

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : physiologie cellulaire et physiopathologie

Présenté par :

MAHDID OTMANE & HAMICHI DJAMILA

Thème :

*Etude de l'activité antifongique de syzygium
aromaticum.*

Soutenu le : 19 / 09/ 2018

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr. LAKBELE farouk

MAA

Univ. de Bouira

Président

Mr. LEBDIRI farid

MAA

Univ. de Bouira

Promoteur

Mr. LAMIN salime

MCB

Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Au terme de ce projet, nous tenions à remercier sincèrement Dieu, pour sa miséricorde et Pour nous avoir accordée courage pour réaliser ce travail.

Monsieur le Président du jury Mr. LAKBELE farouk et Mr. LAMIN salime ont bien voulu nos honores par leur évaluation de ce modeste travail.

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements pour notre grand et respectueux promoteur Mr. **LEBDIRI farid** d'avoir accepté de nous encadré pour notre projet de fin d'études, ainsi pour son soutien, ses remarques pertinentes et son encouragement.*

Je remercie tous les enseignants et les techniciennes des labos de département "Biologie" de l'université de Bouira.

Nous tenons à exprimer nos profondes reconnaissances et toutes nos pensées de gratitude qui nous a accompagnés de près durant tout ce travail, pour sa disponibilité, Pour la confiance et les conseils précieux tout au long de ce projet au niveau de laboratoire.

A la fin nous tenons à remercier tous nos collègues d'études, particulièrement Notre promotion.

Dédicace

Je remercie tous d'abord Allah de m'avoir donné la santé, le courage, afin de rédiger ce travail.

Au terme de ce modeste travail, je le dédie :

En premier lieu, à mes très chers parents qui m'accompagnent par leurs prière que Dieu me les garde, (Aucune dédicace ne peut exprimer ma profonde reconnaissance et mon grand amour pour eux)

A mes très chers frères : Aissa, Abd El Hakhe, Nour El Dine.

A mes chères sœurs

À toute ma famille surtout mes tantes et mes oncles

A tout mes voisines. Je n'oublie jamais la générosité illimitée de mes amis avec les quelles j'ai partagé les bons et les durs moments :

Mustapha, Rabie, Hamza, Rabahe, Bilal, Kamel, Karim, Mohamed, Ilyasse, Abu Baker, Aissa, Zakaria, Hicheme, Messoude...

A mon binôme.

Et a toutes les personnes que j'aime.

Otmane

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A MES PARENTS

A ma source d'amour, à la lumière de ma vie, à maman.

A papa, j'espère fier de moi

*A mes sœurs Ghania , Akila ,fatiha ,Chahira et mon
petite ange Safia pour leurs encouragements permanents, et
leur soutien moral.*

*A mon cher petit frère Mohamed Pour toute l'ambiance
dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan
chaleureux, je te dédie ce travail.*

A mes très chère amis ; Amel, Yasmin, somia

Amina, Khalissa.

A tous les membres de ma promotion.

*A tous mes enseignants depuis mes premières années
d'études.*

*A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de
citer.*

A mon binôme

Djamila

Résumé :

Notre travail porte sur l'étude et la mise en évidence de l'activité antifongique de l'huile essentielle et d'extrait brut de *Syzygium aromaticum* . Connue sous le nom de giroflier, ainsi l'étude de plusieurs propriétés physico-chimiques de l'extrait de l'huile essentielle et d'extrait y compris une analyse par HPLC.

L'extraction de l'huile essentielle des clous de girofle est réalisée par la méthode d'hydro distillation ainsi l'extrait brut obtenus par macération. Le test de mise en évidence de son pouvoir antifongique est réalisé sur cinq souches fongiques *Aspergillus (parasiticus, flavus, carbonarius, fumigatus) et Penicillium sp.*

Les résultats montrent que l'extrait du clou de girofle possède une forte activité antifongique représentée avec des diamètres d'inhibition variant entre 25 mm et 32 mm pour les souches fongiques et avec un diamètre de 9 mm à 18 mm pour huile essentielle. Le rendement d'huile essentielle et d'extrait obtenu est de 2,8% et 4% successivement, ce pourcentage malgré sa faiblesse reste meilleur que ceux obtenus par d'autres auteurs, et nos résultats des analyses physicochimiques sont conformes aux normes AFNOR.

Mots clés: *Syzygium aromaticum*, huile essentielle, Extrait brut, activité antifongique, inhibition, analyse HPLC.

Abstract:

Our work focuses on the study and demonstration of the antifungal activity of the essential oil and crude extract of *Syzygium aromaticum*. Known as clove, thus the study of several physicochemical properties of the extract of the essential oil and extract including analysis by HPLC.

The extraction of the essential oil from the cloves was carried out by the method of hydro distillation and the crude extract obtained by maceration. The test to demonstrate its antifungal power was carried out on five fungal strains *Aspergillus (parasiticus, flavus, carbonarius, fumigatus) et Penicillium sp.*

The results show that the clove extract has a strong antifungal activity represented with inhibition diameters varying between 25 mm and 32 mm for the fungal strains and with a diameter of 9 mm to 18 mm for essential oil. The yield of essential oil and extract obtained was 2.8% and 4% successively, this percentage despite its weakness remains better than those obtained by other authors, and our physicochemical results were in accordance with AFNOR standards.

Key words: *Syzygium aromaticum*, essential oil, crude extract, antifungal activity, inhibition, HPLC analysis.

ملخص:

يركز عملنا على دراسة وبيان النشاط المضاد للفطريات بواسطة الزيت العطري والمستخلص الخام لعطر أعواد القرنفل ، مع دراسة الخصائص الفيزيوكيميائية للزيت الأساسي باستعمال تقنية كروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي.

يتم استخلاص الزيت العطري من القرنفل بواسطة طريقة التقطير المائي والمستخلص الخام الناتج عن النقع. يتم إجراء اختبارا لإبراز قوته المضادة للفطريات على خمسة سلالات فطرية :

Aspergillus (parasiticus, A flavus, A carbonarius, A fumigates) و Penicillium sp.

أظهرت النتائج أن مستخلص القرنفل له نشاط مضاد فطري قوي ممثلة بأقطار تثبيط تتراوح بين 25 مم و 32 مم للسلاسل الفطرية وقطر 9 مم إلى 18 مم للزيوت العطرية. محصول الزيت الأساسي والمستخلص الخام المتحصل عليه هو 2.8% و 4% على التوالي ، هذه النسبة على الرغم من ضعفها يبقى أفضل من تلك التي حصل عليها مؤلفون آخرون ، ونتائجنا للتحاليل الفيزيوكيميائية متوافقة مع معايير الرابطة الفرنسية للتوحيد القياسي والرابطة الفرنسية لضمان الجودة

كلمات مفتاحية: أعواد القرنفل، الزيوت الطيارة، المستخلص الخام، الفعالية البيولوجية، التثبيط، التحليل الكروماتوغرافي

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

HE : huile essentielle

CMI : concentration minimale inhibitrice.

DO : densité optique.

DMSO :Diméthylsulfoxyde.

nm: nanomètre

UV: Ultraviolet

ml : millilitre

R : rendement

HPLC : Chromatographie liquide sous haute pression

NaCl : chlorure de sodium

g : gramme

A : *Aspergillus*

µL : microlitre

PDA : Potata Dextrose Agar ou pomme de terre glucosée

PS : phase stationnaire

PM : phase mobile

PH : potentiel hydrogène

M : masse

Liste de figure :

Figure 1 : la distribution géographique des pays plantent le giroflier.....	4
Figure 2: <i>Syzygium aromaticum</i> (L).....	5
Figure 3 : Allure générale d'un giroflier (<i>syzygium aromaticum</i>)	6
Figure 4 : la plante de giroflier (<i>syzygium aromaticum</i>), à droit : les feuilles, au milieu : les fleurs, à gauche : clou de girofle.....	7
Figure 5 : Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.....	13
Figure 6 : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	14
Figure 7 : Montage d'extraction assistée par micro-onde.....	15
Figure 8 : Structure de l'hyphe chez les moisissures :(a) thalle siphonné, (b) thalle septé....	17
Figure 9 : Quelques champignons filamenteux.....	18
Figure 10 : les clous de girofle ; A : sain, B : broyé.....	21
Figure 11 : L'Appareil d'hydro-distillateur de type Clevenger.....	23
Figure 12 : la récupération de l'huile essentielle de clou de girofle.....	24
Figure 13: les étapes appliquées pour l'extraction par macération de l'extrait brut.....	25
Figure14 : Agitation de la solution.....	25
Figure15 : la filtration de solution.....	25
Figure16 : mesure de PH	26
Figure 17 : Photo personnelle; Appareil d'HPLC.	27
Figure 18 : Photo personnelle; Système d'HPLC.....	28
Figure 19 : Photo personnelle; Colonne d'HPLC C18 (125).....	28
Figure 20 : Photo personnelle; Filtration de l'échantillon d'huile de clou de girofle.....	30
Figure 21 : Photo personnelle; Phase mobile utilisé (Eau filtrée, méthanol, 2-propanol).....	30
Figure 22 : Photos personnelles; Phase de chargement de la boucle.....	32
Figure 23 : Photos personnelles; Phase d'injection de l'échantillon.....	32
Figure 24 : Aspects macroscopiques des souches après 7 jours d'incubation sur milieu PDA.....	34

