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne. Le rendement de l'huile essentielle était de 6,08 %, l'activité antibactérienne a été déterminée sur une souche bactérienne de *Streptococcus mutans* (Gram+), les diamètres d'inhibition (zone d'inhibition) variaient entre 3 mm et 15 mm, la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour *S.mutans* est de 0.19. A partir de ces résultats, on peut constater que l'huile essentielle de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) exerce un pouvoir antibactérien *in vitro* sur la souche bactérienne étudiée et il est possible qu'elle ait une meilleure action *in vivo* sur l'incidence de la diminution de la formation de biofilm des caries dentaires.

Mots clés : *Syzygium aromaticum*, l'huile essentielle, caries dentaires, l'activité antibactérienne, *Streptococcus mutans*.

Liste des abréviations

AFNOR : L'Association française de normalisation

Clou : l'angle

CMB : Concentrations bactéricide minimale

CMI : Concentrations minimale inhibitrice

DMSO : Diméthyl-sulfoxyde

E.coli : *escherichia coli*

FACE : Fluorescence-Assistée pour l'Excavation des Caries

FOTI : Transillumination Fibre-Optique

GS : Gélose au sang

HE : Huile Essentielle

MEB : Microscopie électronique à balayage

RHE : Rendement d'huiles essentielles

S.mutans : *Streptococcus mutans*

Syzygium aromaticum : Clou de girofle

Liste des figures

Figure I.1. Zones de composition différente de la muqueuse buccale .	2
Figure I.2. Fonctions de la muqueuse buccale	3
Figure I.3. Système immunitaire buccale	4
Figure I.4. Carie dentaire	6
Figure I.5. Schéma montrant la multiplicité des facteurs qui influencent l'apparition et la vitesse de progression des caries dentaires	7
Figure I.6. Biofilms dentaires ou plaque d'âge inconnu chez un adulte africain -a- et chez un Chinois âgé -b-	8
Figure I.7. Schéma des réactions enzymatiques proposées qui mènent à la formation des principaux composants protéiques et glucidiques de la matrice de la plaque dentaire	10
Figure I.8. Graphique montrant le changement dans les proportions relatives des organismes sélectionnés dans la plaque dentaire en développement	11
Figure I.9. Schéma représentant le saccharose	12
Figure I.10. La fermentation de l'arginine par certains <i>streptocoques</i> buccaux et lactobacilles...	13
Figure I.11. La croissance et le stockage du glycogène par un streptocoque. La croissance est indiquée par l'augmentation de l'azote cellulaire N/ml et le stockage du glycogène par le rapport glucides/azote. rapport glucides/azote	13
Figure I.12. Les différences dans la diffusion de la lumière entre la FOTI et l'évaluation visuelle.	14
Figure I.13. Détection de caries d'une seule surface proximale avec le DIAGNOdent stylo -a-, pointe en forme de coin doit être insérée dans l'espace proximal à la fois du côté vestibulaire - b- et du côté oral -c-. Le point rouge indique la direction du faisceau	15
Figure I.14. Fluorescence-Assistée pour l'Excavation des Caries : FACE	15
Figure I.15. Structure de deux genre de streptococcus	19
Figure I.16. structure de surface cellulaire de streptococcus	20
Figure I.17. Emplacements des espèces de <i>Lactobacillus</i> dans divers niches du corps humain	22
Figure I.18. Les principaux producteurs mondiaux de clous de girofle sont les Antilles, Madagascar, la Tanzanie, l'Inde, le Sri Lanka, l'Indonésie et la Malaisie	24

Figure I.19. <i>Syzygium aromaticum</i>	26
Figure I.20. Différentes parties de <i>S. aromaticum</i> . -A- Plante entière ; -B- boutons floraux séchés ; -C- fruit ; -D- feuille	27
Figure II.1. Clou de girofle.....	32
Figure II.2. Extraction d'huile	34
Figure II.3. Méthode d'extraction par hydrodistillation	34
Figure III.1. HE de Clou de girofle	39
Figure III.2. Test de catalase sur lame	40
Figure III.3. Les zones d'inhibitions sur GS.....	41
Figure III.4. Microplaque	43

Liste des tableaux

Tableau I.1. Les principales pathologies bucco-dentaires.....	5
Tableau I.2. Approches pour la prévention des caries .	16
Tableau I.3. Micro-organismes couramment présents dans la plaque dentaire .	17
Tableau I.4. La capacité des bactéries à adhérer aux surfaces des dent	18
Tableau I.5. Pourcentage d'isolement des souches bactériennes à partir des dents	18
Tableau I.6. Les genres de <i>Streptococcus</i> et les maladies qu'ils provoquent	21
Tableau I.7. Classification scientifique de <i>S. aromaticum</i> -clou de girofle-	25
Tableau I.8. Composition et propriétés de l'huile essentielle de girofle .	28
Tableau III.1. Résultat du rendement d'HE de Clou de girofle	38
Tableau III.2. Caractéristiques organoleptiques de l'HE de Clou de girofle	39
Tableau III.3. Résultat du pH d'HE de Clou de girofle	39
Tableau III.4. Observation macroscopique et microscopique	40
Tableau III.5. Les résultats de la première boîte qui contient les témoins, l'antibiotique et HE pure	41
Tableau III.6. Les résultats des différentes dilutions de l'huile (zone d'inhibition)	42
Tableau III.7. Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de clou de girofle sur <i>S. mutans</i> réalisé par la méthode de CMI.	43
Tableau III.8. Les résultats de CMI et CMB.	44
Tableau III.9. Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de clou de girofle sur <i>E.coli</i> réalisé par la méthode de CMI.	44

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales demeurent la principale source de nouveaux médicaments, étant considérées comme une ressource fondamentale pour découvrir de nouvelles molécules nécessaires au développement de médicaments futurs (Maurice, 1997).

L'analyse des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydantes et antimicrobiennes demeure une entreprise extrêmement intéressante et profitable, en particulier pour les plantes moins fréquemment utilisées ou non reconnues dans la médecine traditionnelle. Ces plantes fournissent une nouvelle source de substances actives (da Silva, 2004).

L'histoire médicale et l'examen clinique font partie intégrante de tout contact avec le patient, y compris les patients présentant des pathologies buccales (Sonis & Sonis, 2012).

Les clous de girofle, principalement utilisés comme épice, sont également appréciés en herboristerie en Inde et en Asie du Sud-Est. Ils sont originaires des îles Moluques et sont l'une des premières épices à être commercialisées dès l'Antiquité. L'huile est extraite des tiges et des feuilles du giroflier, mais la meilleure huile essentielle est issue des bourgeons (Iserin, 2001).

Notre étude vise à estimer l'efficacité de l'huile essentielle de cette espèce végétale et à évaluer son pouvoir biologique contre une bactérie responsable des caries dentaires.

Chapitre I : Partie bibliographique

Chapitre I. Etude bibliographique

I.1. Généralités sur bucco-dentaire

I.1.1. Définition

Le buccale humaine est un environnement favorable à une flore microbienne diverse, comprenant des bactéries, des champignons et des virus (Gregorczyk-Maga *et al.*, 2023). Les tissus buccaux sont constamment exposés à ces microbes, formant une communauté écologique complexe qui influence la santé buccale et systémique, l'aspect microbiologique des maladies buccales se concentre traditionnellement sur les bactéries et les champignons, mais les virus suscitent de plus en plus d'attention en tant qu'agents pathogènes buccaux. Plusieurs virus ont été découverts dans la cavité buccale et sont impliqués dans des ulcères buccaux, des tumeurs et des maladies infectieuses (Thakkar *et al.*, 2022).

I.1.2. Composition de la muqueuse buccale

La muqueuse masticatoire protège les parties de la cavité buccale qui sont constamment soumises à un fort stress mécanique en raison de la mastication des aliments. Dans ces régions, telles que le palais dur et la gencive, la muqueuse est attachée directement ou indirectement au périoste de l'os sous-jacent, ce qui la maintient immobile. La muqueuse de revêtement se trouve à l'intérieur des lèvres, de la muqueuse buccale et des joues, du plancher de la bouche, des processus alvéolaires où la gencive est mobile, du palais mou et de la face inférieure de la langue -Fig I.1-.

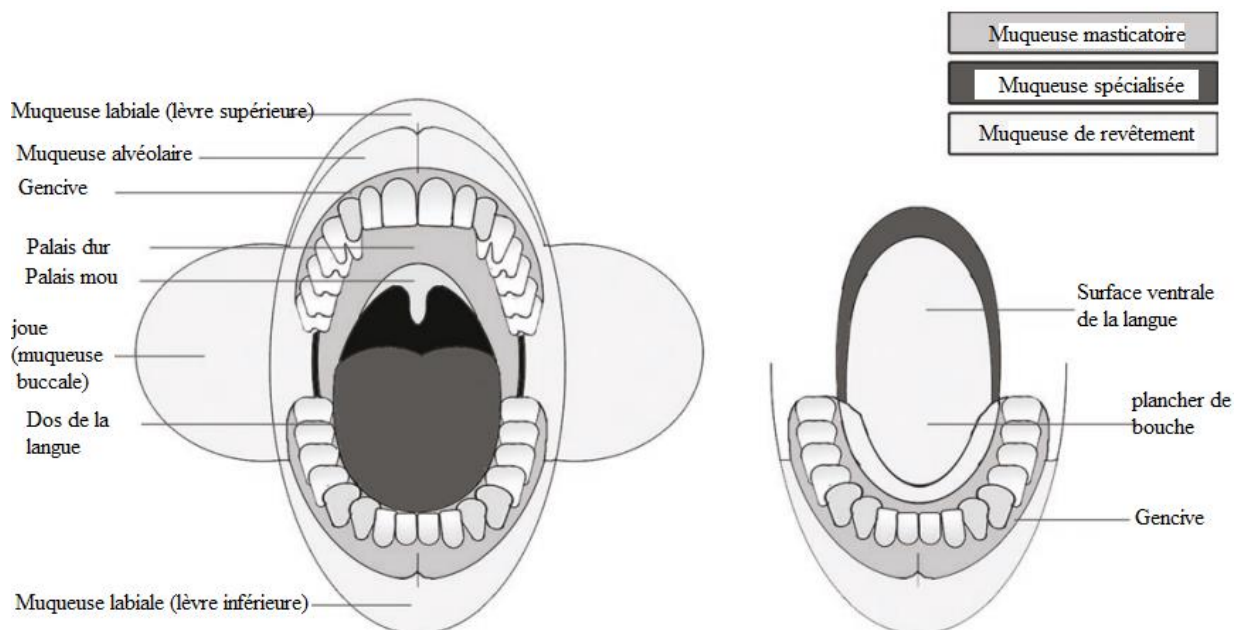


Figure I.1. Zones de composition différente de la muqueuse buccale (Squier & Brogden, 2010).

I.1.3. Fonctions de la muqueuse buccale

La muqueuse buccale est une première ligne d'exposition aux micro-organismes et juxtapose plusieurs tissus et structures mécaniques uniques (Stolley *et al.*, 2023).

La muqueuse buccale remplit plusieurs fonctions -Fig I.2-

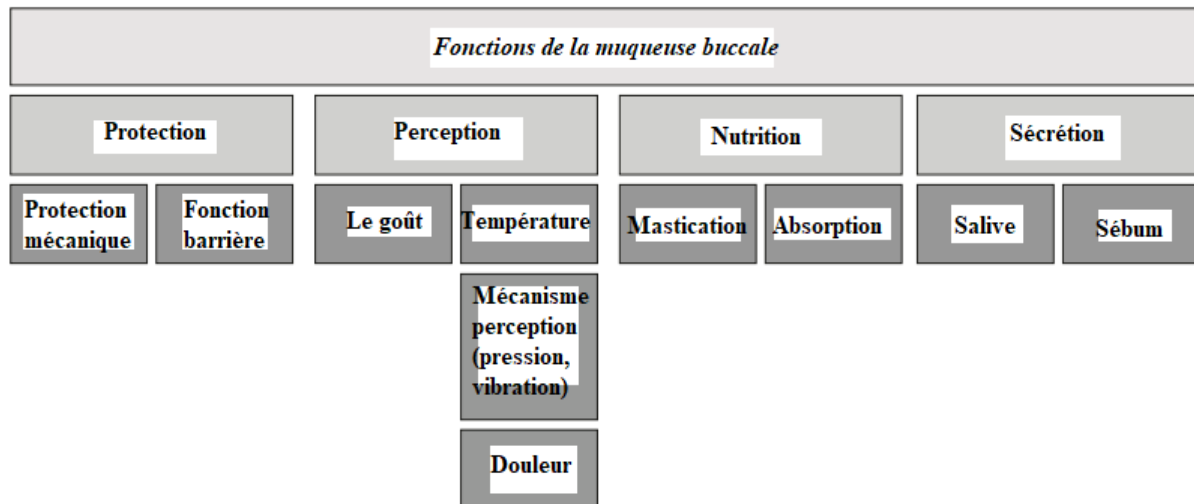


Figure I.2. Fonctions de la muqueuse buccale (Moxham *et al.*, 2018)

I.1.4. Système immunitaire buccale

Les petits ganglions lymphatiques et l'anneau de Waldeyer jouent un rôle essentiel dans le maintien de la fonction immunitaire de la muqueuse buccale. L'immunité innée et adaptative forment un réseau et contribuent à la défense contre les microorganismes via des mécanismes distincts, en tant que partie importante du système immunitaire, la salive contient non seulement des IgA sécrétoires, mais aussi une multitude d'autres agents antimicrobiens tels que la lactoferrine, le lysozyme et les agglutinines pour la défense contre les bactéries, La réponse immunitaire innée est un système rapide. Les cellules épithéliales contribuent en reconnaissant les motifs associés aux pathogènes ou aux dommages grâce à des récepteurs spécialisés, qui activent à leur tour le système immunitaire inné -Fig I.3-.

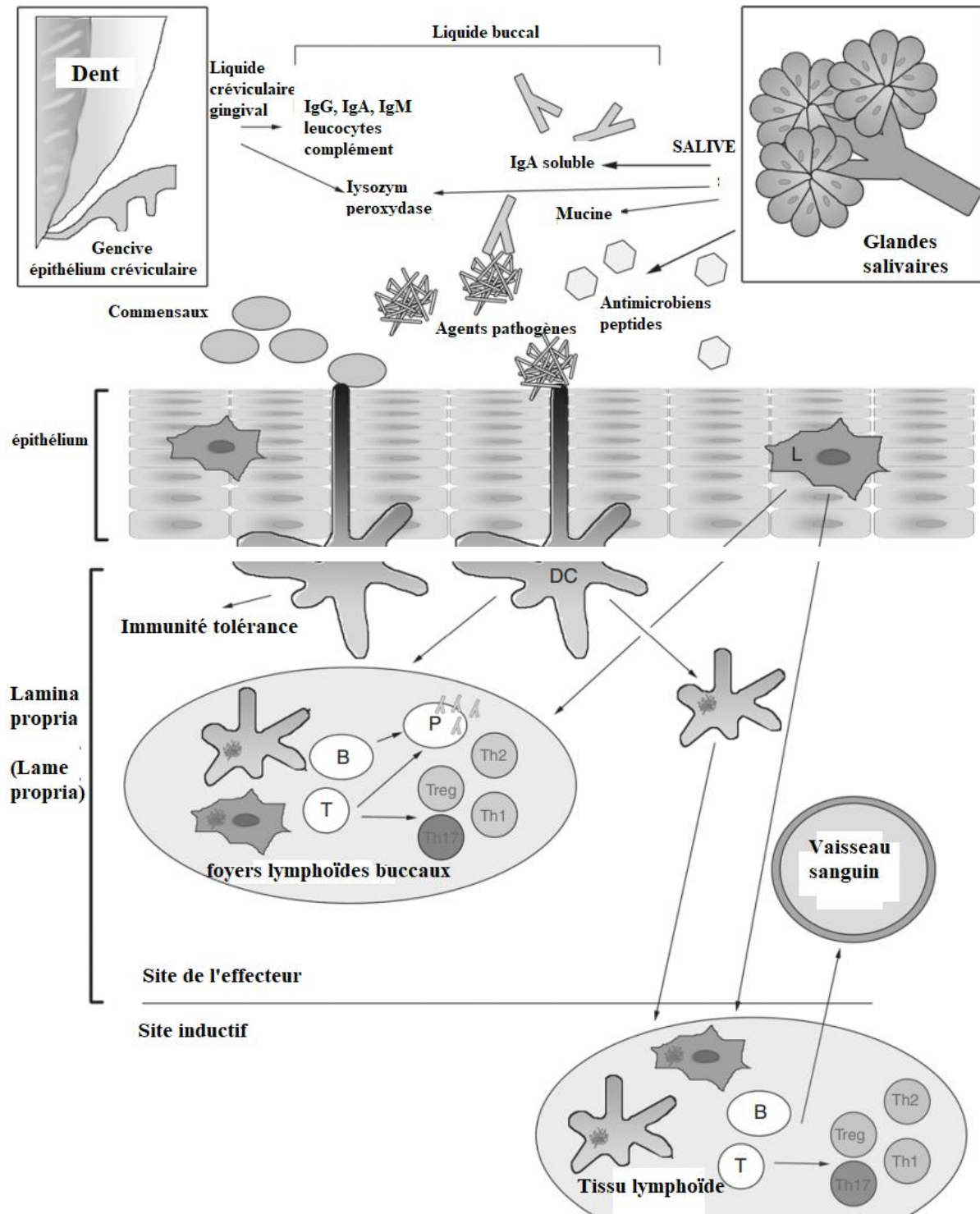


Figure I.3. Système immunitaire buccale (Bergmeier, 2018)

La barrière immunitaire de la muqueuse buccale. Des substances antimicrobiennes sont sécrétées dans la salive et le liquide gingival. Les cellules de Langerhans [CL] et les cellules dendritiques [DC] incorporent les antigènes et migrent ensuite soit vers les foyers lymphoïdes buccaux situés dans la lamina propria, soit vers les tissus lymphoïdes, par exemple les ganglions lymphatiques régionaux, l'anneau de Waldeyer. Dans ces sites, elles

induisent une réponse immunitaire adaptative spécifique et assurent la médiation de la tolérance immunitaire [Cellule B ; cellule plasmotique P ; cellule T ; cellule T régulatrice Treg.

I.1.5. Les principales pathologies bucco-dentaires

Le tableau suivant représente les différentes maladies bucco-dentaires -Tab I.1-.

Tableau I.1. Les principales pathologies bucco-dentaires.

Maladie	Définition
Carie	« Une détérioration de l'émail dentaire suivie par l'altération de la dentine, résultant en la formation d'une cavité » (Bergmeier, 2018).
Abcès dentaire	« Une accumulation de pus causée par une infection bactérienne, localisée autour d'une dent ou des gencives » (Abbe-Denizot, 2023).
Maladie parodontale	Il s'agit également d'une maladie bactérienne infectieuse. Son développement est lent et peut provoquer une gingivite et/ou une parodontite plus ou moins graves. Les espèces bactériennes principales concernées sont celles qui se trouvent généralement dans la plaque dentaire et peuvent coloniser les surfaces voisines (Houle & Grenier, 2003).
Mycose buccale	La mycose buccale est un problème de muqueuse parasitaire provoqué par un micro-organisme du genre <i>Candida</i> , une espèce de levure (Krowchuk & Mancini, 2019).
Stomatite et gingivo-stomatite	Les stomatites désignent une inflammation de la muqueuse buccale qui peut également toucher les gencives, dans ce cas on parle de gingivo-stomatite (Pédiatriques, 2018).
Xérostomie	Cette affection affecte principalement les individus âgés de 10 à 40 et se manifeste par une sensation de sécheresse buccale décrite et ressentie par le patient (Mariette, 2004).
Hypersensibilité dentinaire et collets dénudés	C'est une douleur soudaine et vive ressentie au niveau de la dentine exposée, stimulée par des éléments comme la chaleur., le froid, la

pression, les aliments sucrés ou acides, et qui ne peut être associée à aucun autre problème ou condition dentaire (Hypersensitivity, 2003).
--

I.2. Caries dentaires

I.2.1. Définition

La carie dentaire est l'infection la plus fréquente de la bouche est une infection chronique. Les bactéries fréquemment impliquées sont *Streptococcus mutans*, les *lactobacilles*, *Actinomyces spp.* et quelques autres bactéries anaérobies, elle contribue au développement de maladies systémiques telles que le diabète, ce qui indique que la prévention et le traitement de la carie dentaire sont importants pour la santé de chaque patient et également pour l'ensemble de la société (Peres *et al.*, 2019).



Figure I.4. Carie dentaire (Kidd & Fejerskov, 2016).

I.2.2. Les facteurs responsables de la carie dentaire

Les facteurs provoquant la carie dentaire sont nombreux -Fig I.5-, et la principale cause est la plaque dentaire -Fig I.6-. Celle-ci est constituée de colonies de bactéries formant un biofilm qui n'est pas éliminé de la surface des dents et s'agrandit progressivement en raison de la croissance bactérienne entraînant la présence simultanée de types de colonies bactériennes plus complexes, avec également une augmentation du nombre de bactéries pathogènes. Pendant la phase de croissance du biofilm dentaire, les bactéries colonisatrices secondaires produisent un métabolite bactérien unique appelé porphyrine. Ce biofilm contenant de la porphyrine se manifeste par une fluorescence rouge, et l'intensité de la fluorescence est significativement corrélée à diverses variables liées à la carie dentaire (Kim *et al.*, 2016).

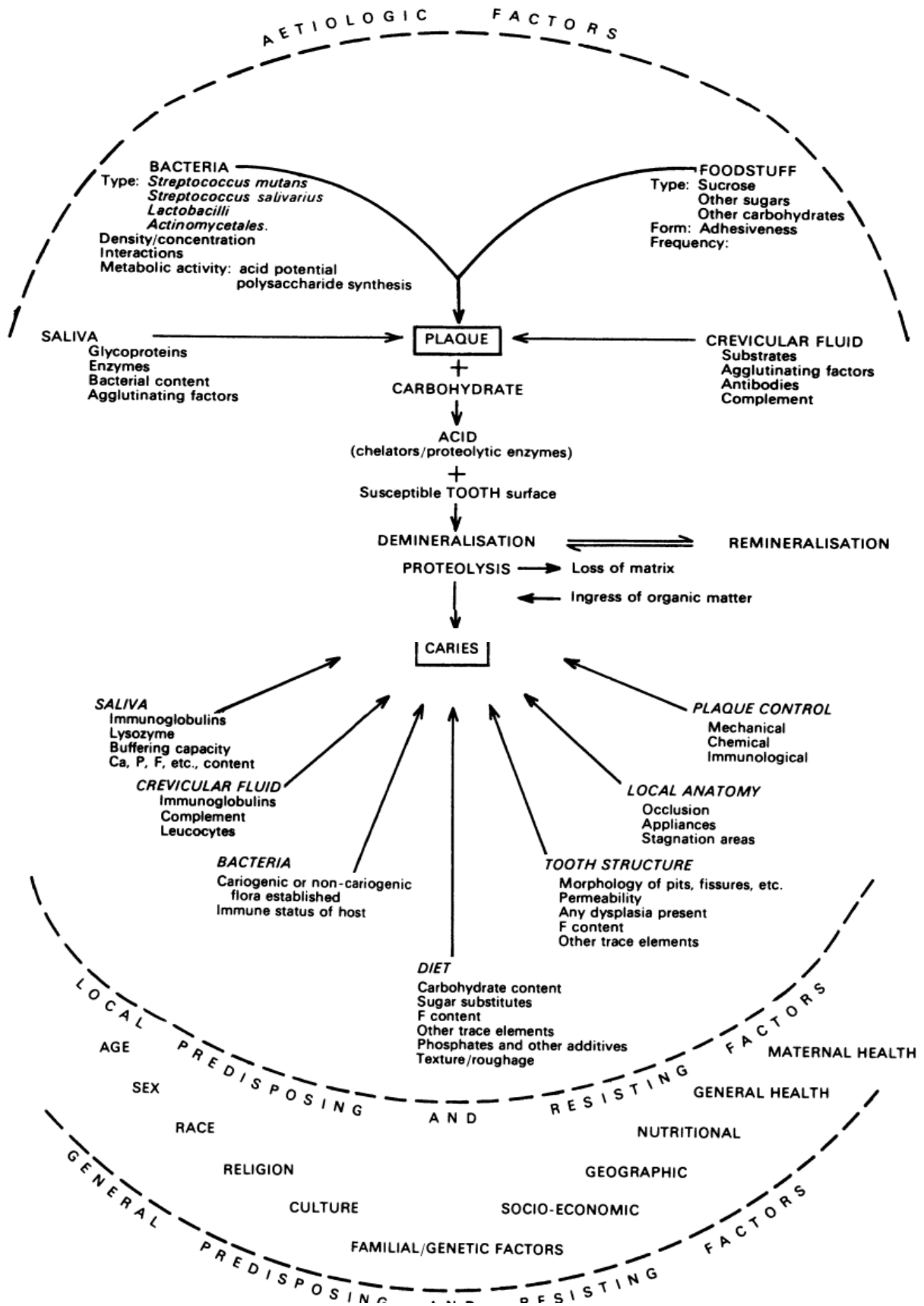


Figure I.5. Schéma montrant la multiplicité des facteurs qui influencent l'apparition et la vitesse de progression des caries dentaires (Silverstone *et al.*, 1981).

Aetiologic factors : facteurs étiologiques

Local predisposing and resisting factors : facteurs locaux de prédisposition et de résistance

General predisposing and resisting factors : les facteurs généraux de prédisposition et de résistance

Food stuff : aliments

Crevicular fluid : liquide créviculaire

Saliva : salive

Bacteria : Bactéries

Tooth structure : structure dentaire



Figure I.6. Biofilms dentaires ou plaque d'âge inconnu chez un adulte africain -a- et chez un Chinois âgé -b- (Kidd & Fejerskov, 2016).

I.2.3. Épidémiologie

La prévalence de la carie dentaire atteint jusqu'à 80 % chez les enfants et quasiment 100 % chez les adultes. La carie dentaire est la principale cause de perte de dents chez les enfants et les jeunes adultes, et elle est également la principale cause de détérioration des racines des dents chez les personnes âgées (Petersen *et al.*, 2005).

Les caries dentaires peuvent varier considérablement en intensité de leur attaque, même dans une société où elles sont très répandues, elles peuvent affecter une dent chez un individu ou elles peuvent affecter trente-deux dents ; chaque lésion peut être à peine discernable ou elle peut détruire la couronne entière de la dent, donc une mesure de l'intensité des caries est nécessaire pour la plupart des objectifs, l'intensité est mesurée par une valeur numérique décrivant l'état relatif d'une population sur une échelle graduée avec des limites supérieures et inférieures définies, conçue pour permettre et faciliter les comparaisons avec d'autres populations classées selon les mêmes critères et méthodes (Silverstone *et al.*, 1981).

I.2.4. Caractéristiques cliniques

Initialement, les patients atteints de caries dentaires ne ressentent aucun symptôme. Cependant, des caries dentaires chroniques non traitées entraînent souvent des symptômes sévères tels qu'une douleur persistante, la perte de dents, une angine de Ludovici, une septicémie, une

thrombose du sinus caverneux, une diminution de la qualité de vie, des jours d'école perdus pour les enfants, des perturbations de la vie familiale et une baisse de la productivité au travail (Peres *et al.*, 2019).

I.2.5. Physiopathologie

La carie dentaire est la dissolution de l'émail dentaire jusqu'à la cavitation due aux acides produits par les bactéries dans la plaque dentaire ou le biofilm en présence de glucides fermentescibles, les espèces bactériennes acidogènes-aciduriques les plus pertinentes impliquées dans l'initiation et la progression de la carie sont *Streptococcus mutans*, *les bifidobacterium* et les *lactobacillus*, les facteurs de stimulation de l'activité microbienne et de la dynamique des lésions carieuses sont des conditions environnementales spécifiques, principalement la présence de sucres alimentaires fermentescibles et l'absence d'oxygène, les conditions entraînant une moindre production de salive sont également des facteurs de risque pour la carie dentaire, après une stimulation carieuse, les odontoblastes activés et les cellules pulpaire peuvent repousser l'attaque microbienne et réparer les dommages en initiant une réaction inflammatoire et en synthétisant une dentine tertiaire protectrice (Qiu *et al.*, 2020).

I.2.6. Formation de la matrice de la plaque dentaire

Les micro-organismes dans la plaque dentaire sont incorporés dans une matrice organique qui occupe l'espace entre les cellules bactériennes individuelles ou les micro-colonies et représente environ 30 % du volume total de la plaque, le composant protéique de la matrice est déposé par l'élimination enzymatique des résidus d'acide sialique terminal sur les chaînes latérales des molécules de glycoprotéines salivaires, plusieurs micro-organismes buccaux produisent une enzyme, la neuraminidase, qui effectue cette réaction, les glycoprotéines altérées, privées de leurs résidus d'acide sialique, sont apparemment dans une configuration moins soluble et sont par conséquent déposées autour des micro-organismes, les composants glucidiques de la matrice proviennent principalement des plusieurs polysaccharides extracellulaires différents produits par les bactéries de la plaque, généralement à partir de saccharose, étant donné que la composition chimique de la matrice de la plaque est complexe et provient de plusieurs sources, il est difficile de découvrir quels composants ont été dérivés de quels micro-organismes particuliers *in vivo*, en raison de ces problèmes, les chercheurs ont examiné la production de polysaccharides extracellulaires par des cultures pures de bactéries *in vitro*, et ont extrapolé leurs résultats à la situation qui existe dans la bouche. *Streptococcus mutans* a été étudié en détail à cet égard, des souches de cette espèce ont été montrées pour produire plusieurs types de polysaccharides extracellulaires à partir de saccharose, notamment à la fois des glucanes solubles et insolubles, et

des polymères de fructose. Ces polysaccharides sont produits grâce à des enzymes extracellulaires qui clivent la molécule de saccharose disaccharide et utilisent soit les parties glucose soit les parties fructose pour la formation de polymères. Ces enzymes, les transférases glucosyl et fructosyl, sont parfois appelées dextransucrase ou lévansucrase -Fig I.7-.