Figure 25 : Schéma des différentes étapes de la réalisation du test antifongique.....	35
Figure 26 : préparation des dilutions de l'huile essentielle de clou de girofle.....	36
Figure27 : Les dilutions de l'huile.....	37
Figure 28 : inoculum de différente souche Fongique.....	38
Figure29 : mesure de DO à l'aide d'une Spectrophotométrie.....	38
Figure 30 : préparation de boite pétrie.....	38
Figure 31 : Mesure des diamètres d'inhibition.....	39
Figure 32 : évaluation de zone d'inhibition des Cinq souches testées sous l'effet de l'huile essentielle et l'extrait brut	46
Figure 33 : évaluation de concentration minimale inhibitrice vis-à-vis d'huile essentielle des Cinq souches testées.....	48

Liste de tableaux

Tableau 1 : les compositions chimiques de <i>Syzygium aromaticum</i>	11
Tableau 2: liste des matériels non biologique utilisés pendant la manipulation.....	21
Tableau 03: Les conditions chromatographiques utilisés.....	29
Tableau 04 : Résultat du rendement de l'huile et l'extrait.....	40
Tableau 05 : Résultat du PH	41
Tableau 06 : Concentration en % et temps de rétention des différent composes obtenus par analyse HPLC en phase gazeuse del'huileessentielle de <i>S.aromaticum</i>	42
Tableau 07: Evaluation de l'activité antifongique d'extrait et d'huile essentielle de clou de girofle sur différentes souches testés.....	44
Tableau 08: Les CMI d'huile essentielle vis-à-vis des Cinq souches fongiques.....	47

SOMMAIRE

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction générale.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I- Généralité sur la plante	3
I.1 Historique	3
I.2 Localisation géographique	3
I.3 L'étude de la plante	4
I.3.1 Dénominations internationales	4
I.3.2 Synonymie taxonomique	4
I.3.3 Classification.....	5
I.3.4 La famille des Myrtacées	5
I.3.5 Description botanique du giroflier	6
I.3.5.1 Allure générale	6
I.3.5.2 Les feuille	6
I.3.5.3 Les fleurs.....	6
I.3.5.4 Les fruits	7
I.4 Culture du Giroflier.....	7
I.4.1 Ecologie	7
II.L'aromathérapie et les huiles essentielle	8
II.1. Définition de L'aromathérapie	8
II.2. L'utilisation de l'aromathérapie	8
II.3 les huiles essentielles	9
II.3.1 Histoire des huiles essentielles	9
II.3.2 Définition des huiles essentielles	9
II.3.3 Composition chimique des huiles essentielles	9

II.3.4 Répartition et localisation	10
II.3.5 Les huiles essentielles de girofle	10
II.3.6 Propriétés thérapeutiques de l'HE de girofle.....	11
II.3.7 Utilisation traditionnelle de girofle	12
II.3.8 Extraction des huiles essentielles.....	13
II.3.8.1 Extraction par distillation	13
II.3.8.2 L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO)	14
II.3.8.3 Extraction par solvants volatils	15
II.3.8.4 Extraction à froid	15
II.4 Technique de culture.....	15
II.5 Récolte et stockage	16
III. Généralité sur les moisissures	16
III.1. Définition.....	16
III.2. Caractéristiques morphologiques des champignons	16
III.3. Classification	17
III.3.2 Ascomycète	17
III.3.3 Basidiomycètes	17
III.3.4 Deutéromycètes	18
III.4. Conditions de croissance	18
III.4.1 Eléments nutritive	18
III.4.2 Facteurs physicochimiques	19
III.4.2.1 Humidité	19
III.4.2.2 Température.....	19
III.4.2.3 PH :.....	19
III.4.2.4 Aération	19
III.4.2.5 Lumière :.....	20

Chapitre II : matériels et méthodes

I- But d'étude	21
II-Matériel	21
II-1-Matériels non biologiques	21

II-2-Matériels biologiques.....	22
III- Méthodes	22
III-1-Hydrodistillation.....	22
III-1-1-L'Appareil d'extraction.....	22
III-1-2-Le principe et Procédés d'extraction	23
III-1-3-La conservation de l'huile essentielle.....	24
III-2- Préparation des extraits de Clous de girofle par macération.....	24
III-4-Les analyses de l'huile essentielle et l'extrait du plant	26
III-4-1-L'analyse physique.....	26
III-4-1-1- Le rendement	26
III-4-1-2- La mesure de pH	26
III-4-2 L'analyse chimique	27
III-4-2-1-Chromatographie liquide sous haute pression (HPLC)	27
III-4-2-1- 1-Appareillage.....	27
III-4-2-1- 2-Méthode de l'analyse d'HPLC.....	28
III-5-Evaluation de l'activité antifongique	33
III-5-1-Les souches fongiques testées	33
III-5-2- Repiquage des germes	33
III-5-3-Méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits)	35
III-5-4-Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide	36
III-5-4-1-Préparation de dilution des huiles	36
III-5-5-Préparation de l'inoculum	37
III-5-6-Préparation du milieu de culture.....	38
III-5-7-Ensemencement	39
III-5-8-Incubation et lecture	39

Chapitre III : Résultats et discussions

I-Les analyses physiques de l'huile essentielle et de l'extrait brut	40
I-1. Le rendement.....	40
I-2-PH.....	40

II- L'analyse chimique	41
II-1.Chromatographie liquide sous haute pression (HPLC).....	41
II-1-1. L'huile essentielle	41
III.Activité antifongique.....	44
III-1.Expression des resultants.....	44
III-1-2.Especes Aspergillus	45
III-1-3Penicillium :.....	45
III-2-Détermination de Concentration minimale inhibitrice (CMI) pour huile essentielle.....	47
Conclusion.....	50
Références bibliographiques	
Annexes	

De nombreuses plantes sont utilisées à différentes fins, par exemple, dans les aliments, médicaments et produits de secteurs. L'utilisation des plantes comme médicaments est une pratique généralisée de l'importance significative dans de nombreuses sociétés à travers le monde, puisque les plantes peuvent fournir des médicaments efficaces pour aider à élargir l'arsenal thérapeutique disponible. Plusieurs chercheurs ont montré de l'intérêt des composés biologiquement actifs isolés de plantes et épices pour éliminer les micro-organismes pathogènes en raison de la résistance que de nombreux micro-organismes ont construit aux antibiotiques.

Pour cette raison, la Phyto-aromathérapie et d'autres études classiques sur les plantes médicinales et aromatiques de l'huile essentielle sont menées de manière intensive dans le monde entier afin de promouvoir les Phyto-aromathérapies pour les applications thérapeutiques contre les pathologies actuelles.

Aujourd'hui, grand nombre des plantes sont bien connus en pharmacologie traditionnelle en tant que médicaments et c'est le cas de *Syzygium aromaticum* (clou de girofle), il a de nombreuses utilisations thérapeutiques : ils contrôler les nausées et vomissements, toux, diarrhée, dyspepsie, flatulence, distension de l'estomac et les spasmes gastro-intestinale, soulager la douleur, causer des contractions utérines et stimuler les nerfs, il a été signalé que *S. aromaticum* ont été utilisés avec succès pour l'asthme et de divers troubles allergiques par administration orale.

L'huile essentielle de plantes et leurs autres produits du métabolisme secondaire ont eu un grand usage en médecine populaire, arôme alimentaire, parfum, et l'industrie pharmaceutique. L'huile essentielle extraite des bourgeons de fleurs séchées de girofle est utilisé pour l'acné, les verrues, les cicatrices et les parasites. La recherche a montré que l'huile de girofle est un insectifuge efficace, il a également des propriétés fongicides et très efficaces contre les moisissures responsables de la détérioration des denrées alimentaires lors de leurs stockages.

Notre objectif dans ce travail est de faire l'extraction des huiles essentielles et l'extrait des clous de girofle et en suite faire les analyses physicochimiques, puis en tester l'activité antifongique de ces deux extraits sur les champignons.

Ce travail a été réalisé en trois grandes étapes:

La première étape correspond à l'étude de plante et des notions sur huile essentielle et les souches testée.

La deuxième étape correspond à l'étude des analyses physico-chimiques de ces huiles et d'extrait des clous de girofle extraites par hydro-distillation et par macération.

La troisième étape consiste à l'évaluation de l'activité antifongique des ces extraits.

I- Généralité sur la plante :

I.1 Historique :

Le girofle est une épice connue depuis des lustres. Il est d'abord enregistré à la période des Han chinois (220-206 avant Jusie Chrust).[1]

Le nom clou de girofle est dérivé du mot français clou et clavo espagnol, les deux signifiant «clou», en raison de sa ressemblance avec la forme d'un clou[2].

Autour du 16^{ème} siècle, les Portugais ont brisé l'arabe monopole du commerce des épices en mer. [3]. Au début du 17^{ème} siècle, la direction hollandaise enlève des girofliers de toutes les îles sauf Amboina anterne, afin d'en augmenter le prix. [4] ;Jusqu'au18^{ème} siècle où le contrôle sur la production était encore plus drastique pour maintenir artificiellement les prix.[5]

La Compagnie Française en Indes missionna-t-elle Pierre Poivre (figure1) pour aller chercher ce fameux clou de girofle. Lors d'un premier voyage, il transporta clandestinement quelques plants de muscadier de Timor à l'île de France, sans résultat[6].

En 1773, il réussit à obtenir quelques plants des épices séquestrées par les hollandais qui furent plantés dans l'île de La Réunion. [7]

De nos jours, les clous de girofle sont disponibles dans toutes les grandes surfaces, à des prix accessibles, après avoir bouleversé des civilisations entières et coûté la vie à de nombreux hommes.

I.2 Localisation géographique :

L'Indonésie en particulier les îles Moluques est le berceau de la culture du giroflier, Aujourd'hui, cet arbre est cultivé à basse altitude dans nombreux pays tropicaux où il est maintenu à l'état arbustif pour faciliter la récolte, le premier pays qui plante le giroflier c'est l'Indonésie, suivie de Malaisie, puis en Inde, Madagascar par la suite les îles d'Afrique de l'Est de la République-Unie de Tanzanie (notamment les îles productrices Pemba et Zanzibar), de Ceylan et d'Amérique du Sud [8].

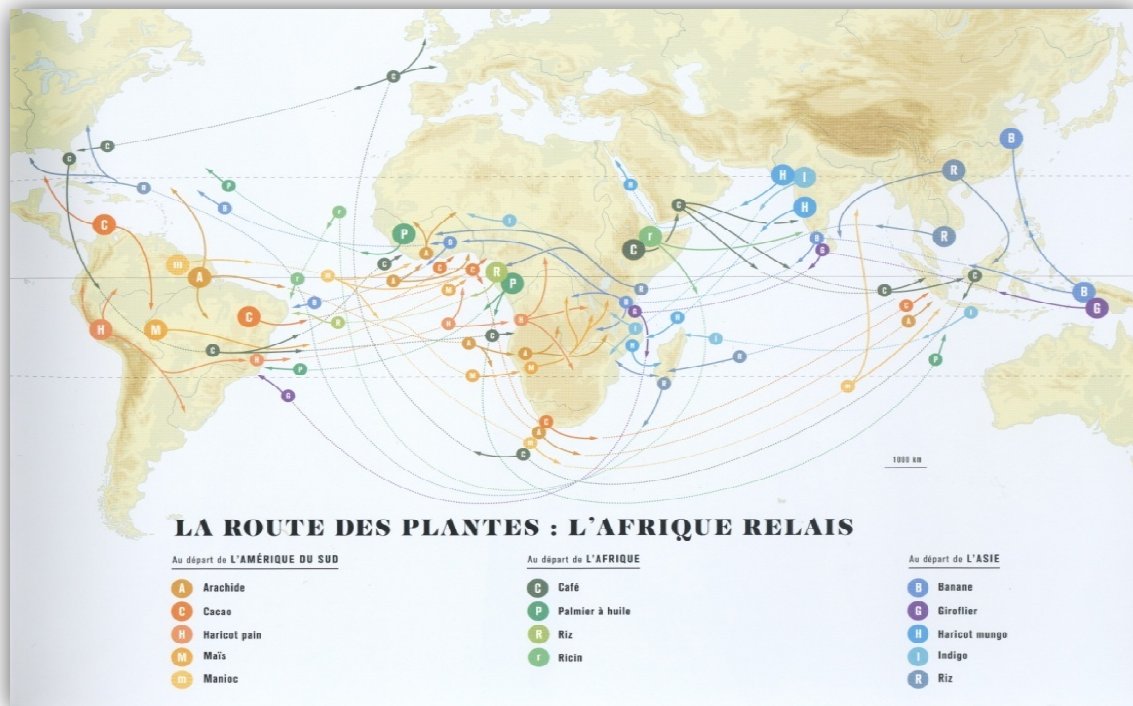


Figure 1 : la distribution géographique des pays qui plantent le giroflier [9].

I.3 L'étude de la plante :

I.3.1 Dénominations internationales

Français : clou de girofle, arbre au clou

Anglais : clove, clove tree

Arabe : qaranful, qruⁿ'fu^l, u^d annawar, القرنفل

I.3.2 Synonymie taxonomique :

Comme beaucoup d'espèces, le giroflier a porté plusieurs noms scientifiques avant d'être nommé *Syzygium aromaticum* :

- *Caryophyllus aromaticum* L.
- *Eugenia aromatica* (L.) Baill.
- *Eugenia caryophyllata* Thunb.
- *Eugenia caryophyllus* C. Spreng, Bull. & Harr.
- *Jambosa caryophyllus* (Spreng.) Nied.
- *Myrtus caryophyllus* Spreng[10, 11].

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

I.3.3 Classification :**Règne :** Plantae**Sous-règne :** Tracheobionta**Embranchement :** Magnoliophyta (phanérogames)**Sous-embranchement :** Magnoliophytina
(angiospermes)**Classe :** Magnoliopsida (= dicotylédones)**Sous-classe :** *Rosidae***Ordre :** Myrtales**Famille :** Myrtaceae**Genre :** *Syzygium***Espèce:** *S.aromaticum*[12]**Figure 2:** *Syzygium aromaticum*(L)**I.3.4 La famille des Myrtacées :**

La famille des myrtacées est une famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 3800 espèces dont le plus près de 700 *Eucalyptus* et 500 *Syzygium*, continent pour la grande majorité tropicales, et toutes aromatiques

Ce sont des arbustes à feuilles entières et opposées les fleurs axillaires hermaphrodites et Calice cupuliforme. Etamines très nombreuses, insérées avec les pétales au sommet du tube calycinal.

Sont caractérisées par la présence dans leur tissus de poche sécrétrices d'huiles essentielles, ces huiles essentielles sont souvent antiseptiques

Les Myrtacées présentent en général les mêmes propriétés dans les régions tropicales, elles sont toujours aromatiques ; leurs fruits sont plus ou moins comestibles, astringents, précieux comme anti-diarrhéiques ; leurs bois sont toujours durs et odorants[10].

I.3.5 Description botanique du giroflier :

I.3.5.1 Allure générale :

Le giroflier ou girofle (*Syzygium aromaticum*) est un arbre de la famille des myrtacées, il possède une forme conique, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 mètre qui peut atteindre jusqu'à 20 mètre du haut, se divise en rameaux, l'ensemble forme cime pyramidale et au tronc gris clair ridé.



Figure 3 : Allure générale d'un giroflier (*syzygium aromaticum*) [13].

I.3.5.2 Les feuille :

Les feuilles de 8 à 10 cm de long, elles sont positionnées de manière opposée sur le rameau, sont coriaces, persistantes, pétiolées, ovales, au limbe lancéolé la face supérieure vert rougeâtre et a la face inférieure vert sombre.

I.3.5.3 Les fleurs :

L'inflorescence comprend des petites cymes (3-4 cm) compactes et ramifiées, regroupées en panicules de 3 à 5 petites fleurs parfumées, au calice tubulaire au blanc cassé puis rouge (4 sépale rouges charnus et persistants) et à La corolle blanc- rose est composée de 4 pétales caducs cohérents, Les pétales tombent à l'ouverture de la fleur.

I.3.5.4 Les fruits :

Les fruits sont nommés « anthofles » Ce sont des petites baies elliptiques : environ 1,5cm de long, Ils sont de couleur brun violacé

Les boutons floraux de couleur brun rouge très caractéristiques sont en forme de clou, l'odeur est aromatique caractéristiques, la saveur est brulante, le clou comporte une partie quadrangulaire, l'hypanthe de long de 10 à 12 m.



Figure 4 : la plante de giroflier (*syzygium aromaticum*), à droite : les feuilles, au milieu : les fleurs, à gauche : clou de girofle

I.4 Culture du Giroflier :

I.4.1 Ecologie :

Le port de l'arbre, la densité de son feuillage persistant, fournissent les indications essentielles du climat exigé par le Giroflier, c'est un arbre des climats tropicaux : il exige beaucoup de chaleur et d'eau, et une bonne protection contre les vents, car son système racinaire est faible et se répartit principalement en surface. Mais la floraison doit coïncider avec une période sèche, nécessaire également pour le séchage des clous.

Certains arbres croissent jusqu'à des altitudes de 700 m, ils sont alors rachitiques. Il a également besoin d'une altitude basse, ne dépassant pas 300 mètres. Les climats marins semblent favoriser son développement[14, 15].

II. L'aromathérapie et les huiles essentielles

II.1. Définition de L'aromathérapie :

L'étymologie du mot « aromathérapie » (du latin aroma, arôme, et du grec therapia, traitement) pour définir cette thérapie comme le traitement des maladies par les arômes.

Dans le domaine médical, l'aromathérapie se définit comme une thérapeutique utilisant les huiles essentielles végétales par voie interne ou externe.