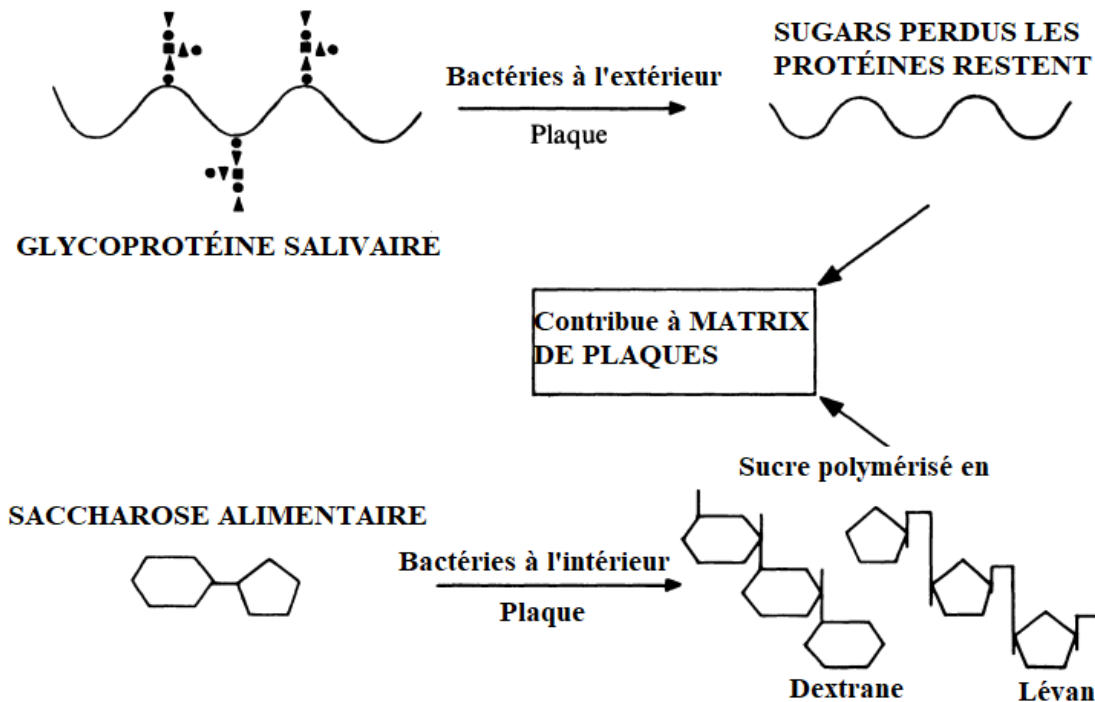


Figure I.7. Schéma des réactions enzymatiques proposées qui mènent à la formation des principaux composants protéiques et glucidiques de la matrice de la plaque dentaire (Leach, 1970).

1.2.6.1. Succession bactérienne lors de la formation de la plaque

Une fois que la plaque dentaire s'est développée pendant plusieurs jours ou semaines, elle contient un grand nombre de types bactériens variés. Avant d'atteindre cette étape, souvent appelée plaque "mûre" ou "établie", il est possible de démontrer que la microflore se développe en nombre et en complexité de manière raisonnablement ordonnée et reproductible -Fig I.8-.

Des études plus récentes ont indiqué que *Streptococcus sanguis* est un organisme prédominant parmi les premiers colonisateurs de la surface dentaire. *Actinomyces viscosus* a également été régulièrement trouvé dans la plaque dentaire précoce, ainsi que *S. mitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptostreptococcus* sp, et *Veillonella alcalescens*. Certaines espèces ont été signalées comme étant régulièrement présentes dans des mélanges de deux organismes ou plus intimement associés, appelés "paires suspectes" (Socransky *et al.*, 1977).

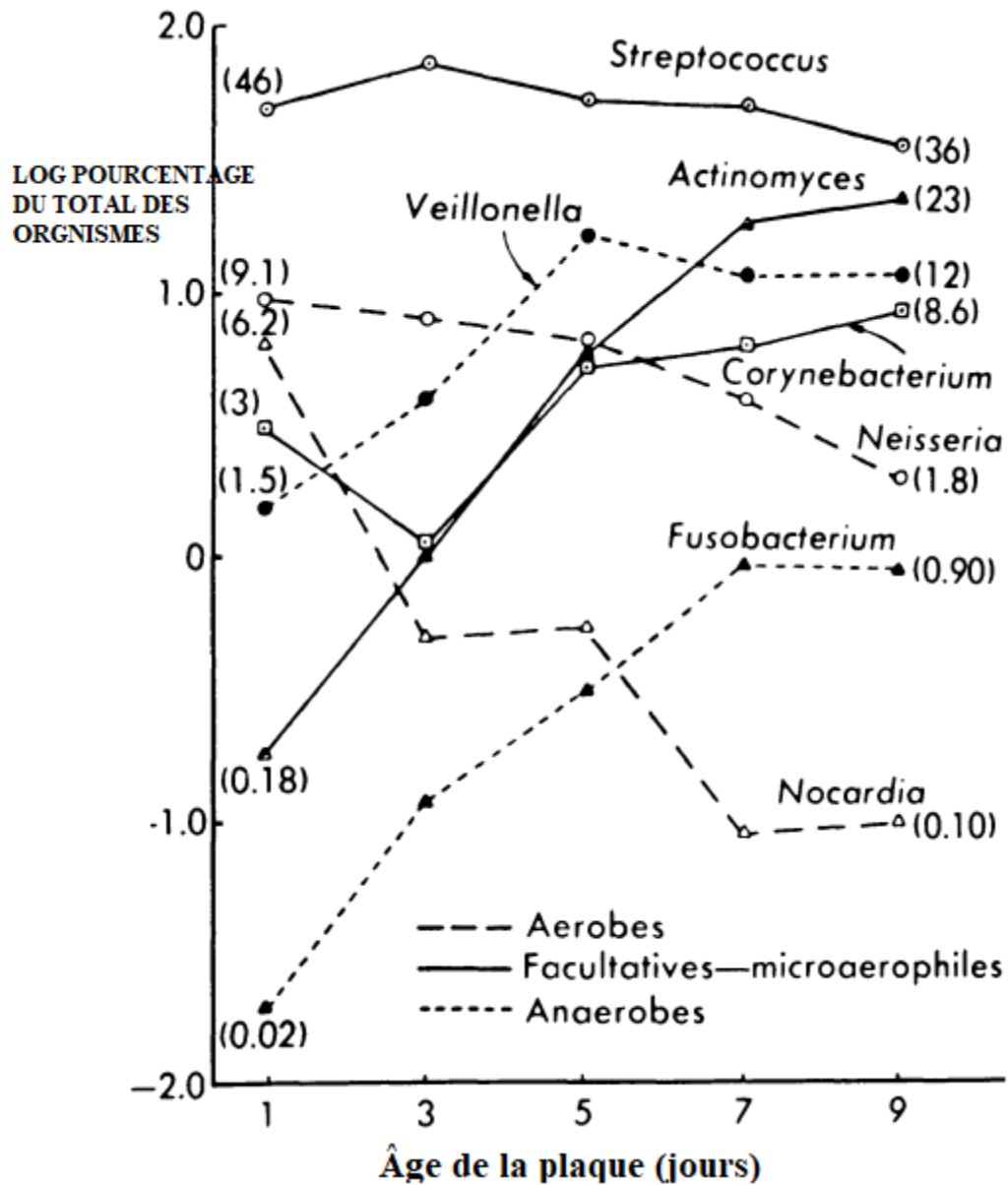


Figure I.8. Graphique montrant le changement dans les proportions relatives des organismes sélectionnés dans la plaque dentaire en développement (Ritz, 1967).

I.2.7. Événements biochimiques dans la plaque dentaire

I.2.7.1. Catabolisme des glucides

La plaque dentaire contient des bactéries capables d'utiliser de nombreux glucides différents comme substrats, on utilise ce fait dans l'identification et la classification des bactéries, mais beaucoup de ces substrats sont des sucres qui se trouvent à une concentration très faible, voire pas du tout, dans l'alimentation humaine et dans la salive, et ne sont donc pas significatifs dans la nutrition des bactéries de la plaque.

La majorité des aliments riches en glucides proviennent de produits végétaux riches en amidon, la consommation de saccharose comme sucre de canne ou de betterave est la plus élevée dans les pays les plus riches où l'apport total en glucides est le plus bas, le saccharose est un disaccharide, ses deux composants sucrés étant le β -fructose et le α -glucose. Ils sont liés de l'atome de carbone 1 du glucose à l'atome de carbone 2 du fructose par une liaison dont l'énergie libre d'hydrolyse est similaire à celle de l'adénosine triphosphate ATP -Fig I.9-.

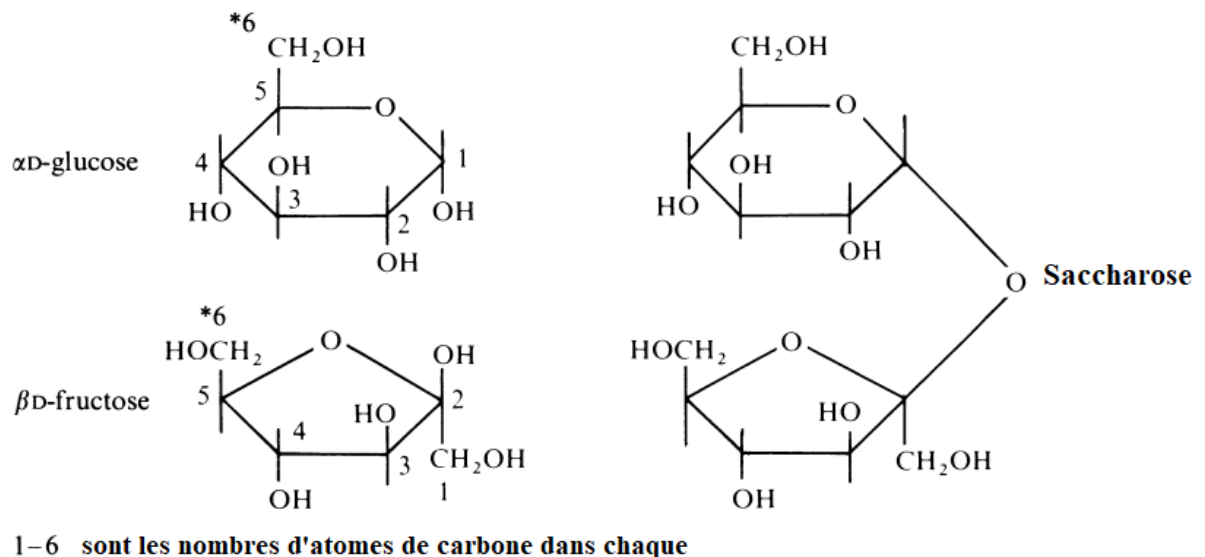


Figure I.9. Schéma représentant le saccharose (Silverstone *et al.*, 1981)

1.2.7.2. Catabolisme des acides aminés

Les acides aminés se trouvent à de faibles concentrations dans la salive, dans les aliments et dans le liquide qui suinte des gencives en cas de gingivite. La lyse ou dégradation des cellules hôtes et des bactéries de la plaque libère de plus petites quantités, de bien plus grandes quantités d'acides aminés se trouvent combinés dans les protéines des aliments, de la salive, des cellules hôtes et des bactéries buccales, mais les acides aminés combinés ne sont pas disponibles pour le catabolisme tant que les molécules de protéines qui les contiennent ne sont pas hydrolysées par des enzymes protéolytiques.

La dégradation des acides aminés par les bactéries buccales n'est pas aussi bien étudiée que le catabolisme des glucides, et dans de nombreux cas, le rendement énergétique et la voie du métabolisme sont inconnus, cependant, la fermentation de l'arginine par certains *streptococcus* buccaux et lactobacilles est bien connue -Fig I.10-.

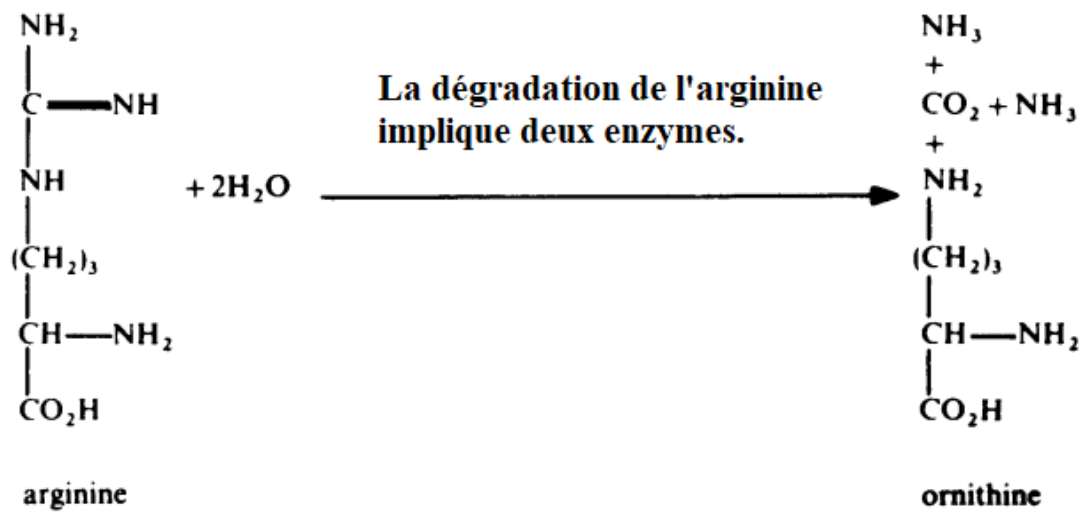


Figure I.10. La fermentation de l'arginine par certains *streptocoques* buccaux et lactobacilles (Silverstone *et al.*, 1981)

I.2.7.3. Polysaccharides de stockage

Le mécanisme de synthèse et de dégradation du glycogène bactérien est similaire à celui des systèmes mammifères, à la différence que le substrat pour le glycogène synthétase est l'ADP-glucose au lieu de l'UDP-glucose, la bactérie de la plaque *Streptococcus mitis* peut accumuler un glycogène très ramifié jusqu'à 37 % du poids sec des cellules, lorsque ce *streptocoque* a été inoculé dans un milieu contenant 0,1 % de glucose, le stockage du glycogène a commencé immédiatement, -Fig I.11-.

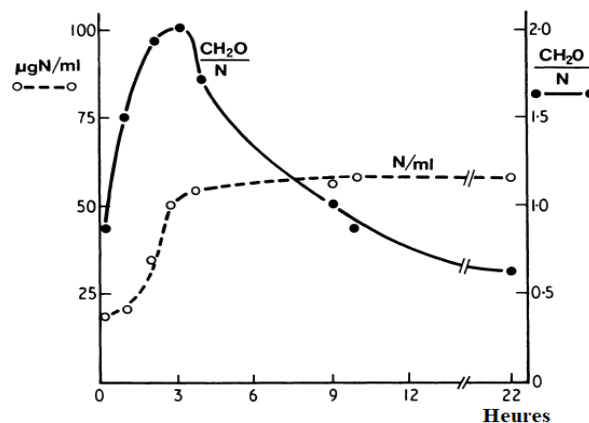


Figure I.11. La croissance et le stockage du glycogène par un streptocoque. La croissance est indiquée par l'augmentation de l'azote cellulaire N/ml et le stockage du glycogène par le rapport glucides/azote. rapport glucides/azote (Gibbons & Kapsimalis, 1963).

Pendant les trois premières heures, la croissance s'est produite indiquée par l'augmentation de l'azote cellulaire par ml, et la synthèse du glycogène a également eu lieu indiquée par l'augmentation du rapport glucides/azote CH₂₀/N dans les cellules. À ce stade, la croissance a cessé en raison de l'épuisement du glucose, et la dégradation des polysaccharides a commencé. La turbidité de la culture a diminué pendant cette phase en raison de la perte de masse cellulaire à mesure que le rapport glucides/azote diminuait.

I.2.8. Méthodes de diagnostic

I.2.8.1. Transillumination Fibre-Optique : FOTI

Dès la fin des années 1800, la transillumination TI des dents a été préconisée comme méthode diagnostique pour la détection et l'évaluation des caries, l'introduction de guides de lumière en fibres optiques a suscité un nouvel intérêt académique et une série de publications de recherche pour soutenir la méthode (Stokey, 1996).

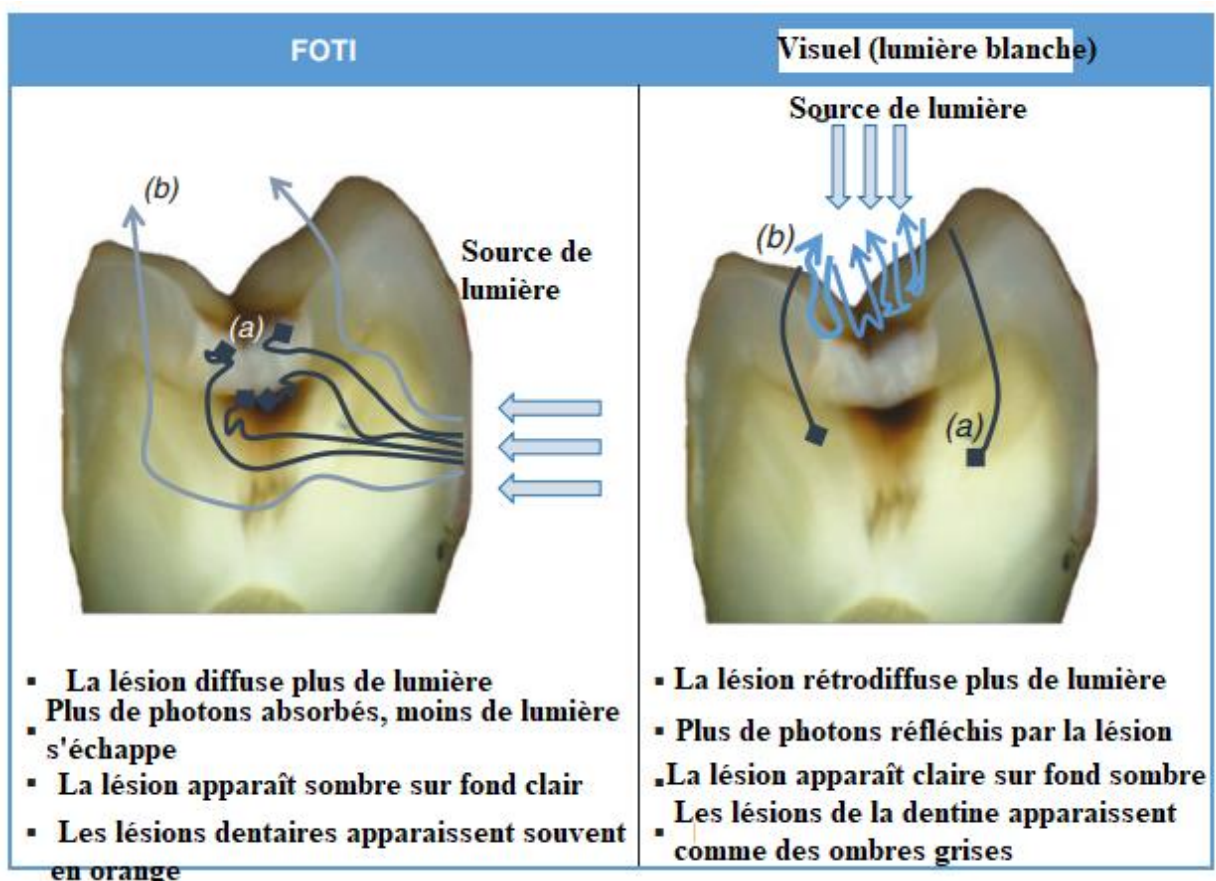


Figure I.12. Les différences dans la diffusion de la lumière entre la FOTI et l'évaluation visuelle (Zandona & Longbottom, 2019).

I.2.8.2. DIAGNOdent

Le dispositif DIAGNOdent a donc été développé à la fin des années 1990 pour l'évaluation des sites occlusaux. Au début des années 2000, un dispositif DIAGNOdent de type stylo a été

développé pour les sites approximaux également, les deux dispositifs opèrent à une longueur d'onde de 655 nm. La lumière est émise à partir d'une diode laser spécifique, ce qui provoque la fluorescence des porphyrines bactériennes. L'intensité de la fluorescence de la carie est liée à l'intensité de la contamination bactérienne, c'est-à-dire à la profondeur de la lésion (Lussi & Hellwig, 2006).

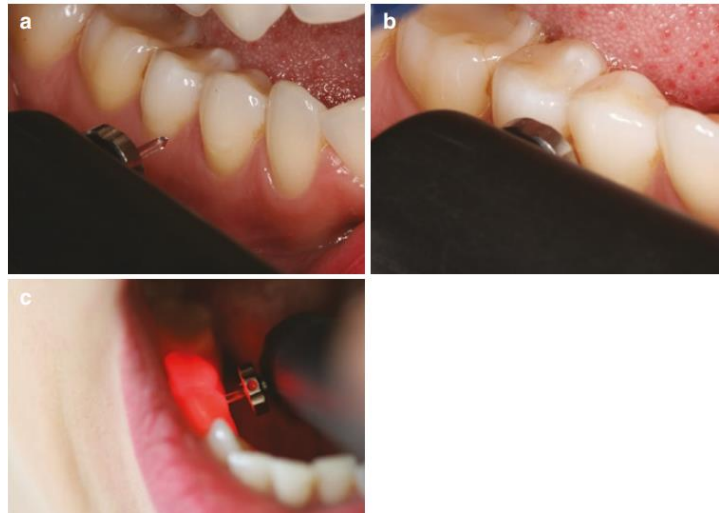


Figure I.13. Détection de caries d'une seule surface proximale avec le DIAGNOdent stylo -a-, pointe en forme de coin doit être insérée dans l'espace proximal à la fois du côté vestibulaire -b- et du côté oral -c-. Le point rouge indique la direction du faisce (Zandona & Longbottom, 2019)

1.2.8.3. Fluorescence-Assistée pour l'Excavation des Caries : FACE

Depuis l'introduction de la méthode FACE -Excavation des Caries Assistée par Fluorescence-, un outil est désormais disponible qui peut identifier la présence de bactéries dans la dentine *in vivo* avec une précision similaire aux méthodes de laboratoire -Fig I.14-.

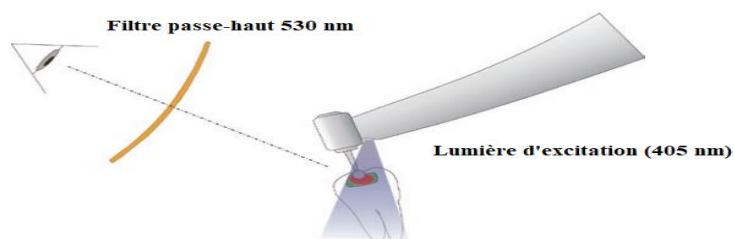


Figure I.14. Fluorescence-Assistée pour l'Excavation des Caries : FACE (Zandona & Longbottom, 2019)

I.2.9. Traitement

Le traitement local/systémique de la carie dentaire comprend l'élimination des zones nécrotiques et contaminées ainsi que l'utilisation d'antibiotiques buccaux tels que la pénicilline, les tétracyclines, le métronidazole, les macrolides et la clindamycine, d'autres agents antimicrobiens tels que le fluorure, la chlorhexidine, les sels d'ammonium quaternaire, les agents de reminéralisation et leurs combinaisons. En cas de formation de cavités, le traitement restaurateur conventionnel doit être envisagé. La prévention de la carie dentaire comprend une hygiène buccale, l'utilisation topique de fluorure et des modifications alimentaires telles que la limitation de la consommation de sucre (Dorri *et al.*, 2017).

I.2.10. Prévention

La démarche de prévention implique de s'attaquer à l'accumulation de plaque dentaire en utilisant du dentifrice fluoré, en stimulant la production de salive, en effectuant un nettoyage interdentaire avec du fil dentaire et/ou des brossettes, ainsi qu'en subissant régulièrement des détartrages et des polissages, de limiter la consommation d'aliments susceptibles de causer des caries et de réduire les grignotages entre les repas, tout en consultant régulièrement un dentiste (Malbos, 2022).

Tableau I.2. Approches pour la prévention des caries (Silverstone *et al.*, 1981).

Contrôle de la plaque	Mécanique Chimique Immunologique
Contrôle alimentaire	Réduction de la fréquence de consommation d'hydrates de carbone Substituts du saccharose Additifs
Augmenter la résistance de la dent : <ul style="list-style-type: none"> • Méthodes pré-éruptives • Méthodes post-éruptives 	Adéquat nutrition Fluorure systémique Fluorures topiques Scellants de fissures Solutions reminéralisantes

Théoriquement, des tentatives peuvent être faites pour prévenir les caries en modifiant l'un des facteurs étiologiques interagissant dans la partie supérieure de la -Fig I.5-, montrée précédemment, ou en améliorant certains des facteurs de résistance dans la partie inférieure du schéma, ainsi, des tentatives peuvent être faites pour contrôler les caries en modifiant le régime alimentaire d'un individu - d'abord pour qu'il soit nutritionnellement adéquat et que les dents soient bien formées *in utero* et dans l'enfance, ensuite en restreignant la quantité et la fréquence de consommation d'aliments cariogènes, en particulier le saccharose, et enfin en ajoutant des agents inhibiteurs tels que des phosphates et des fluorures au régime alimentaire -Tab I.2-.

I.3. Bactéries responsables de la carie dentaire

I.3.1. Composition microbienne de la plaque dentaire

La plaque dentaire est un facteur majeur pour les caries dentaires, comme illustré dans la -Fig I.5-, elle contient plusieurs espèces microbiennes, qu'elles soient bactériennes ou fongiques - Tab I.3-.

Tableau I.3. Micro-organismes couramment présents dans la plaque dentaire (Silverstone *et al.*, 1981).

<i>Gram-positif</i>		<i>Gram-négatif</i>	
Cocci	Des bâtonnets et des filaments	Cocci	Des bâtonnets et des filaments
Streptocoques	<i>Actinomyces</i>	<i>Neisseria</i>	Bacteroides
Peptocoque	<i>Lactobacillus</i>	<i>Branhamella</i>	Fusobacterium
Peptostreptocoque	<i>Bacterionema</i>	<i>Veillonella</i>	Haemophilus
Staphylocoque	<i>Rothia</i>		Vibrio
<i>Micrococcus</i>	<i>Arachnia</i>		Leptotrichia
	<i>Bifidobacterium</i>		Capnocytophaga
	<i>Eubacterium</i>		Sélénomonas
	<i>Propionibacterium</i>		Spirochètes

I.3.1.1. Les genres des bactéries présentes dans les dents

Tableau I.4. La capacité des bactéries à adhérer aux surfaces des dent (RJ, 1972).

Genre	Capacité
<i>Streptococcus mutans</i>	Faible à élevé
<i>Streptococcus sanguis</i>	Élevé
<i>Streptococcus salivarius</i>	Faible
<i>Neisseria species</i>	Faible
<i>Veillonella species</i>	Faible

I.3.1.2. L'isolement des souches bactériennes des dentsTableau I.5. Pourcentage d'isolement des souches bactériennes à partir des dents (Silverstone *et al.*, 1981).

Type d'organismes	Fréquence d'isolement %
<i>Streptococci</i>	100
<i>Lactobacilli</i>	36
<i>Veillonella</i>	94
<i>Neisseria</i>	99
<i>Fusobacterium</i>	55
<i>Rothia</i>	40
<i>Bacteroides</i>	35
<i>Bacterionema</i>	16

I.3.2. Streptococcus

I.3.2.1. Définition

Streptococcus est un genre de bactéries Gram-positives très important en médecine et dans l'industrie. Différents streptocoques jouent un rôle essentiel dans l'environnement en tant que parties de la flore microbienne normale des animaux et des humains. Certains peuvent également causer des maladies, allant du stade subaigu à l'aigu, voire chroniques. La scarlatine, la maladie cardiaque rhumatismale, la glomérulonéphrite et la pneumonie à pneumocoques sont des maladies humaines importantes causées par les streptocoques. Les streptocoques jouent un rôle crucial dans l'industrie et la production laitière, ainsi que comme des indicateurs de pollution (Ronald & Alfa, 1996).

I.3.2.2. Structure

Structure de deux genres de streptococcus -Fig I.15-, La structure de surface cellulaire de streptococcus -Fig I.16-.

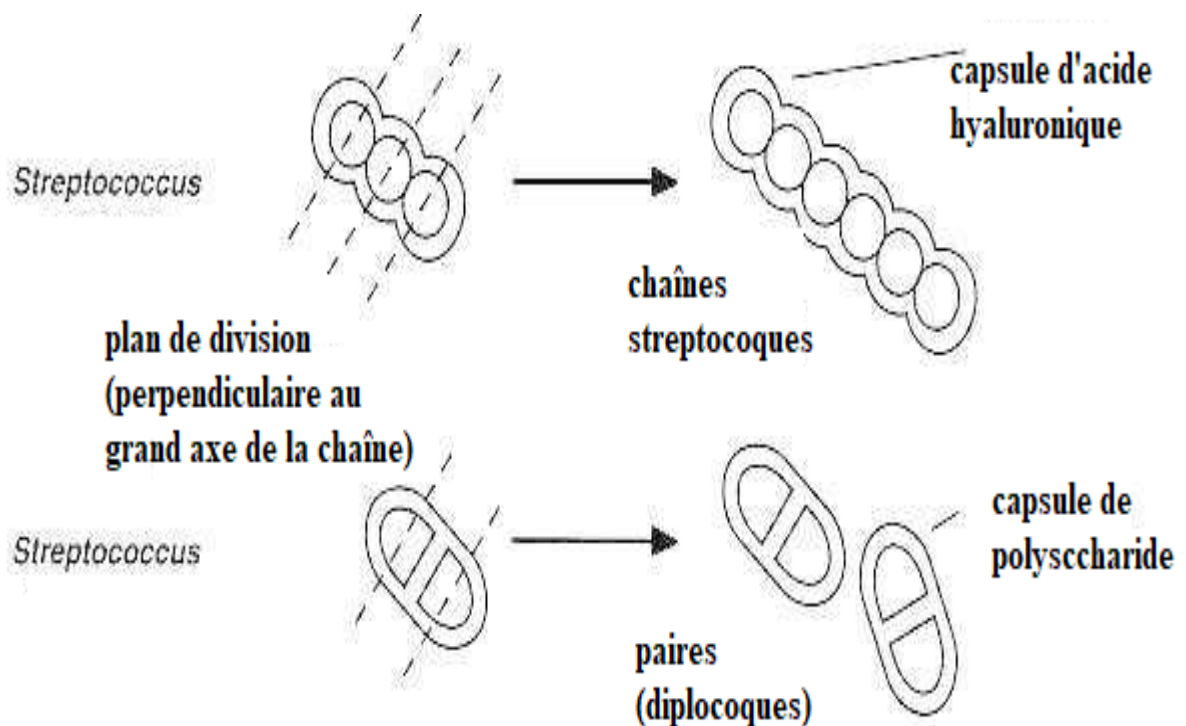


Figure I.15. Structure de deux genre de streptococcus (Baron *et al.*, 1996).