D'une manière générale, l'aromathérapie peut se définir comme une thérapeutique naturelle utilisant les extraits de plantes aromatiques pour soigner ou prévenir les maladies ; elle s'intègre dans le cadre de la phytothérapie qui elle fait appel à toutes les plantes dotées de vertus médicinales, L'aromathérapie est préventive et curative[16].

II.2. L'utilisation de l'aromathérapie : Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples :

- ❖ **Utilisation cosmétique :** Leurs constituants sont utilisés dans l'élaboration des parfums, produit de beauté et produit de toilette. Ces essences servent à préserver ces produits cosmétiques grâce à leur activité antiseptique tout en leur assurant leur odeur agréable [17].
- ❖ **En médecine :** Utilisation en médecine en tant que médicaments pour l'homme; par exemple
 - en urologie, dermatologie, gastrite aiguës, toux...
 - Anti-inflammatoires.
 - Les maladies du stress, des activités antioxydants ; comme le thé vert, girofle
 - Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire et antifongique.
- ❖ **En alimentation :** Assaisonnement des boissons des colorants et des composants aromatiques. L'aromathérapie utilisée dans l'alimentation pour une bonne part responsable des plaisirs de la table, Considéré comme condiments et aromates dont certains sont volatiles est constituent ce qu'on appelle en général les huiles essentielles, les autres non volatile, sont plus particulièrement responsable de la saveur et de la couleur[18].

II.3 les huiles essentielles :

II.3.1 Histoire des huiles essentielles :

Les essences parfumées connues dès l'origine des civilisations, furent d'abord utilisées pour des usages sacrés. Rites funéraires, embaumement des morts, onctions des élus, sacrifices aromatiques aux ancêtres et aux divinités apparaissent comme une constante des mondes antiques, de la Chine à la Perse et de l'Arabie à la Grèce. Nous pensons que le nom huile essentielle a été inventé au 16^{ème} siècle par le réformateur suisse de la médecine, Paracelsus von Hohenheim qui a appelé le composant efficace *essentia de Quinta de droga*. 3000 huiles essentielles environ sont connues, dont environ 300 sont destinées à un usage commercial. Parallèlement, nous retrouvons l'utilisation de végétaux dans les pratiques thérapeutiques de ces diverses civilisations, selon différents stades évolutifs liés à leur utilisation [17].

II.3.2 Définition des huiles essentielles :

Les huiles essentielles (essences = huiles volatiles) sont des métabolites secondaires produits par les plantes (elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs...) comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages. Ces extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés qui sont pour la plupart des molécules peu complexes, soit des mono-terpènes avec leurs phénols reliés, et des terpènes plus complexes, dont les sesquiterpènes [19].

II.3.3 Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée. Il s'agit de groupe des terpènes spécialement les mono terpènes et les sesquiterpènes, prépondérants dans la plupart des essences, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane [17].

a) Les terpènes :

Les mono terpènes est les plus simple constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques [20].

b) Composés aromatiques :

Les dérivés du phénylpropane (C6-C3) ou appelés composés phénoliques sont moins répandus que les terpénoïdes.

c) composés d'origine diverse :

Il existe un nombre non négligeable de produits résultants de la transformation des molécules non volatils issues soit de la dégradation des terpènes non volatils qui proviennent l'auto oxydation par exemples des carotènes ou des acides gras[17].

II.3.4 Répartition et localisation :

Les huiles essentielles sont rencontrées dans diverses familles botaniques, elles sont largement répandues dans le monde végétal et se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles. Actuellement, on compte environ 800,000 espèces végétales et parmi elles, seulement 10% sont capables de synthétiser une essence, c'est-à-dire les plantes aromatique.

Ces essences se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante, dans une même plante, ces huiles peuvent exister à la fois dans différents organes, où la composition chimique peut varier d'un organe à un autre. Ces essences aromatiques sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante [21].

II.3.5 Les huiles essentielles de girofle :

Les huiles essentielles de clous, de feuilles et de griffes du girofle sont principalement caractérisées par l'eugénol, l'acétate d'eugénol et le β -caryophyllène mais à des proportions différentes selon les auteurs. Elle est de couleur jaune à jaune pâle, caractérisée par une odeur épicée, puissante, aromatique et aldéhydée montante de tête [22].

Tableau 1 : les compositions chimiques de *Syzygium aromaticum* [12].

Famille de constituants	Détail des constituants
Huile essentielle 15 à 20 %	Eugénol (80 à 90 %), acétate d'eugénol (5 à 10 %), alpha- et bêtacaryophyllène (5 à 12 %), cétones aliphatiques
Tanins (12 %)	Tanins gallique et ellagique, acide gallique, acide protocatéchique, eugéniine, casuarictine, 1,3-di-O-galloyl-4,6-(S)-hexahydroxydiphényloxy-beta-D-glucopyranose, tellimagrandine
Flavonoïdes (0,4 %)	Quercétine, kaempférol, rhamnénine, eugénitine
Chromones	Biflorine, isobiflorine, hétérosides de chromone
Corps gras	Stérols, glycosides stéroliques, huile grasse (10 %)
Autres	Acides phénols, triterpènes

II.3.6 Propriétés thérapeutiques de l'HE de girofle:

L'utilisation de l'HE de Clou de girofle est à rapprocher de celle des clous seuls et de son principal constituant, l'eugénol

❖ **Propriétés anti-infectieuses** : De par sa forte teneur en eugénol, l'HE de Clou de girofle possède des propriétés [23]:

- **bactéricide** : L'eugénol et l'eugénol acétate ont démontré leur activité sur de nombreuses souches bactériennes, provenant aussi bien de bactéries à Gram + que de bactéries à Gram -.
- **fongicide** : L'HE de Clou de girofle est fongicide à de faibles concentrations pour des souches de levures pathogènes de l'homme résistantes au fluconazole. Son action s'étend également sur des souches de Dermatophytes et d'*Aspergillus*.
- **Acaricide** : Les essais contre le *S. scabiei*, agent responsable de la gale humaine, montrent que l'utilisation de cette HE est plus efficace que la perméthrine ou que le benzoate de benzyle.

- ❖ **Propriété antioxydant :** L'eugénol montre une action protectrice sur la cirrhose hépatique en inhibant la prolifération cellulaire et en diminuant le stress oxydatif. Ce serait un excellent agent de prévention des métastases liées au stress oxydatif [23].
- ❖ **Anti nociceptif :** L'emploi des analgésiques comme de girofle ont été signalés depuis le 13^e siècle, pour l'odontalgie et la douleur et antispasmodique, étant l'eugénol l'enceinte principale responsable pour cette activité. D'autres résultats montrent que l'effet analgésique de girofle est due à l'action comme agoniste de la capsaïcine.
- ❖ **Antivirale :** L'activité antivirale de l'eugeniin, un composé isolé de *S. aromaticum*, a été testée contre les souches du virus de l'herpès est efficace à 5 µg/mL, et il a été retenu que l'une des principales cibles de eugeniin est la synthèse d'ADN viral par l'inhibition de l'ADN polymérase virale [24].

II.3.7 Utilisation traditionnelle de girofle : Ici en Algérie, Le girofle est considéré comme l'un des éléments les plus importants dans les cuisines et les thérapeutiques traditionnelles, il a été utilisé par nos mères pendant longtemps pour traiter plusieurs problèmes de santé :

- ✓ Antiseptique et analgésique; soulage les douleurs dentaires, recommandé pour son action échauffante aux personnes sujettes aux rhumes par l'infusion de girofle qui déclenche le phénomène de transpiration, très utile dans le cas de fortes fièvres et de vomissements.
- ✓ Anti-inflammatoire à utiliser localement sur les zones enflées, frictionner les gencives, appliquer un peu d'huile pure sur les piqûres.
- ✓ Élimine les parasites du corps et les insectes par une orange piquée de clous de girofle.
- ✓ Laisser frémir des clous de girofle dans de l'eau bouillante. Filtrer et employer le liquide comme sédatif, pour régularise le système digestif, réduit les gaz et soulage les nausées et peut accélérer le processus d'accouchement.

II.3.8 Extraction des huiles essentielles

II.3.8.1 Extraction par distillation :

a) Hydro distillation :

L'hydro distillation est la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée, La matière végétale est immergée directement dans un alambic d'un litre rempli d'eau ; 150 g de matière première ont été mélanges avec 750 ml d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant. Et les différentes substances sont récupérées séparément dans de la verrerie de laboratoire[25].