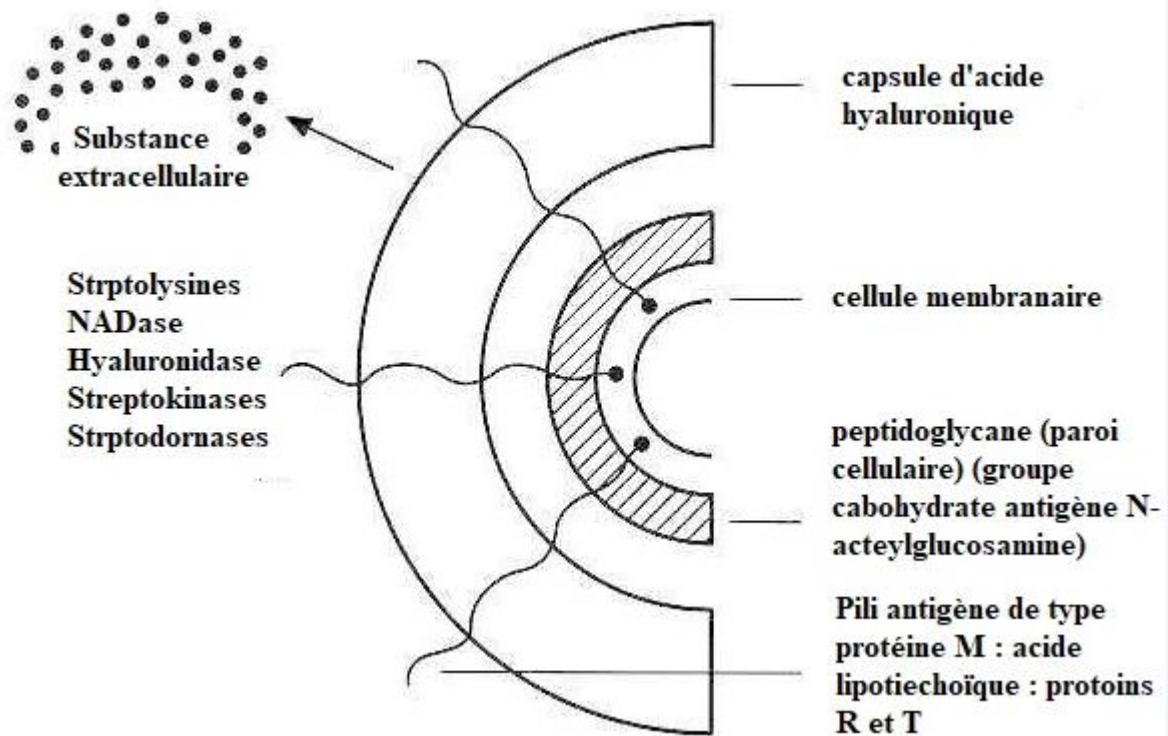


Figure I.16. structure de surface cellulaire de streptococcus (Baron *et al.*, 1996).

1.3.2.3. Classification

Le tableau suivant représente les espèces de streptococcus et les problèmes -Tab I.6-.

1.3.2.3.1 Les streptocoques *viridans*

Le groupe biochimiquement et antigéniquement diversifié d'organismes classés comme *Streptococcus viridans*, ainsi que d'autres streptocoques non groupables des cavités buccale et gastro-intestinale et du tractus urogénital, comprennent des agents étiologiques importants de l'endocardite bactérienne. La manipulation dentaire et les maladies dentaires avec la bactériémie transitoire associée sont les facteurs prédisposants les plus courants dans l'endocardite bactérienne, surtout si les valves cardiaques ont été endommagées par une fièvre rhumatismale antérieure ou par une cardiopathie congénitale cyanotique, *S. mutans* et *S. sanguis* sont des odontopathogènes responsables de la formation de la plaque dentaire. La masse microbienne adhésive dense qui colonise les dents et est liée aux caries et à d'autres maladies buccales humaines. *S. mutans* est l'espèce la plus cariogène des deux, et sa virulence est directement liée à sa capacité à synthétiser du glucane à partir de glucides fermentescibles ainsi qu'à modifier le glucane pour favoriser une adhésivité accrue (Ronald & Alfa, 1996).

Tableau I.6. Les genres de *Streptococcus* et les maladies qu'ils provoquent (Albrecht *et al.*, 1996).

Espèces	Maladies
<i>S.pyogenes</i>	Pharyngite aiguë et autres
<i>S.agalactiae</i>	Méningite et septicémie néonatales, et infections de l'adulte
<i>S.equismilis</i>	Endocardite, bactériémie, pneumonie, méningite, infection légère des voies respiratoires supérieures
<i>S.bovis</i>	Infection des voies biliaires ou urinaires, endocardite
<i>S.anginosus</i>	Abcès sous-cutanés ou d'organes, endocardite, infection légère des voies respiratoires supérieures
<i>S.sanguis</i>	Endocardite, caries
<i>S.salivarius</i>	Endocardite, caries
<i>S.suis</i>	Méningite
"Viridans" <i>S.mitis</i> <i>S.mutans</i>	Caries, endocardite
<i>S.pneumoniae</i>	Pneumonie lobaire et autres

1.3.2.4. Les caractéristiques du streptocoque mutans

Streptococcus mutans est un coccus (bactérie ronde) à Gram positif, anaérobie facultatif, que l'on trouve couramment dans la cavité buccale humaine et qui contribue de manière significative à la carie dentaire. Il fait partie des "streptocoques", un nom général informel pour toutes les espèces du genre *Streptococcus*. Le microbe a été décrit pour la première fois par James Kilian Clarke en 1924 (Clarke, 1924).

I.3.3. Lactobacillus

I.3.3.1. Définition

Lactobacillus est un genre de bactéries non sporulées, anaérobies facultatifs, en forme de bâtonnets, à Gram positif, du phylum des Firmicutes. Les lactobacilles métabolisent les glucides pour produire de l'acide lactique, ce qui en fait le plus grand genre au sein du groupe des bactéries lactiques -LAB- (Ibrahim, 2016).

I.3.3.2. Classification

Les lactobacilles sont des membres essentiels d'une microbiote humaine saine et sont présents dans diverses niches du corps humain -Fig I.17-.

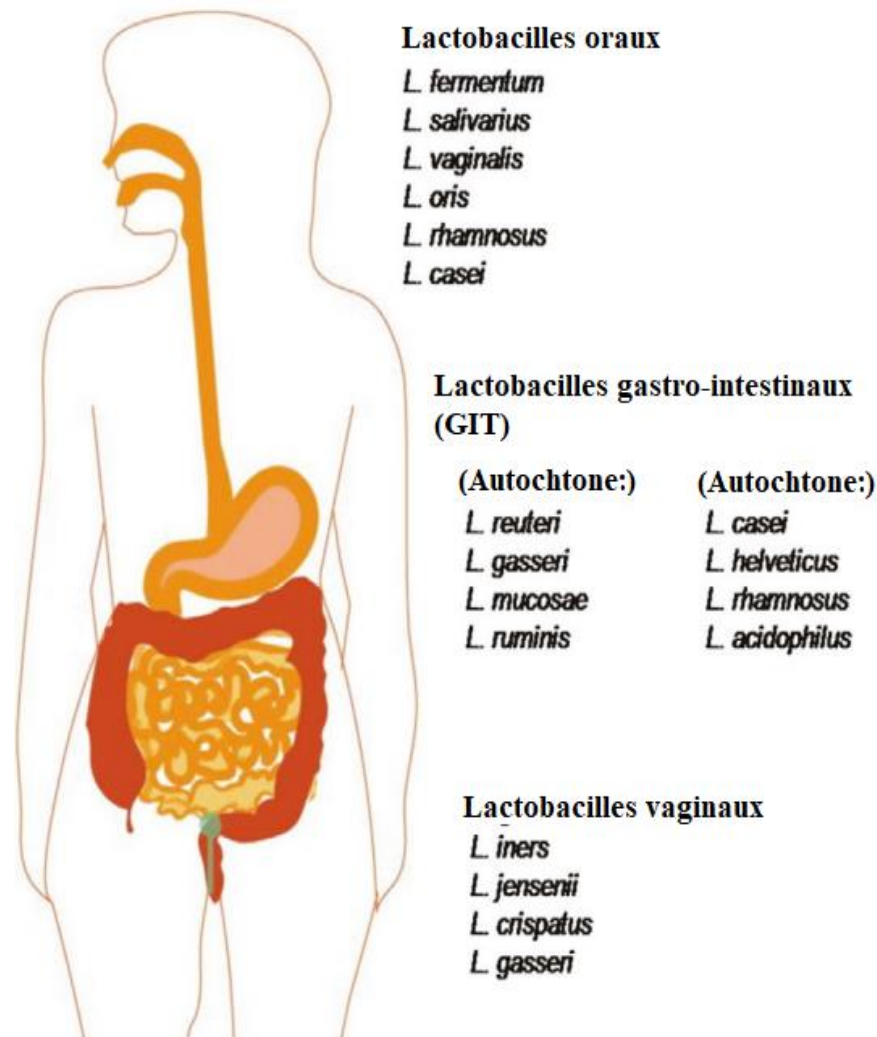


Figure I.17. Emplacements des espèces de *Lactobacillus* dans divers niches du corps humain (Ruzal, 2019).

1.3.3.3. Lactobacillus et les caries dentaires

La cavité buccale fait partie du tube digestif dans un sens plus large, et la bouche représente le point d'entrée des aliments vers les parties inférieures du tractus digestif, de nombreuses espèces bactériennes, y compris les lactobacilles, colonisent les dents, les gencives, la salive et la langue (Douillard & De Vos, 2014).

Les espèces généralement associées aux lésions de caries appartiennent à *Lactobacillus vaginalis*, *L. rhamnosus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. oris*, *L. salivarius* et *L. casei* (Caufield *et al.*, 2015).

Les relations phylogénétiques entre ces espèces montrent que les lactobacilles associés aux caries dentaires appartiennent à différents groupes phylogénétiques, et l'adaptation à l'environnement carieux semble être indépendante dans différentes lignées (Caufield *et al.*, 2015).

Les caries dentaires sont causées par des bactéries acidogènes qui produisent de l'acide lactique à la suite de la fermentation anaérobie des glucides, cependant, les lactobacilles ne sont généralement pas détectés comme une cause majeure du développement des lésions carieuses initiales, mais plutôt considérés comme des envahisseurs secondaires des lésions déjà formées par *Streptococcus mutans*. La colonisation initiale de la surface des dents par *S. mutans* crée la niche nécessaire capable de retenir mécaniquement à la fois les lactobacilles et la nourriture, une source de glucides. À la lumière du développement des caries, plusieurs caractéristiques permettent la survie et la persistance des lactobacilles buccaux dans les lésions carieuses (Jia *et al.*, 2020).

Outre la tolérance évidente au pH bas, certains isolats liés aux caries dentaires possèdent des protéines de liaison au collagène, ce qui pourrait les aider à survivre dans les lésions carieuses. Une autre caractéristique contribuant à l'adaptation des lactobacilles aux caries est leur tolérance relative aux fluorures, ainsi que leur capacité à métaboliser le xylitol, le mannitol et le sorbitol, souvent utilisés comme édulcorants et agents anticaries, favorisant ainsi effectivement la progression des caries dans les lésions dominées par les lactobacilles (Jia *et al.*, 2020).

I.4. Clou de girofle

I.4.1. Généralités

L'épice connue sous le nom de clou de girofle est le bouton floral aromatique séché du giroflier, *Eugenia caryophyllata* Thunb. (= *Syzygium aromaticum* -L.- Merr. & L.M. Perry - Myrtaceae-. Le clou de girofle, originaire des petites îles de Maluku, dans l'est de l'Indonésie, également connues sous le nom d'"îles aux épices". Le clou de girofle est utilisé en Chine ancienne comme épice et parfum depuis plus de 2 000 ans. Sur le plan médical, le remède traditionnel bien connu consistant à appliquer de l'huile de clou de girofle pour traiter les maux de dents a été documenté pour la première fois en 1640 dans la "Pratique de la médecine" en France. L'Indonésie, l'Inde, la Malaisie et le Sri Lanka sont les principaux producteurs asiatiques de clous de girofle, mais de plus grandes quantités sont produites dans les Antilles, à Madagascar et en Tanzanie, en particulier à Zanzibar -Fig.I.18-. Le nom du principal composant de l'huile de girofle, l'eugénol, est dérivé du nom de l'espèce *Eugenia caryophyllata*, qui contient un taux élevé d'eugénol -45-90%- (Barceloux, 2012).

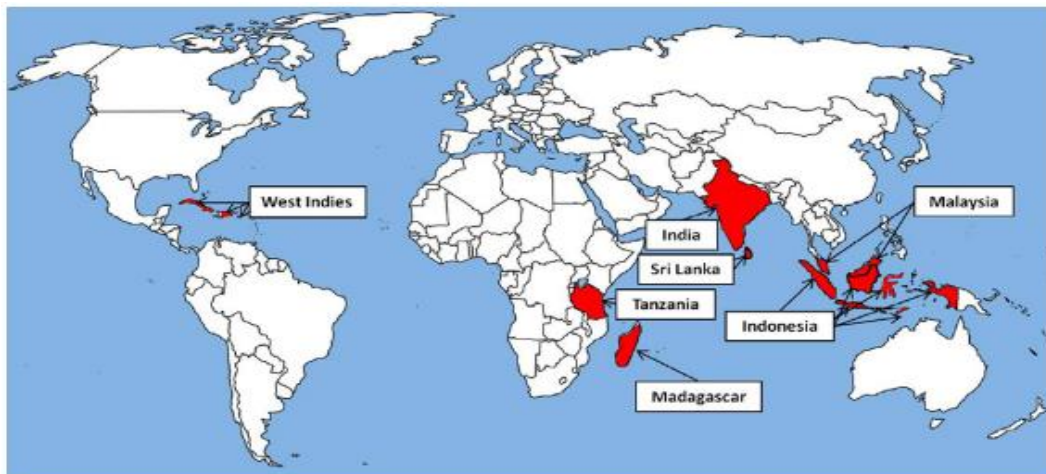


Figure I.18. Les principaux producteurs mondiaux de clous de girofle sont les Antilles, Madagascar, la Tanzanie, l'Inde, le Sri Lanka, l'Indonésie et la Malaisie (Kamatou *et al.*, 2012).

I.4.2. Classification

Syzygium aromaticum L. appartient à la famille des Myrtaceae, qui compte plus de 3 000 espèces et 130 à 150 genres et 130-150 genres, comme les familles du myrte, de l'eucalyptus, du clou de girofle et de la goyave (Haro-Gonzalez *et al.*, 2021).

Tableau I.7. Classification scientifique de *S. aromaticum* -clou de girofle- (Saeed *et al.*, 2021).

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i> -L.- Merr. and L. M. Perry

I.4.3. Caractéristiques morphologiques

Syzygium aromaticum est un petit arbre à feuilles persistantes de 6 m de haut, à couronne conique, à feuilles 7-12 × 3-5 cm, elliptiques ou oblancéolées, à base atténuée ou cunéiforme, à sommet acuminé, à marge entière, glabre, coriace, ponctuée en dessous ; à nerfs latéraux nombreux, parallèles, obscurs, à nerf intramarginal ; à pétiole 10-20 mm de long, élancé, glabre. Les fleurs sont blanc rosé, parfumées, en cymes de 4 cm de long ; calice 1,5 × 6 mm, tubulaire, verruqueux avec quatre segments ascendants involutifs en forme de crochet ; pétales jusqu'à 10 × 5 mm, elliptiques, calyptrés ; étamines nombreuses, infléchies dans le bourgeon ; ovaire infère. Baies globuleuses ou ellipsoïdes, pourpre foncé avec un anneau de calice persistant au sommet. Les boutons floraux ont une valeur commerciale en tant qu'épice (Sujanapal & Kunhikannan, 2017).