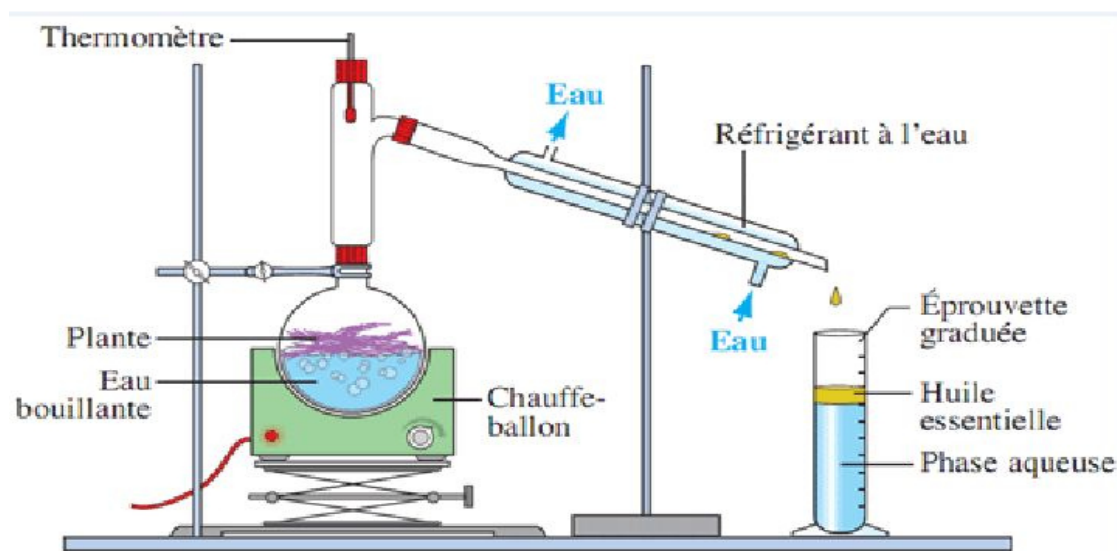


Figure 5 : Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.

b) Distillation par entraînement à la vapeur d'eau :

Ci le même principe avec l'hydro distillation, sauf que le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau, le principe de cette méthode consiste à percoler la matière végétale par de la vapeur d'eau distillée, l'huile essentielle (HE) est récupérée par décantation[26].

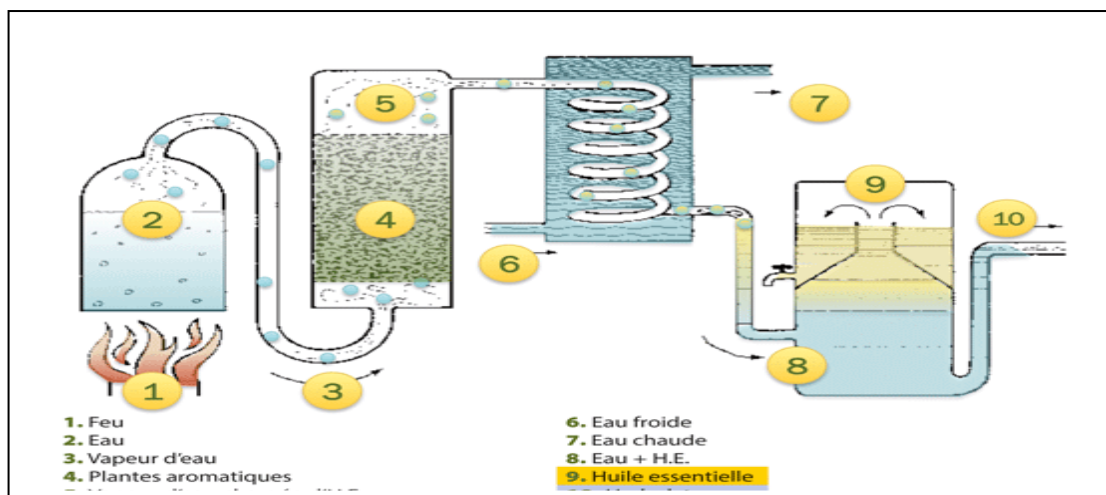


Figure 6 : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.

C) Hydrodiffusion :

L'obtention de certaines huiles essentielles par hydrodiffusion s'est développée ces dernières années. Le principe de ce nouveau procédé consiste à pulser la vapeur de haut en bas à travers le végétal disposé sur une grille. L'huile essentielle s'écoule vers un collecteur permettant un équilibre avec la pression atmosphérique[27].

II.3.8.2 L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO) :

Ce procédé basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four[28].

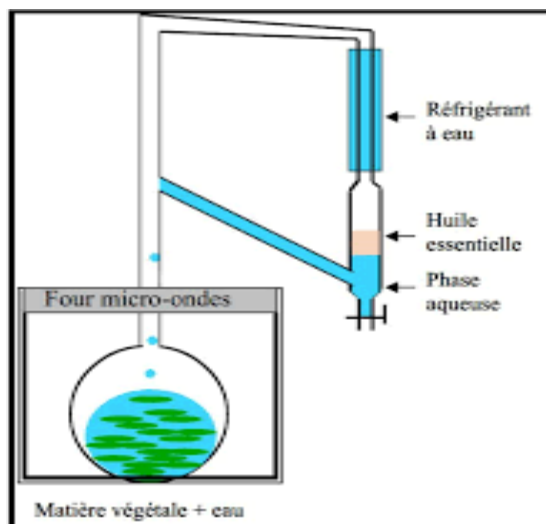


Figure 7 : Montage d'extraction assistée par micro-onde(HDMO)[28].

II.3.8.3 Extraction par solvants volatils :

La technique d'extraction par solvant volatil, consiste à placer dans un extracteur la matière végétale à traiter et un solvant volatil. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en huiles essentielles, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé sous pression atmosphérique. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson[17].

II.3.8.4 Extraction à froid :

Cette technique s'applique aux huiles citronnées et agrumes (comme le citron, l'orange, la mandarine). Les écorces ou les zestes sont pressés par une machine ou à la main pour en recueillir les huiles. L'extrait alors recueilli se nomme « essence aromatique » et non « huile essentielle » car il n'y a aucune modification chimique[29].

II.4 Technique de culture :

Le Giroflier serait donc une espèce vivant à l'état spontané dans les clairières ou sur les pentes portant une forêt peu dense [14].

La technique culturale est des plus simples: on sème dès la récolte, en pépinière. Au bout de dix-huit mois on met en place à des intervalles de 7-10 m dans un trou profond de 50 cm en tous sens. Puis amendez la terre avec du sable, suivant la richesse du sol. Les soins sont négligeables, à part quelques sarclages sommaires chaque année [15].

II.5 Récolte et stockage :

Dans une plantation adulte le rendement moyen varie du simple au double suivant de multiples facteurs, à moyenne de 5 kg de clous secs par arbre. La récolte s'échelonne sur plusieurs mois : par exemple de la mi-octobre à fin décembre, à Sainte-Marie (Madagascar). La qualité du produit dépend essentiellement du séchage. On emballe le girofle dans des sacs de jute ou de Paka (*Urena lobata*) [15].

III. Généralité sur les moisissures :

III.1. Définition :

Les micromycètes sont des champignons microscopiques regroupant les levures et les champignons filamenteux. Ce sont des microorganismes eucaryotes caractérisés par la présence d'une membrane nucléaire et des mitochondries. Un micromycète est un organisme porteur des spores et dépourvu de chlorophylle. Contrairement aux végétaux, il est incapable de synthétiser la matière organique à partir du gaz carbonique atmosphérique. Il utilise la matière organique puisée dans le substrat, comme source d'énergie, de carbone et d'électrons.

Le terme moisissure désigne tous les champignons microscopique eucaryotes, filamenteux et pluricellulaires .ce sont des thallophytes hétérotrophes (dépourvus de chlorophylle) et immobiles. Certaines vivent en symbioses avec les végétaux, et d'autre sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autre encore sont des saprophytes en développant sur les déchets organiques au de produits alimentaires[30].

III.2. Caractéristiques morphologiques des champignons :

La structure des champignons repose sur leur appareil végétatif appelé thalle, constitué d'hyphes ou cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10 μm de diamètre. Ces hyphes comprennent les organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie, cytoplasme, vésicules. L'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé »[30].

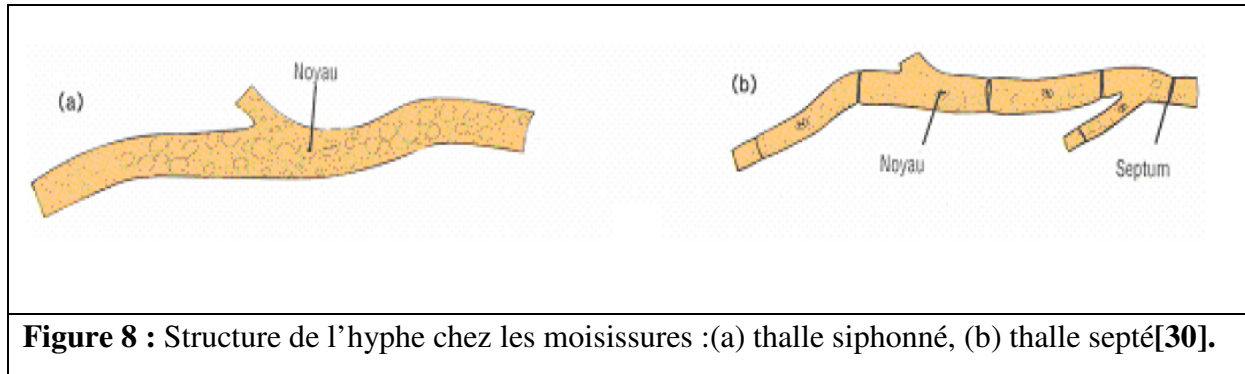


Figure 8 : Structure de l'hyphe chez les moisissures :(a) thalle siphonné, (b) thalle septé[30].