Syzygium aromaticum est un arbre à feuilles persistantes qui atteint environ 10 à 20 m. Son écorce est grise et lisse. Les feuilles sont grandes et opposées. Le limbe est coriace, ovale-long elliptique, entier et densément couvert de glandes à huile. Le pétiole est bien visible. Les bourgeons des feuilles sont terminaux, en cymes ou en panicules. Les fleurs sont rouges ou roses, et 3 fleurs sont réunies en un seul groupe. Les fleurs contiennent 4 pétales. Les bourgeons sont blancs au début et deviennent verts puis rouges lorsque les bourgeons mesurent 1,5 à 2 cm de long (Alfikri *et al.*, 2020). Le calice est cylindrique, le réceptacle long et quadrilobé à l'extrémité. Les lobes sont triangulaires, rouge vif, avec de nombreuses étamines et un ovaire inférieur. Les baies sont oblongues, rouges ou pourpres foncées, et contiennent une graine ovale. Le fruit est appelé femelle

ou *S. aromaticum* femelle. La période de fructification s'étend de juin à juillet et la période de floraison de janvier à février. Les bourgeons sont appelés *S. aromaticum* mâle, et sont séchés en retirant le pédicelle des bourgeons rouge vif (Wei *et al.*, 2016).



Figure I.19. *Syzygium aromaticum*.



Figure I.20. Différentes parties de *S. aromaticum*. -A- Plante entière ; -B- boutons floraux séchés ; -C- fruit ; -D- feuille (Xue *et al.*, 2022).

I.4.4. Nomenclature

Anglais : Clove

Bulgare : Karamfil

Chinois: Ding Heung -cantonais-, Ding Xiang, Gong Ding Xiang -mandarin-

Français : Clous de girofle

Espagnol : Clavos de olor

Gallois : Clawlys et Clof

Le nom clou de girofle vient du moyen anglais et de l'ancien français "clou" qui veut dire l'angle, "de girofle" giroflée -gillyflower était le nom original de l'épice- (Opara & Chohan, 2021).

I.4.5. Propriétés biochimiques

Le *Syzygium aromaticum* est connu pour son utilisation comme épice dans la préparation des aliments. Outre ses propriétés aromatiques, il peut être utilisé comme remède traditionnel pour de nombreuses maladies telles que l'asthme, les troubles digestifs, dentaires et respiratoires, les maux de gorge et les maux de tête. Le clou de girofle est également appliqué en médecine traditionnelle. Le girofle est largement utilisé pour traiter la dyspepsie, la gastrite et la diarrhée (Singh *et al.*, 2012).

Tableau I.8. Composition et propriétés de l'huile essentielle de girofle (V. K. Pandey *et al.*, 2024).

Composé	Montant -%-	Propriété	Utilisation et application
Eugenol	74,28	Composé phénylpropanoïde volatil dans la nature faible solubilité dans l'eau	Antimicrobien Insecticide Anti-inflammatoire Cicatrisation des plaies Antioxydant Anticancereux pour le sein, la prostate, le colon, l'estomac et la peau
β caryophyllène	24,8	Sesquiterpène Présent dans le clou de girofle, le chanvre, le poivre noir, les feuilles de goyave Ne se dissout pas dans l'eau, mais se dissout dans l'éthanol	Anti-cancérigène Anti-inflammatoire Anxiolytique Antioxydant Effets anesthésiques Agit comme un chimiosensibilisateur
α humelene	3,1	Trouvé dans <i>Senecio brasiliensis</i> S. <i>aromaticum</i> L., <i>Humulus lupulus</i> L Sesquiterpène	Influence sur le cancer du côlon, de la prostate, du poumon et du sein Activité antiproliférative Bioactivité anticancéreuse
Acétate d'eugénol	2,7	Phénylpropanoïde	Antimicrobien Anti-bactérien

		Deuxième substance en abondance dans le clou de girofle après l'eugénol	Utilisation dans les parfums en raison de sa nature volatile
		Solide cristallin Fluide jaunâtre avec une teinte fruitée	Anti-inflammatoire
α Copaene	0,17	Hydrocarbure sesquiterpénique De nature incolore, claire et visqueuse	Antimicrobien Antiprolifératif Anti-génotoxique Anti-oxydant Activité cytotoxique
Chavicol	0,08	Phénylpropène naturel Composé organique Liquide incolore Associé aux terpènes	Utilisation dans les parfums Analgésique Anti-inflammatoire Anti-toxique
Salicylate de méthyle	0,20	Ester organique Liquide incolore et visqueux de couleur fruitée	Agent aromatique Métabolite Antibactérien et irritant Antiprolifératif
4-Allylanisole	0,13	Phénylpropène Composé organique naturel Liquide incolore	Utilisation dans les huiles essentielles Fabrication de parfums Avantages médicaux Anticancérigène Antigénotoxique
Acétate de benzyle	0,07	Ester organique Arôme doux et agréable	Application dans les produits d'hygiène personnelle et de soins de santé Utilisation industrielle dans l'extraction Anti-irritant Antimicrobien

I.4.6. Les activités biologiques de l'huile essentielle de clou de girofle

I.4.6.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle du fruit a été démontrée contre *Staphylococcus aureus*, tandis que l'huile de feuille a été efficace pour inhiber la croissance de *Bacillus cereus*. 32 souches de *Staphylococcus epidermidis* multirésistantes isolées de biomatériaux de dialyse ont été testées avec l'huile de clou de girofle. La sensibilité à l'huile essentielle de clou de girofle a été significative pour chaque souche bactérienne, avec une activité étendue contre les bactéries Gram-positives. Cinq souches de *S. epidermidis* ont montré l'activité la plus élevée, avec une zone d'inhibition de plus de 16 mm (Mytle *et al.*, 2006).

I.4.6.2. Activité fongicide

L'activité antifongique de l'eugénol a été démontrée contre *Candida albicans* et *Trichophyton mentagrophytes*. On a montré qu'une solution de sucre concentrée avec de l'oléorésine de clou de girofle avait un effet fongicide puissant en diminuant la taille de l'inoculum des champignons. Selon un récent rapport, des micrographies MEB (microscopie électronique à balayage) ont révélé des dommages morphologiques importants avec des déformations cellulaires sur des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* causés par l'utilisation de l'huile de clou de girofle. Plusieurs espèces de champignons d'origine alimentaire ont également été signalées avoir une activité fongicide de l'huile essentielle d'*E. caryophyllata*, et une étude récente a démontré que l'huile essentielle de clou de girofle a même inhibé la croissance d'*Aspergillus niger* (Pawar & Thaker, 2006).

I.4.6.3. Activité antivirale

En général, les virus sont extrêmement sensibles aux éléments présents dans les huiles essentielles. L'activité antivirale *in vitro* des phénylpropanoïdes, des monoterpénols et des monoterpénals a été démontrée (Hussein *et al.*, 2000) Il a été observé que l'extrait de *Syzygium aromaticum* était extrêmement efficace pour arrêter la réplication du virus de l'hépatite C - avec une inhibition de $\geq 90\%$ à 100 $\mu\text{g/mL}$ - (Kurokawa *et al.*, 1998) Un composé anti-VHS, l'eugéniine, a été isolé et identifié à partir d'extraits de *Syzygium aromaticum*, et a démontré une capacité à inhiber l'activité de l'ADN polymérase du HSV-1 (Chen *et al.*, 2023).

I.4.6.4. Capacité antioxydante

L'huile de girofle est principalement constituée d'eugénol, qui possède de nombreuses propriétés antioxydantes. Divers mécanismes peuvent entraîner l'activité antioxydante, comme le piégeage des radicaux et la chélation des ions métalliques. L'eugénol faisait partie des réactions photochimiques et posséderait une activité antioxydante puissante et une toxicité pour les cellules

photochimiques. Ainsi, l'huile de clou de girofle possède une activité antioxydante puissante ; de plus, elle peut être employée comme une source accessible d'antioxydants naturels et dans des applications pharmaceutiques (Jirovetz *et al.*, 2006).

1.4.6.5. Activité antitumorale

La présence de l'huile essentielle de clou de girofle a un potentiel anti-cancer et antimutagène. L'action cytotoxique des huiles volatiles est observée sur les lignées cellulaires tumorales humaines PC-3 et Hep G2 et, dans une étude récente, l'eugénol a été montré responsable de l'apoptose des cellules cancéreuses humaines, le principal composé antimutagène étant le déhydrodieugénol. Dernièrement, on a signalé l'activité antimutagène du cinnamaldéhyde sur des cellules d'hépatome humain, où il a diminué la fréquence des micronoyaux induits par différentes amines hétérocycliques (Yoo *et al.*, 2005).

1.4.6.6. Activité anesthésique

L'eugénol est utilisé dans un large éventail d'applications, notamment comme anesthésique local en dentisterie et comme ingrédient du ciment dentaire pour les obturations temporaires. Il est relativement facile à utiliser et peut être employé à des concentrations plus faibles que d'autres anesthésiques locaux. Il est rapidement métabolisé et excrété, et ne nécessite donc pas de période de sevrage (Wagner *et al.*, 2002).

1.4.6.7. Activité insecticide

La lutte contre les arthropodes parasites avec des médicaments pose plusieurs problèmes, tels que la résistance aux médicaments et les conséquences sur l'environnement. Plusieurs études ont été menées sur l'activité biologique de l'huile d'*Eugenia caryophyllata* contre divers parasites. On a prouvé qu'elle entravait l'apparition des larves de *Culex pipiens* et qu'elle avait une activité insecticide contre Pou de tête (*Pediculus capitis*), les moustiques *Anopheles dirus* et certains insectes des produits conservés, et qu'elle entravait le développement de la progéniture de *Tribolium* rouge de la farine (*Tribolium castaneum*) et *Sitophilus zeamais*, l'isoeugénol étant particulièrement actif. On a également observé une activité acaricide de l'huile essentielle de clou de girofle sur *Dermatophagoides farinae* et *D. pteronyssinus*, avec l'eugénol comme composant acaricide de l'huile. Une récente étude a démontré que l'huile de clou de girofle peut contenir des propriétés bénéfiques (Park & Shin, 2005).

Partie pratique

Chapitre II : Matériels et méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel végétal

Les bourgeons de clou de girofle ont été achetés dans un magasin local à M sila en février 2024.



Figure II.1. Clou de girofle

II.1.2. Matériel et produits

Matériel

- Ecouillons stériles, micropipette et anse de platine.
- Boîtes Pétri, pipettes Pasteur.
- Réfrigérateur, vortex et autoclave
- Balance de précision.
- Appareil Clevenger.
- Spectrophotomètre, incubateur, microscope.
- Bec Bunsen.

Produits

- Violet de Gentiane, lugol, alcool, fuschine et huile à émersion.
- Eau distillé, eau physiologie stérile.
- DMSO -Dimethyl Sulfoxide.
- Papier wattman.
- Gélose au sang.

II.1.3. La souche bactérienne utilisée

II.1.3.1. Streptococcus mutans

Une carie dentaire a été prélevée par le dentiste Dr. FAKANI Bachir à Bou-saada.

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction d'huile

L'hydrodistillation est l'une des méthodes les plus pratiques pour obtenir des huiles essentielles. Lors de la procédure d'hydrodistillation, un échantillon de clous de girofle [100 g de clous de girofle séchés] est placé dans un ballon à distillation et rempli avec une quantité d'eau distillée (1litre) pour immerger la matière végétale, ensuite allumer le chauffe-ballon à 60°C pendant trois à six heures pour effectuer la distillation.

Après, à l'aide d'une seringue propre, récupérer l'huile essentielle et la stocker au réfrigérateur dans un flacon ambré pour éviter la dégradation par la lumière (le froid aide à ralentir les réactions chimiques et à éviter la détérioration prématurée).

La présentation picturale du processus d'extraction par hydrodistillation est montrée dans la Fig II.3.

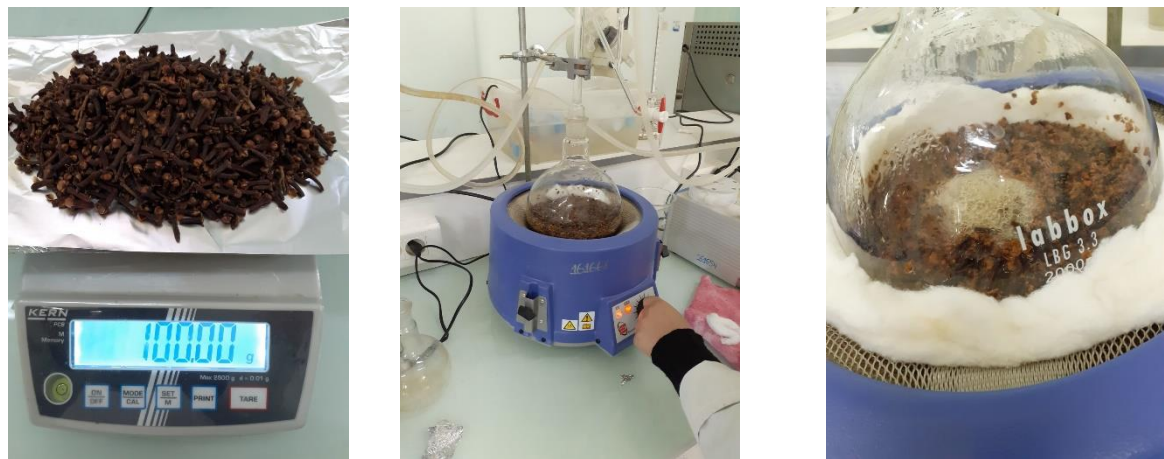
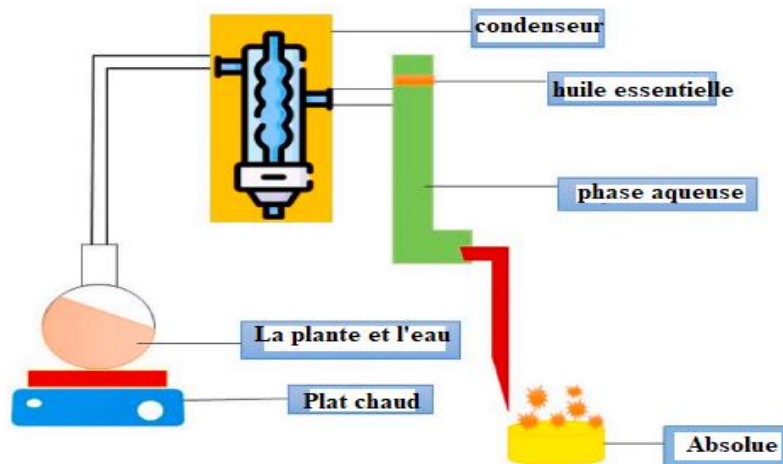


Figure II.2. Extraction d'huile

Figure II.3. Méthode d'extraction par hydrodistillation (Vinay Kumar Pandey *et al.*, 2024)

II.2.2. Activité antibactérienne

La méthode de diffusion de disque a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne, où les disques sont imbibés de 10 μ l d'huile (Sokmen *et al.*, 2004).

II.2.2.1. Préparation du milieu gélose au sang

Le milieu de culture utilisé dans notre étude est de la gélose au sang, dont la préparation est la suivante :

Mélanger 38,0 grammes poudre de Muller-Hinton dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer jusqu'à ébullition pour dissoudre entièrement le milieu. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 2h. Après la stérilisation, laisser refroidir à une température comprise entre 45 et 50 °C, l'ajout de 8-10 ml de sang stérilisé par filtration dans un flacon 180 ml de Muller-Hinton.

II.2.2.2. Stérilisation du matériel de travail

Le milieu de culture, les tubes à essai, l'eau distillée, les embouts de micropipette utilisés dans la préparation des solutions bactériennes, ainsi que les disques en papier Wattman [de 4 mm de diamètre] recouvert dans du papier aluminium, ont été soumis à une stérilisation à l'autoclave à une température de 121°C pendant 2 heures.

II.2.2.3. Prélèvement et isolement de la bactérie

La carie dentaire prélevée chez un dentiste a Bou Saada, a étéensemencée dans une boîte contenant de la gélose au sang avec un coton tige stérile. Ensuite la boîte a été transmise au laboratoire et mise à l'incubateur à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Après l'incubation, des écouvillons stériles ont été utilisés pour prélever de la boîte de Petri contenant la carie dentaire. Ensuite, ils ont été dilués avec de l'eau physiologique pour réaliser l'ensemencement en utilisant la technique des stries, afin d'obtenir des colonies séparées. Enfin, la boîte a été incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures.

II.2.2.4. Identification macroscopique, microscopique et biochimique

Après l'incubation, une observation et une réalisation des tests doit être faite pour bien identifier la souche.

- La morphologie, la dimension, la couleur des colonies et le type de l'hémolyse obtenu.
- Un test de catalase est fait.
- Un frottis est préparé pour la coloration de Gram :
 - ✓ Recouvrir le frottis séché à l'air et fixé à la chaleur avec du violet de gentiane pendant 1 minute.
 - ✓ Rincer doucement à l'eau distillée pour enlever l'excédent de colorant.
 - ✓ Recouvrir la préparation avec du Lugol et laisser agir pendant 1 minute. Le Lugol sert de mordant pour fixer la coloration.
 - ✓ Rincer doucement à l'eau distillée.
 - ✓ Appliquer une solution de décolorant (alcool éthylique) pendant 10-20 secondes.
 - ✓ Rincer immédiatement à l'eau distillée pour stopper la décoloration.
 - ✓ Recouvrir la préparation avec Fushine et laisser agir pendant 1 minute.
 - ✓ Rincer à l'eau distillée et sécher la lame.

II.2.2.5. Préparation de l'inoculum

Quelques colonies bien isolées et identiques ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine. Ces colonies sont transférées dans 10 ml d'eau distillée stérile en veillant à homogénéiser la

suspension bactérienne. La densité optique de cette suspension doit être équivalente à 0,5 sur l'échelle de McFarland ou à une absorbance optique de 0,08 à 0,10 à une longueur d'onde de 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture si la densité est trop faible, ou de l'eau physiologique stérile si elle est trop élevée.

II.2.2.6. Préparation des dilutions de l'huile essentielle de clou de girofle

L'huile de clou de girofle a été mélangée avec du diméthyl-sulfoxyde [DMSO] afin de produire différentes concentrations en effectuant des dilutions successives à moitié, en tenant compte du fait que la concentration de la solution mère d'huile est de ½ (50%).

Après l'extraction de l'huile essentielle de clou de girofle, on pèse la quantité obtenue par la balance précise de laboratoire et on mesure en parallèle le volume.

On calcule la masse volumique de l'huile obtenue m/v qui présente en même temps la concentration massique de l'huile essentielle.

Après la détermination de la concentration massique, on peut préparer la solution mère initiale pour préparer l'étalonnage pour faire les dilutions successives en demi.

Chaque dilution présente un pourcentage en moitié de la dilution précédente.

$$[C]_i = 100\% = m/v \text{ (prélevé)} + v \text{ de DMSO}$$

On prépare les dilutions

$$[C]_1 = 1/2 [C]_I + 1/2 \text{ DMSO}$$

$$[C]_2 = 1/2 [C]_1 + 1/2 \text{ DMSO}$$

et ainsi de suite.

II.2.2.7. Ensemencement

L'ensemencement est effectué en utilisant des écouvillons sur des boîtes de Petri. Un écouvillon est imprégné de la suspension bactérienne, puis essoré en pressant fermement contre la paroi interne du tube. L'écouvillon est ensuite frotté sur toute la surface du milieu gélosé, de haut en bas, en réalisant des stries serrées.

II.2.2.8. Disposition des disques et placer l'huile

Les disques sont placés avec précaution sur la surface de la gélose inoculée en utilisant une pince stérile, puis 10µl d'huile diluée sont ajoutés sur les disques.

De plus, un test d'antibiogramme a été effectué en utilisant un disque pré-imprégné avec un antibiotique [témoin positif] appropriés, prêts à l'emploi, afin de comparer les résultats des tests d'huile, ainsi qu'un disque Wattman imbibés de DMSO [témoin négatif].

II.2.2.9. Méthode de détermination (CMI) sur milieu liquid

La CMI a été déterminée comme précédemment décrite par (Boniface et al., 2010). Brièvement, 100 µl de bouillon Mueller Hinton a été distribué dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits. 100 microlitres de la solution mère de l'huile essentielle ont ensuite été ajoutés à chacun des puits de la première rangée de la microplaque, sauf le dernier puits. Dans chaque rangée, des dilutions successives de 2 puits par puits ont été effectuées jusqu'au 12e puits, et les 100 µl du dernier puits ont été évacués pour continuer la deuxième rangée. Par la suite, on a ajouté 100 µl de bouillon Mueller Hinton dans le dernier puits ; puis on a procédé à des dilutions successives, toujours de raison 2. Tous les puits ont étéensemencés, sauf ceux de la pré-dernière puits, en y introduisant 100 µl de suspension bactérienne à 10^6 (UFC/ml), densité égale à l'échelle 2 de Mc Ferland. On a utilisé du bouillon Muller Hinton au lieu de la suspension bactérienne. La microplaque a enfin été recouverte avec le couvercle puis incubée à 37 °C pendant 18 à 24 heures. La dernière colonne représente le témoin négatif, tandis que la pré-dernière, le témoin positif. Lors de la lecture, l'apparition d'un trouble témoigne de la prolifération bactérienne. La couleur initiale persistante indique l'absence de développement des germes.

Chapitre III : Résultats et discussion

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Le rendement de l'extraction -RHE-

Le rendement, exprimé en pourcentage, se calcule à l'aide de la formule suivante :

$$R (\%) = Me/Mc \times 100$$

Mc : Masse de clous de girofle en gramme.

Me : Masse de l'huile essentielle extraite en gramme.

Notre rendement en huile essentielle de clou de girofle obtenue par hydrodistillation a été estimé à 6,08 %.

Tableau III.1. Résultat du rendement d'HE de Clou de girofle

	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		Minimum	Maximum
Rendement (%)	6.08%	5	8

Le rendement d'huile de clou de girofle d'environ 6,08 %, et ce résultat est conforme dans les normes de l'AFNOR (L'Association française de normalisation).

En ce qui concerne les valeurs, le rendement en huile essentielle de clous de girofle est supérieur à celui obtenu en huile essentielle par ADLI (2015), qui a atteint un rendement de 0,84 %.

III.2. Analyses physico-chimiques

III.2.1. Etude des propriétés organoleptiques

Les résultats présentés dans le -Tab III.2- comparent les caractéristiques de notre huile essentielle extraite des boutons de clous de girofle aux normes définies par l'AFNOR.

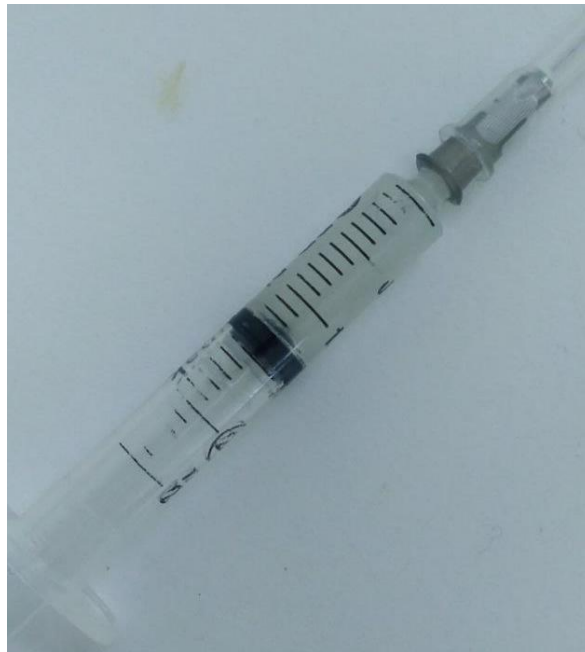


Figure III.1. HE de Clou de girofle

Tableau III.2. Caractéristiques organoleptiques de l'HE de Clou de girofle

	Aspect	Couleur	Odeur
Norme AFNOR	Liquide mobile Limpide parfois Légèrement visqueux	Jaune très claire	Epicée (caractéristique de l'eugénol)
HE étudié	Liquide mobile limpide	Jaune très claire	Epicée (caractéristique de l'eugénol)

III.2.2. Le pH


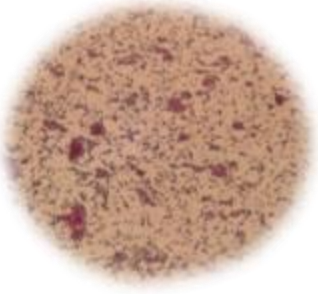
Les résultats consignés dans le -Tab III.3- montrent que notre pH est de 6,82. Ce pH est légèrement acide, ce qui s'explique par la composition chimique des huiles essentielles de clou de girofle, qui ont tendance à libérer des ions H⁺.

Tableau III.3. Résultat du pH d'HE de Clou de girofle

	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		Minimum	Maximum
pH	06.82	5.5	7

III.3. Identification de la souche

Tableau III.4. Observation macroscopique et microscopique

Observation	Interprétation
	<p>Des colonies blanches circulaires et qui mesurent environ 0,5 mm de diamètre avec un halo verdâtre autour des colonies.</p> <p>Un halo verdâtre signifie qu'il y a une hémolyse partielle avec une dégradation incomplète de l'hémoglobine, c'est-à-dire une hémolyse α.</p>
	<p>Bactérie streptocoque Gram positif, cocci arrondies, en paires et en chaînette.</p>

III.4. Résultat de test de catalase

Après l'ajout des colonies prélevé de la boîte sur l'eau oxygénée, une absence de formation de bulles d'air.

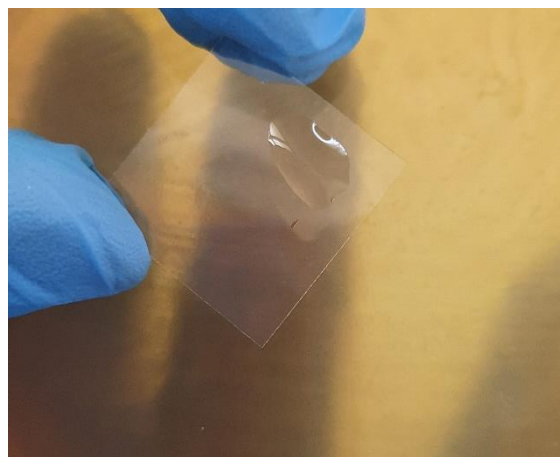


Figure III.2. Test de catalase sur lame

III.5. Résultat de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de clou de girofle sur la bactérie *Streptococcus mutans* en utilisant la méthode de diffusion de disques sur un milieu solide (gélose au sang) révèlent.

Tableau III.5. Les résultats de la première boîte qui contient les témoins, l'antibiotique et HE pure

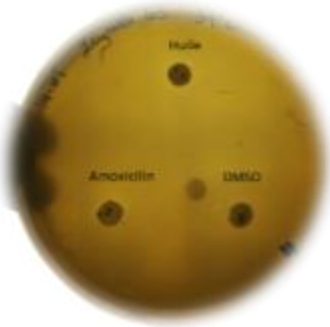
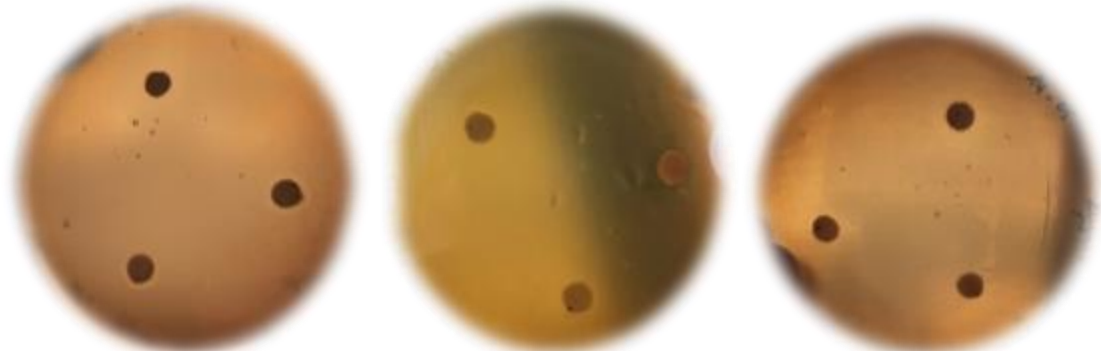
Observation	Interprétation
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Le DMSO ne présente aucun effet sur la croissance normale de la souche bactérienne. ✓ L'huile pure a une large zone d'inhibition 15 mm de diamètre. ✓ Le diamètre d'inhibition de l'antibiotique utilisé était 14,5 mm.
	

Figure III.3. Les zones d'inhibitions sur GS

Tableau III.6. Les résultats des différentes dilutions de l'huile (zone d'inhibition)

Huile essentiel	Concentration en (%)	Diamètre d'inhibition (mm)
Clou de girofle	100	15
	50	14
	25	13.5
	12.5	12
	6.25	11.5
	3.125	11
	1.5625	10.5
	0.7	10
	0.3	9
	0.19	8
	0.04	6

- $D < 8\text{mm}$: Souches résistante (-).
- $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$: Souches sensible (+).
- $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$: Souches très sensible (++)

Le streptocoque s'est révélé particulièrement très sensible à l'huile essentielle de clou de girofle, sensible à partir de la concentration (14%) jusqu'à (0,3%), et intermédiaire à (0,19%), par contre résistante à (0,04%).

Nous avons observé que les zones d'inhibition Diminuait en fonction des différentes concentrations d'HE.

La concentration de l'huile essentielle est liée aux zones d'inhibition. Ainsi, plus la concentration est élevée, plus la zone d'inhibition est large.

Après des recherches approfondies dans des articles, des livres et des études universitaires précédentes, nous n'avons trouvé aucune mention de l'activité antibactérienne de l'HE de clou de

girofle sur *Streptococcus mutans* (Gram+). Cependant, cette activité a été étudiée sur d'autres souches bactériennes, telles que *E. coli* (Gram-).