III.3. Classification :

Les moisissures situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction, Elle classe les mycètes en quatre grands embranchements : les **Zygomycètes**, les **Ascomycètes**, les **Basidiomycètes**, et les **Deutéromycètes** [31] :

III.3.1 Zygomycètes :

Ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et leur mode de reproduction sexuée. La famille la plus importante dans cette classe est celle de Mucorales qui comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires .Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,...) comme *Rhizopus* et *Mucor*[32, 33].

III.3.2 Ascomycète :

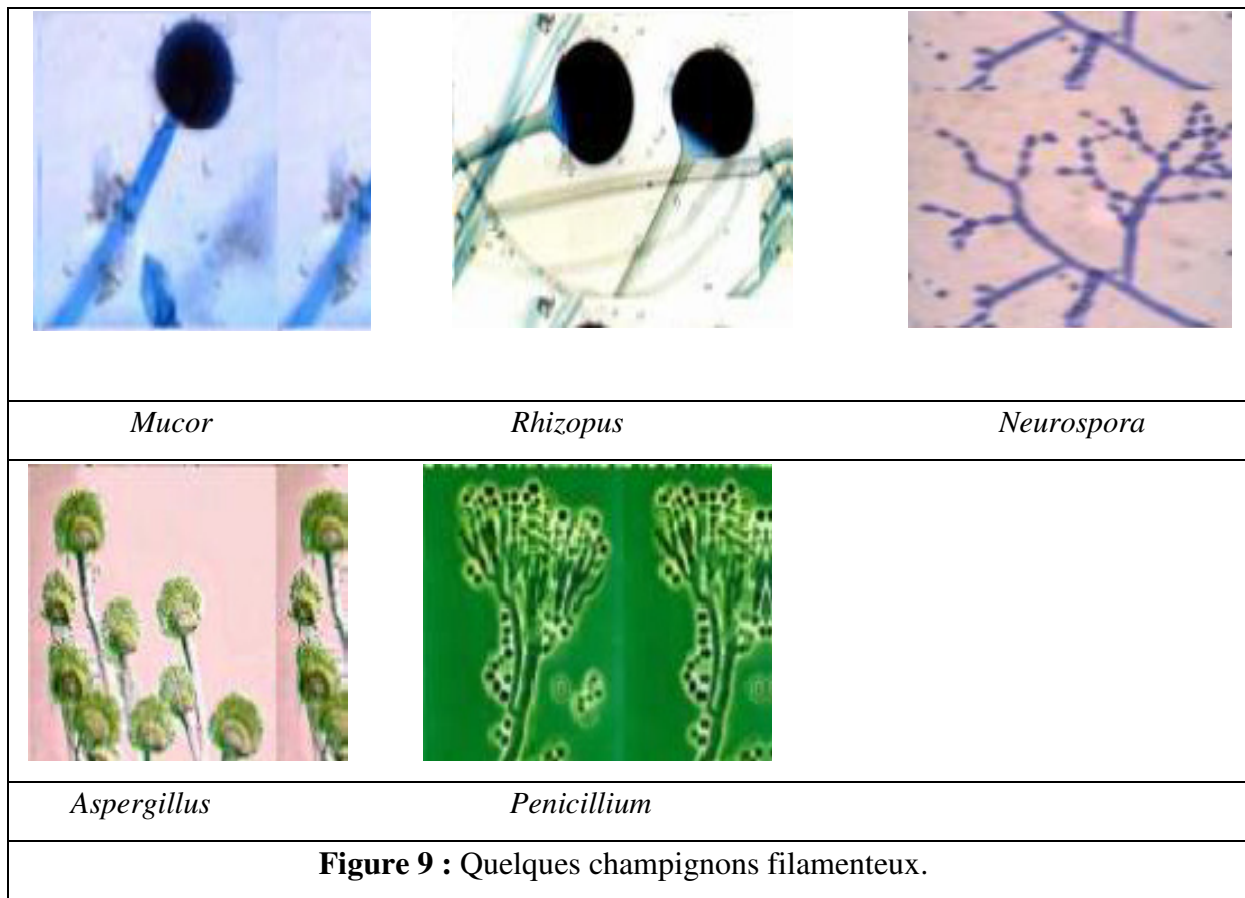
Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué. Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures. Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microscales et des Sphaeriales. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Neurospora*[31].

III.3.3 Basidiomycètes :

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé. La reproduction de ces champignons est, soit sexuée soit asexuée, c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus*[34] [31].

III.3.4 Deutéromycètes :

Egalement appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium. Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales. Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires. Cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus*[35].



III.4. Conditions de croissance :

III.4.1 Eléments nutritive :

Les champignons sont des organismes hétérotrophes. Incapables de synthétiser leurs molécules carbonées à partir du dioxyde de carbone atmosphérique, ils vivent aux dépens de matières organiques préformées. Le passage des substances se fait par absorption. La majorité des champignons est capable de se développer sur des milieux très simples, contenant une source de carbohydrates (glucose), d'azote (sulfate d'ammonium), et des sels minéraux

(potassium, phosphate, magnésium, fer et zinc). Quelques uns nécessitent pour leur croissance l'apport de vitamines[36].

III.4.2 Facteurs physicochimiques :

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

III.4.2.1 Humidité :

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes. Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores[37].

III.4.2.2 Température:

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores. Les exigences thermiques pour le développement des moisissures diffèrent d'une moisissure à l'autre, La majorité des moisissures sont mésophiles c'est-à-dire qu'elles se développent aux alentours de 20-25°C , Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au dessus de 50°C), mais il existe certaines moisissures qui sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures[38].

III.4.2.3 PH :

Le développement des moisissures sur les aliments et sur tous les substrats en général est dépendant de la disponibilité du pH. Le pH influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs soit directement par action sur la membrane cellulaire. La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 6.0 – 8.0 bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acides C'est le cas de *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus oryzae*[39].

III.4.2.4 Aération :

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur[40].

III.4.2.5 Lumière :

Le développement des moisissures dépendant à L'exposition prolongée et répétée au rayonnement ultraviolet sur le substrat en général peuvent agir sur la sporulation[41].

I- But d'étude :

La qualité et la pertinence des résultats dépendent intimement de la méthode d'extraction la plus convenable et appropriée choisie. C'est pour quoi, un intérêt particulier est porté sur la méthode, le choix des solvants et le suivi précis du protocole conventionnel des tests d'activité antimicrobienne, à cet effet, nous nous étions fait aider par un groupe d'enseignants de différentes spécialités à savoir ; un écologiste, biochimiste, microbiologiste et des laborantins maîtrisant l'appareillage utilisé.

Notre travail a été réalisé dans le laboratoire de Microbiologie alimentaire du département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques de l'Université D'Akli Mohand Oulhadj à Bouira. L'objectif de notre travail est porté sur l'étude des propriétés physicochimiques de l'huile essentielle et l'extrait de clou de girofle. Cette phase a pour but d'extraire l'huile essentielle et l'extrait du girofle en utilisant la méthode d'extraction par hydro distillation et la macération.

II-Matériel :**II-1-Matériels non biologiques :**

L'ensemble de matériel non biologique utilisé pour réaliser cette étude résumé dans le tableau suivant

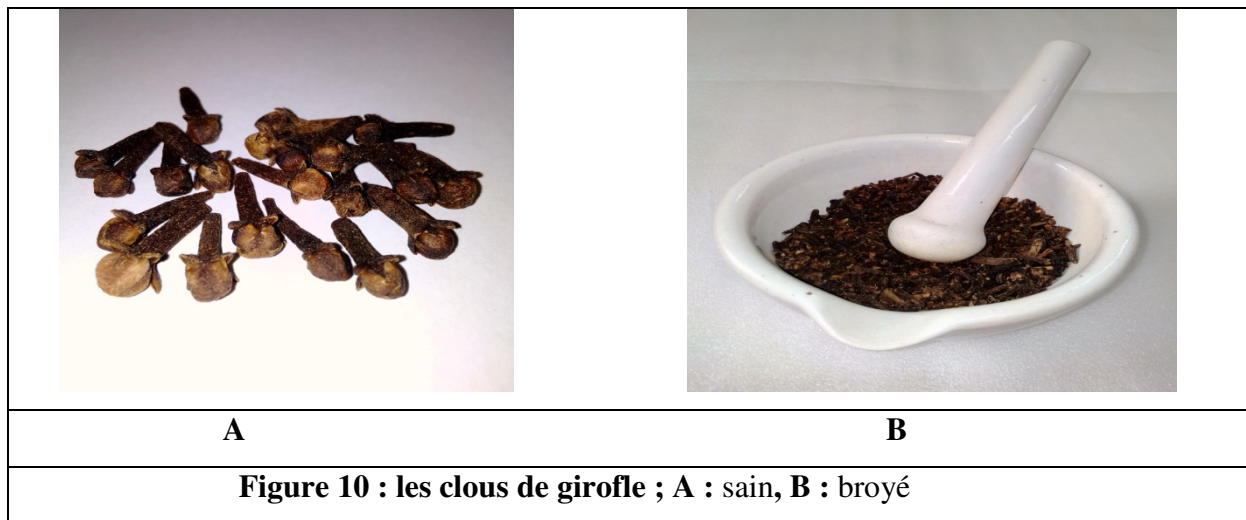
Tableau 2: liste des matériels non biologique utilisés pendant la manipulation