Selon Banouh (2019) L'huile essentielle de clou de girofle à concentration graduée présente un effet positif, sur *E. coli* avec une zone d'inhibition de 12 mm. Contrairement à *E. coli*, aucune inhibition n'a été observée avec *Pseudomonas*, indiquant ainsi une forte résistance de cette souche à notre HE. D'après Guinoiseau (2010), Les huiles essentielles sont actives aussi bien contre les bactéries Gram positives que les Gram négatives. Cependant, les bactéries Gram négatives montrent une moindre sensibilité à leur effet, ce qui est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire.

III.6. La concentration minimale inhibitrice



Figure III.4. Microplaque

Tableau III.7. Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de clou de girofle sur *S. mutans* réalisé par la méthode de CMI

Les concentrations (%)												
La souche	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.3	0.19	0.04	C+	C-
<i>S.mutans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
C : contrôle N : négative P : positive								- : inhibition + : croissance				

Tableau III.8. Les résultats de CMI et CMB

HE	La souche	<i>Streptococcus mutans</i>	
	Clou de girofle	CMI	CMB
		0.19	0.3

Les résultats indiquent clairement que l'HE de clou de girofle présente une forte activité inhibitrice sur la croissance des streptocoques. De plus, cette activité augmente proportionnellement à la concentration croissante de l'huile essentielle.

En revanche, dans l'étude de Banouh (2019), le résultat de la CMI pour *E.coli* est le suivant, tel que présenté dans le -Tab III.9-.

Tableau III.9. Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de clou de girofle sur *E.coli* réalisé par la méthode de CMI

Les concentrations (%)												
La souche	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.3	0.1	0.0	C+	C-
<i>E.coli</i>	-	-	- CMI	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C : contrôle						- : inhibition						
N : négative						+ : croissance						
P : positive												

De nombreuses recherches ont confirmé que HE de clou de girofle sont fortement antibactériennes, ce qui pourrait être attribué à leur principal composé, l'eugénol. Les recherches fait par Valero et Giner (2006) ont démontré que l'eugénol, parmi d'autres composés, a induit l'inhibition de la croissance des bactéries.

De plus, l'étude menée par Rhayour (2016) a révélé que l'HE de clou de girofle exerce principalement son activité bactéricide grâce à son composé majoritaire, l'eugénol, appartenant à la famille des phénols. Ainsi, il semble que l'activité bactéricide des huiles essentielles commence par l'attachement de ces molécules aux membranes bactériennes, ce qui engendre des modifications de leur structure et de leur perméabilité. Ceci entraîne la perte de constituants cellulaires, provoquant ainsi une lyse significative des cellules bactériennes.

Conclusion

Conclusion

Le clou de girofle, également connu sous le nom de *Syzygium aromaticum*, est une épice courante qui provient du bourgeon floral d'un arbre appartenant à la famille des Myrtacées et est originaire d'Indonésie. Le clou de girofle a trouvé des applications médicales dans les pays asiatiques et occidentaux. Il est largement utilisé dans les médecines alternatives et comme agent aromatisant dans l'alimentation. Les bourgeons de clou de girofle contiennent plusieurs composés intéressants, notamment l'eugénol, l'acétate d'eugényle, le trans-caryophyllène, le β -caryophyllène, les polyphénols, les tanins et les triterpénoïdes. Ces composés bioactifs en font un remède maison recherché pour traiter diverses affections, allant des problèmes dentaires aux inflammations. Ils peuvent être extraits efficacement par plusieurs méthodes.

Par conséquent, en se basant sur cette étude on peut conclure que le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de clou de girofle avec sa principale composition volatile et efficace, l'eugénol, est le constituant responsable des puissantes propriétés antimicrobiennes. Il est possible qu'elle ait une meilleure action *in vivo* sur l'incidence de la diminution de la formation de biofilm des caries dentaires.

Voici quelques perspectives que nous pourrions inclure:

- Comparer l'efficacité antibactérienne de l'huile essentielle de clou de girofle avec d'autres huiles essentielles et traitements conventionnels contre *Streptococcus mutans*.
- Développer des formulations dentaires intégrant l'huile essentielle de clou de girofle, telles que des dentifrices, des bains de bouche, ou des gels.
- Étudier les effets à long terme de l'utilisation de ces produits sur la santé bucco-dentaire.
- Investiguer la production durable et écologique de l'huile essentielle de clou de girofle.
- Étudier l'impact environnemental de l'utilisation généralisée de l'huile de clou de girofle dans les produits dentaires.

Ces perspectives enrichiront notre mémoire et proposeront des axes de recherche futurs pouvant contribuer à l'avancement des connaissances dans ce domaine

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbe-Denizot, A. (2023). État bucco-dentaire des femmes enceintes et conséquences sur la grossesse. *Sages-Femmes*.
- ADLI, D. E. H. (2015). *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* Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella].
- Albrecht, T., Fons, M., Boldogh, I., & Rabson, A. S. (1996). Effects on cells. *Medical Microbiology*. 4th edition.
- Alfikri, F. N., Pujiarti, R., Wibisono, M. G., & Hardiyanto, E. B. (2020). Yield, quality, and antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.) bud oil at the different phenological stages in young and mature trees. *Scientifica*, 2020.
- Barceloux, D. G. (2012). *Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals*. John Wiley & Sons.
- Baron, S., Fons, M., & Albrecht, T. (1996). Viral pathogenesis. *Medical Microbiology*. 4th edition.
- Bergmeier, L. A. (2018). *Oral mucosa in health and disease: a concise handbook*. Springer.
- Caufield, P., Schön, C., Saraithong, P., Li, Y., & Argimón, S. (2015). Oral lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans. *Journal of dental research*, 94(9_suppl), 110S-118S.
- Chen, X., Yang, H., Li, C., Hu, W., Cui, H., & Lin, L. (2023). Enhancing the targeting performance and prolonging the antibacterial effects of clove essential oil liposomes to *Campylobacter jejuni* by antibody modification. *Food Res Int*, 167, 112736. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112736>
- Clarke, J. K. (1924). On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British journal of experimental pathology*, 5(3), 141.
- da Silva, J. A. T. (2004). Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of biotechnology*, 3(12), 706-720.
- Dorri, M., Martinez-Zapata, M. J., Walsh, T., Marinho, V. C., & Zaror, C. (2017). Atraumatic restorative treatment versus conventional restorative treatment for managing dental caries. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(12).
- Douillard, F. P., & De Vos, W. M. (2014). Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-21.
- Gibbons, R., & Kapsimalis, B. (1963). Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by *Streptococcus mitis*. *Archives of Oral Biology*, 8(3), 319-329.
- Gregorczyk-Maga, I., Fiema, M., Kania, M., Jachowicz-Matczak, E., Romaniszyn, D., Gerreth, K., Klupa, T., & Wójkowska-Mach, J. (2023). Oral Microbiota—One Habitat or Diverse Niches? A Pilot Study of Sampling and Identification of Oral Bacterial and Fungal Biota in Patients with Type I Diabetes Mellitus Treated with Insulin Pump. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3), 2252.
- Guinoiseau, E. (2010). *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action* Université de Corse].

- Haro-Gonzalez, J. N., Castillo-Herrera, G. A., Martinez-Velazquez, M., & Espinosa-Andrews, H. (2021). Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. *Molecules*, 26(21). <https://doi.org/10.3390/molecules26216387>
- Houle, M., & Grenier, D. (2003). Maladies parodontales: connaissances actuelles. *Médecine et maladies infectieuses*, 33(7), 331-340.
- Hussein, G., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kakiuchi, N., & Shimotohno, K. (2000). Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(7), 510-516.
- Hypersensitivity, C. (2003). Consensus-based recommendations for the diagnosis and management of dentin hypersensitivity. *Journal (Canadian Dental Association)*, 69(4), 221-226.
- Ibrahim, S. A. (2016). Lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other species.
- Iserin, P. (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales. *Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersley Limited, Londres*, 241.
- Jia, Y., Yang, B., Ross, P., Stanton, C., Zhang, H., Zhao, J., & Chen, W. (2020). Comparative genomics analysis of *Lactobacillus mucosae* from different niches. *Genes*, 11(1), 95.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(17), 6303-6307.
- Ju, J., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2020). A novel method to prolong bread shelf life: Sachets containing essential oils components. *LWT*, 131, 109744.
- Kamatou, G. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol--from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6), 6953-6981. <https://doi.org/10.3390/molecules17066953>
- Kidd, E. A., & Fejerskov, O. (2016). *Essentials of dental caries*. Oxford University Press.
- Kim, Y.-S., Kang, S.-M., Lee, E.-S., Lee, J. H., Kim, B.-R., & Kim, B.-I. (2016). Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation. *Journal of Biomedical Optics*, 21(10), 101409-101409.
- Krowchuk, D. P., & Mancini, A. J. (2019). *Dermatologie de l'enfant: Guide pratique des pathologies et infections cutanées du nourrisson à l'adolescent*. Elsevier Health Sciences.
- Kurokawa, M., Hozumi, T., Basnet, P., Nakano, M., Kadota, S., Namba, T., Kawana, T., & Shiraki, K. (1998). Purification and characterization of eugenin as an anti-herpesvirus compound from *geum japonicum* and *syzygium aromaticum*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(2), 728-735.
- Leach, S. (1970). A review of the biochemistry of dental plaque. *Dental plaque*, 143-156.
- Lemos, J. A., & Burne, R. A. (2008). A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, 154(11), 3247-3255.
- Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological reviews*, 50(4), 353-380.
- Lussi, A., & Hellwig, E. (2006). Performance of a new laser fluorescence device for the detection of occlusal caries in vitro. *Journal of dentistry*, 34(7), 467-471.

- Malbos, D. (2022). Les principales pathologies bucco-dentaires. *Actualités Pharmaceutiques*, 61(614), 17-20.
- Mariette, X. (2004). Traitement actuel de la xérostomie au cours du syndrome de Sjögren. *La Revue de médecine interne*, 25(4), 287-293.
- Maurice, N. (1997). L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. *Ed. Lavoisier, Paris*, 12-14.
- Moxham, B. J., McHanwell, S., & Berkovitz, B. (2018). The development of a core syllabus for the teaching of oral anatomy, histology, and embryology to dental students via an international 'Delphi Panel'. *Clinical Anatomy*, 31(2), 231-249.
- Mytle, N., Anderson, G., Doyle, M., & Smith, M. (2006). Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food control*, 17(2), 102-107.
- Opara, E. I., & Chohan, M. (2021). *Culinary Herbs and Spices: A Global Guide*. Royal Society of Chemistry.
- Pandey, V. K., Srivastava, S., Ashish, Dash, K. K., Singh, R., Dar, A. H., Singh, T., Farooqui, A., Shaikh, A. M., & Kovacs, B. (2024). Bioactive properties of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil nanoemulsion: A comprehensive review. *Heliyon*, 10(1), e22437. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22437>
- Pandey, V. K., Srivastava, S., Dash, K. K., Singh, R., Dar, A. H., Singh, T., Farooqui, A., Shaikh, A. M., & Kovacs, B. (2024). Bioactive properties of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil nanoemulsion: A comprehensive review. *Heliyon*.
- Park, I.-K., & Shin, S.-C. (2005). Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4388-4392.
- Pawar, V., & Thaker, V. (2006). In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 49(4), 316-323.
- Pédiatriques, U. (2018). 47-Gingivo-stomatite herpétique et stomatite. *American Journal of Otolaryngology*, 39(6), 759-763.
- Peres, M. A., Macpherson, L. M., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herreño, C. C., & Kearns, C. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249-260.
- Petersen, P. E., Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S., & Ndiaye, C. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the world health organization*, 83, 661-669.
- Qiu, W., Zhou, Y., Li, Z., Huang, T., Xiao, Y., Cheng, L., Peng, X., Zhang, L., & Ren, B. (2020). Application of antibiotics/antimicrobial agents on dental caries. *BioMed Research International*, 2020.
- Ritz, H. (1967). Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Archives of Oral Biology*, 12(12), 1561-1568.
- RJ, G. (1972). Ecology and cariogenic potential of oral streptococci. *Streptococci and streptococcal diseases*, 371-385.
- Ronald, A. R., & Alfa, M. J. (1996). Microbiology of the genitourinary system. *Medical Microbiology*. 4th edition.

- Ruzal, S. M. (2019). *Lactobacillus genomics and metabolic engineering*. Caister Academic Press Norfolk, United Kingdom.
- Saeed, M., Khan, M. S., Alagawany, M., Farag, M. R., Alqaisi, O., Aqib, A. I., Kumar, M., Siddique, F., & Ramadan, M. F. (2021). Clove (*Syzygium aromaticum*) and its phytochemicals in ruminant feed: an updated review. *Rendiconti lincei. Scienze fisiche e naturali*, 32, 273-285.
- Silverstone, L. M., Johnson, N. W., Hardie, J. M., & Williams, R. A. D. (1981). *Dental Caries : Aetiology, Pathology and Prevention*. In Macmillan Education UK London. <https://doi.org/10.1007/978-1-349-16547-6>
- Singh, J., Baghotia, A., & Goel, S. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (family myrtaceae): a review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(4), 1469-1475.
- Socransky, S., Manganiello, A., Propas, D., Oram, V., & Van Houte, J. (1977). Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. *Journal of periodontal research*, 12(2), 90-106.
- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sokmen, M., & Sahin, F. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control*, 15(8), 627-634.
- Sonis, S. T., & Sonis, S. T. (2012). The elements of examination of the oral cavity. *Oral Mucositis*, 31-37.
- Squier, C., & Brogden, K. (2010). *Human oral mucosa: development, structure and function*. John Wiley & Sons.
- Stolley, J. M., Scott, M. C., Joag, V., Dale, A. J., Johnston, T. S., Saavedra, F., Gavil, N. V., Lotfi-Emran, S., Soerens, A. G., Weyu, E., Pierson, M. J., Herzberg, M. C., Zhang, N., Vezys, V., & Masopust, D. (2023). Depleting CD103+ resident memory T cells in vivo reveals immunostimulatory functions in oral mucosa. *J Exp Med*, 220(7). <https://doi.org/10.1084/jem.20221853>
- Stookey, G. K. (1996). *Early Detection of Dental Caries: Proceedings of the 1st Annual Indiana Conference, Indianapolis, Indiana; [May 15-18, 1996]*. Indiana Univ. School of Dentistry.
- Sujanapal, P., & Kunhikannan, C. (2017). The Genus *Syzygium* in Western Ghats. In *The Genus Syzygium* (pp. 15-56). CRC Press.
- Thakkar, P., Banks, J. M., Rahat, R., Brandini, D. A., & Naqvi, A. R. (2022). Viruses of the oral cavity: prevalence, pathobiology and association with oral diseases. *Reviews in Medical Virology*, 32(4), e2311.
- Wagner, E., Arndt, R., & Hilton, B. (2002). Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, 211(1-4), 353-366.
- Wei, M.-C., Xiao, J., & Yang, Y.-C. (2016). Extraction of α -humulene-enriched oil from clove using ultrasound-assisted supercritical carbon dioxide extraction and studies of its fictitious solubility. *Food chemistry*, 210, 172-181.
- Xue, Q., Xiang, Z., Wang, S., Cong, Z., Gao, P., & Liu, X. (2022). Recent advances in nutritional composition, phytochemistry, bioactive, and potential applications of *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae). *Front Nutr*, 9, 1002147. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1002147>

- Yoo, C.-B., Han, K.-T., Cho, K.-S., Ha, J., Park, H.-J., Nam, J.-H., Kil, U.-H., & Lee, K.-T. (2005). Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer letters*, 225(1), 41-52.
- Zandona, A. F., & Longbottom, C. (2019). Detection and assessment of dental caries. *Cham: Springer Nature Switzerland AG*.