Verreries et petits matériels	Appareils	Réactifs et produits chimiques
-Bécher 250 ml	-Agitateur magnétique	-Milieu gélose nutritive
-Fiole 100ml	-Balance analytique	(PDA)
-Entonnoirs	-Etuve	-DMSO
-Tubes à essais	-Spectrophotomètre	-NACL
-Boîtes de pétris	-Hydrodistillateur de type	-Ethanol
-Bec benzène	Clvenger	- dichlorométhane
-Micropipettes	- Ph mètre	- méthanol.
-Pipettes pasteures	- Réfrigérons	- 2-propanol
- Erlenmeyer		
- Burette		

II-2-Matériels biologiques

La plante utilisée dans ce travail se trouve sur le marché tout au long de l'année, pour son importance majeure et son usage quotidien dans la cuisine Algérienne ou en médecine traditionnelle.

On utilise les boutons floraux ou « clous de girofle » Les boutons floraux très caractéristiques sont en forme de clou, brun rouge. L'odeur est aromatique caractéristique, la saveur est brûlante. Le clou comporte une partie quadrangulaire, l'hypanthe, longue de 08 à 10 mm pour un diamètre de 2–3 mm (correspondant à l'ovaire infère) et une « tête » renflée, globuleuse (2–4 mm de diamètre), entourée par les quatre lobes divergents des sépales et constituée de quatre pétales imbriqués.



III- Méthodes :

III-1-Hydrodistillation

III-1-1-L'Appareil d'extraction :

L'extraction de l'huile essentielle de clou de girofle a été faite par un hydro-distillateur de type Clevenger (1928). Il est constitué d'une chauffe à plaque, un ballon et un chauffe ballon où l'on place le matériel végétal et de l'eau de robine, d'une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement de ballon et une ampoule à décanter qui reçoit les extraits de la distillation[42].

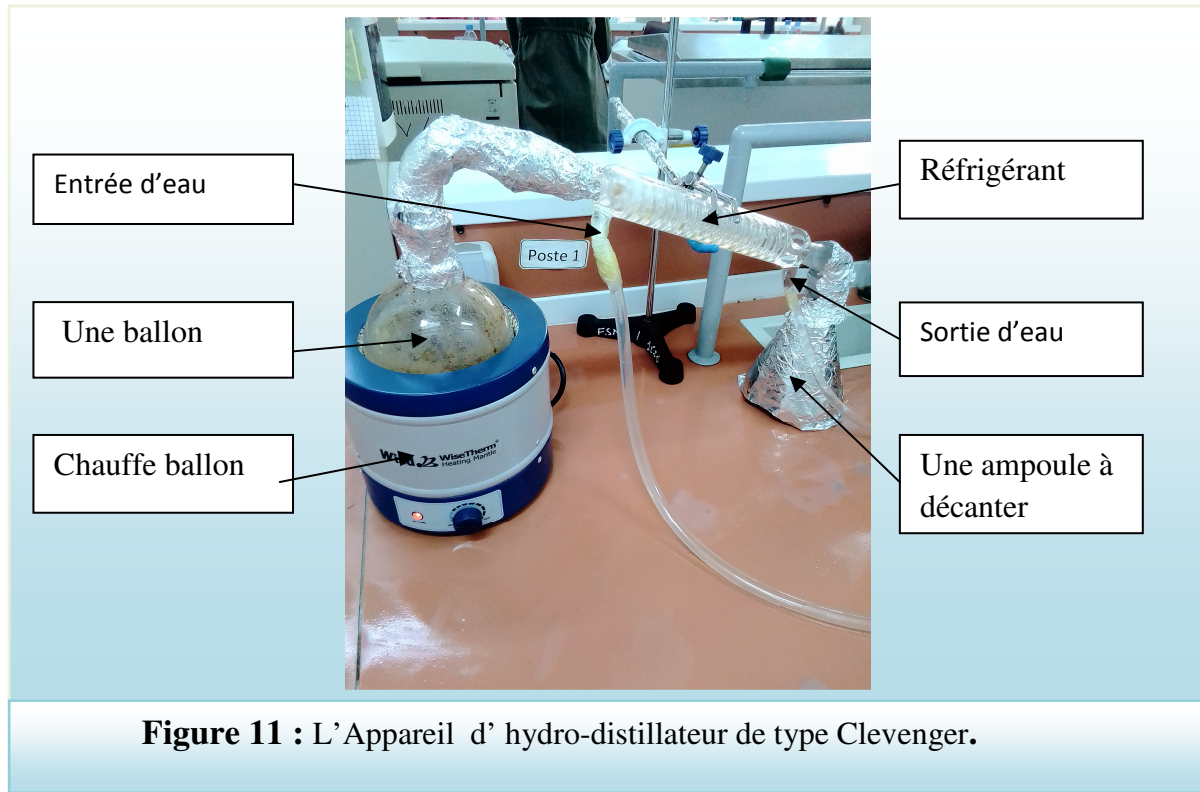


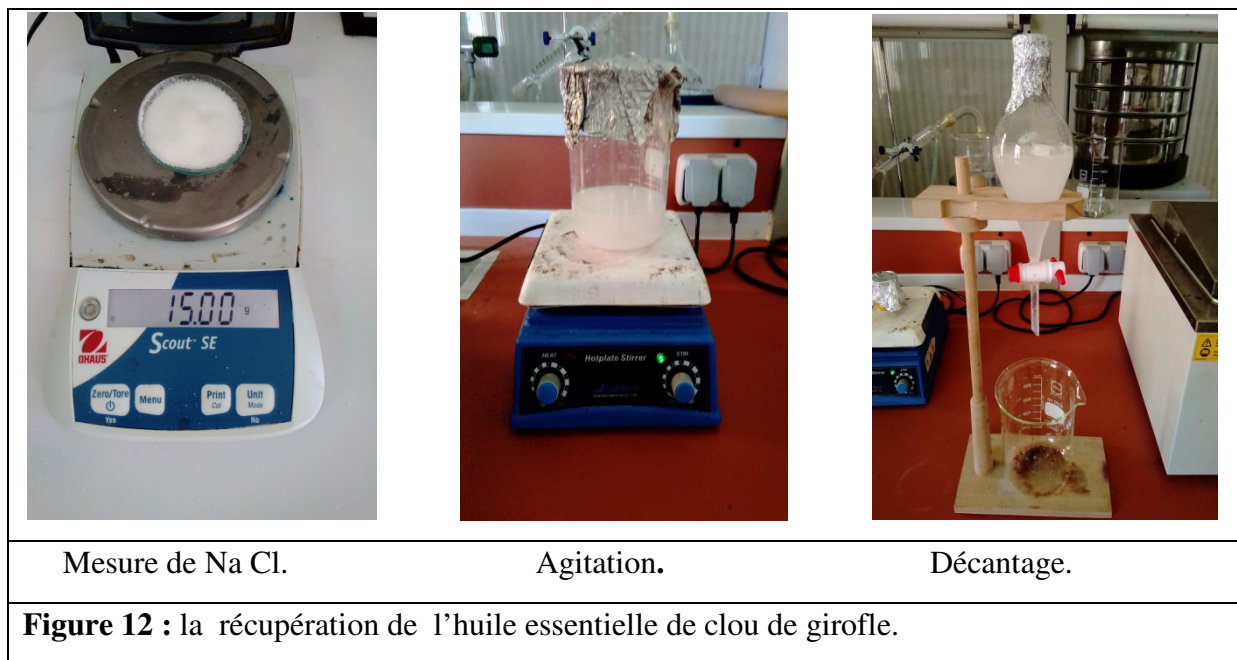
Figure 11 : L'Appareil d'hydro-distillateur de type Clevenger.

III-1-2-Le principe et Procédés d'extraction :

L'opération a consisté à introduire 50 g de masse végétale séchée et broyée dans un ballon Bicol de 1000mL en verre, on a ajouté une quantité suffisante d'eau distillée environ 500mL sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition.

- ❖ Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon.
- ❖ Les vapeurs chargées d'huile essentielle sont passés à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation.
- ❖ Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée
- ❖ L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition Il est en général formé de 2 liquides non miscibles encore appelés phase, la phase aqueuse la plus abondante, est constituée d'eau dans laquelle sont dissoute très peu d'espèces odorantes, la phase organique (l'huile essentielle) est constituée des espèces odorantes.
- ❖ Traiter l'huile par un déshydratant, le chlorure de sodium Na Cl car la solubilité de l'huile essentielle du clou de girofle étant moins importante dans l'eau salée que dans l'eau.

- ❖ Notre huile essentielle est très soluble dans le dichlorométhane, c'est pourquoi dans une ampoule à décanter on a versé 15ml du dichlorométhane et agiter en effectuant, de temps à autre, un dégazage et on a laissé décanter afin de récupérer à la fin l'huile essentielle.



III-1-3-La conservation de l'huile essentielle:

La conservation de l'huile essentielle exige certaines précautions indispensables. Une fois l'huile essentielle est obtenue, elle est conservée dans un flacon en verre enveloppé de papier aluminium fermé hermétiquement, à une température comprise entre 4 et 6 °C pour la préserver de l'air et de la lumière et éviter toute dégradation[43].

III-2- Préparation des extraits de Clous de girofle par macération :

L'extraction par macération est une extraction à froid par contact entre le support solide et le solvant et la séparation se fait par filtration, elle consiste à prendre 30 g de poudre et les macérés dans 300 ml de méthanol. Alors les solutions ont été versées dans un erlenmeyer et ont été mis dans un agitateur pendant 24 heures (Figure 15), la filtration est ensuite effectuée sous vide à l'aide d'une fiole à vide et un entonnoir[44]. Le filtrat recueilli est soumis à une évaporation sous vide dans un rota-vapeur muni d'une pompe à vide pour éliminer le méthanol jusqu'à ce que le volume de chaque solution atteigne 30 ml (ajustées à un niveau

standard 1 g dans 10ml), ce mélange constitue l'extrait brut à tester. Les solutions ont été versées dans le flacon, numérotées et stocké à 4°C[45].

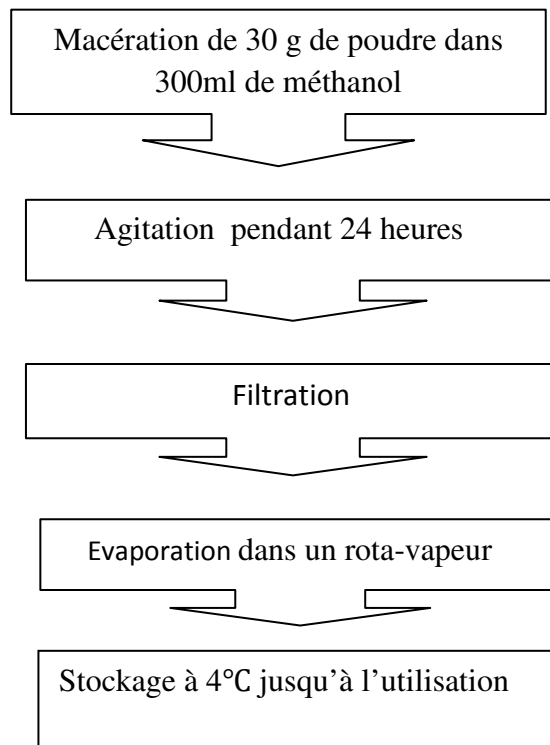


Figure 13: les étapes appliquées pour l'extraction par macération de l'extrait brut.



Figure14 : Agitation de la solution.



Figure15 : la filtration de

III-4-Les analyses de l'huile essentielle et l'extrait du plant

III-4-1-L'analyse physique

III-4-1-1- Le rendement :

Le rendement en l'huile essentielle au l'extrait est le rapport entre le poids de ces produit et le poids de la plante à traiter. Le rendement est calculé comme suit :

$$R\% = M'/M.100$$

R% : rendement de produit des clous de girofle ;

M' : masse de produit obtenue en gramme ;

M : masse des clous de girofle broyés en gramme.

III-4-1-2- La mesure de pH :

Le pH l'abréviation de potentiel d'hydrogène mesure l'activité chimique des ions Hydrogènes (H+) (appelés aussi couramment protons) en solution. Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution.

Il s'agit d'un coefficient Permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre : elle est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7.

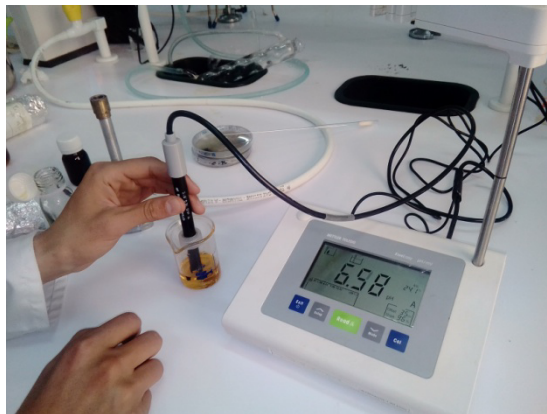


Figure16 : mesure de PH

III-4-2 L'analyse chimique :**III-4-2-1-Chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) :**

Ces deux études ont été réalisées au laboratoire de recherche CRD de Boumerdès et au laboratoire de Microbiologie alimentaire du département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques de l'Université D'Akli Mohand Oulhadj à Bouira.

Notre travail expérimental a porté sur l'identification des composants chimiques qui peuvent être responsables des propriétés antimicrobiennes de l'huile et extrait brut de clou de girofle et d'évaluer l'activité antifongique de cette huile sur cinq souches fongiques.

III-4-2-1- 1-Appareillage

Un Système de chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) de model YL9100 a été utilisé.

- ❖ Notre appareil d' HPLC est Composé de;
 - Réservoirs de solvants (phase mobile).
 - Dégazeur (évite les bulles d'air) de model YL9101.
 - Système d'injection.
 - Pompe de model YL9110.
 - Détecteur UV de model YL9120.

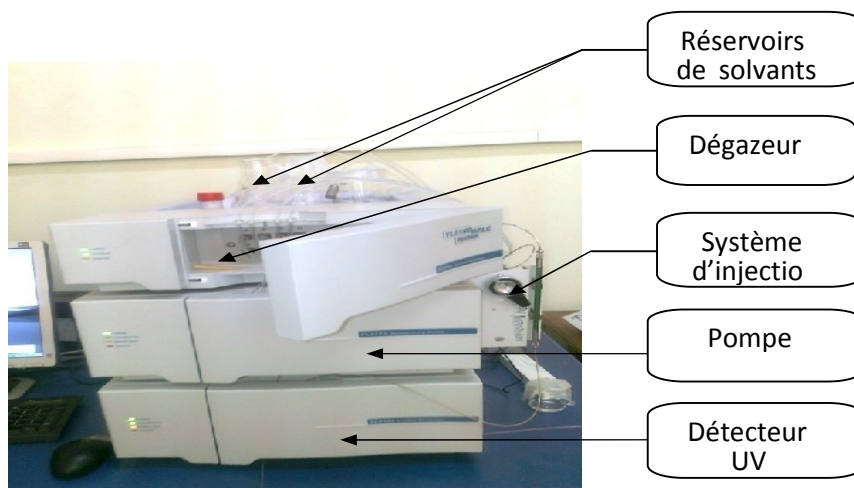


Figure 17 :Photo personnelle; Appareil d'HPLC.

- ❖ Le système d'HPLC est équipé d'un enregistreur et d'une imprimante.



Figure 18 : Photo personnelle; Système d'HPLC.

- ❖ **Colonne**

Une colonne d'HPLC C18 (125) apolaire en silice (150 mm x 4,6 mm, dimension particulaire 5 μ m), de model S/N H10-065 a été employée.

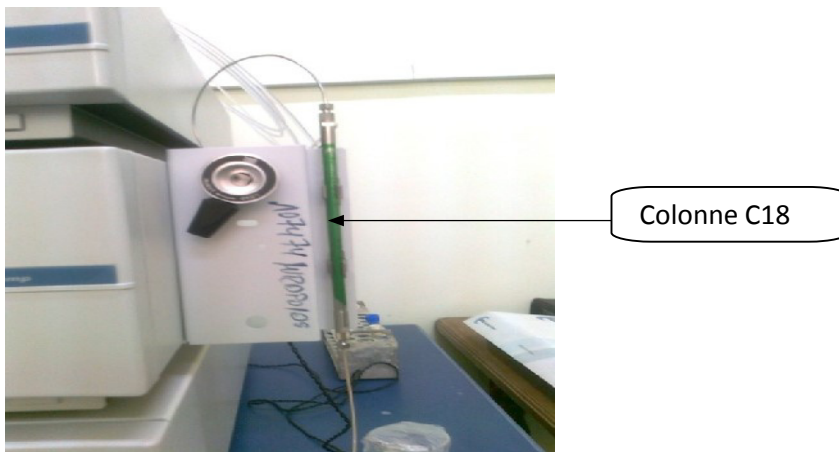


Figure 19 :Photo personnelle; Colonne d'HPLC C18 (125).

III-4-2-1- 2-Méthode de l'analyse d'HPLC

Cette analyse d'HPLC à été entreprise pour déterminer qualitativement et quantitativement les constituants de l'huile de clou de girofle.

A-Conditions chromatographiques

Les différentes conditions chromatographiques utilisés dans notre analyse d'HPLC de l'huile, sont mentionnées dans le tableau N°02.

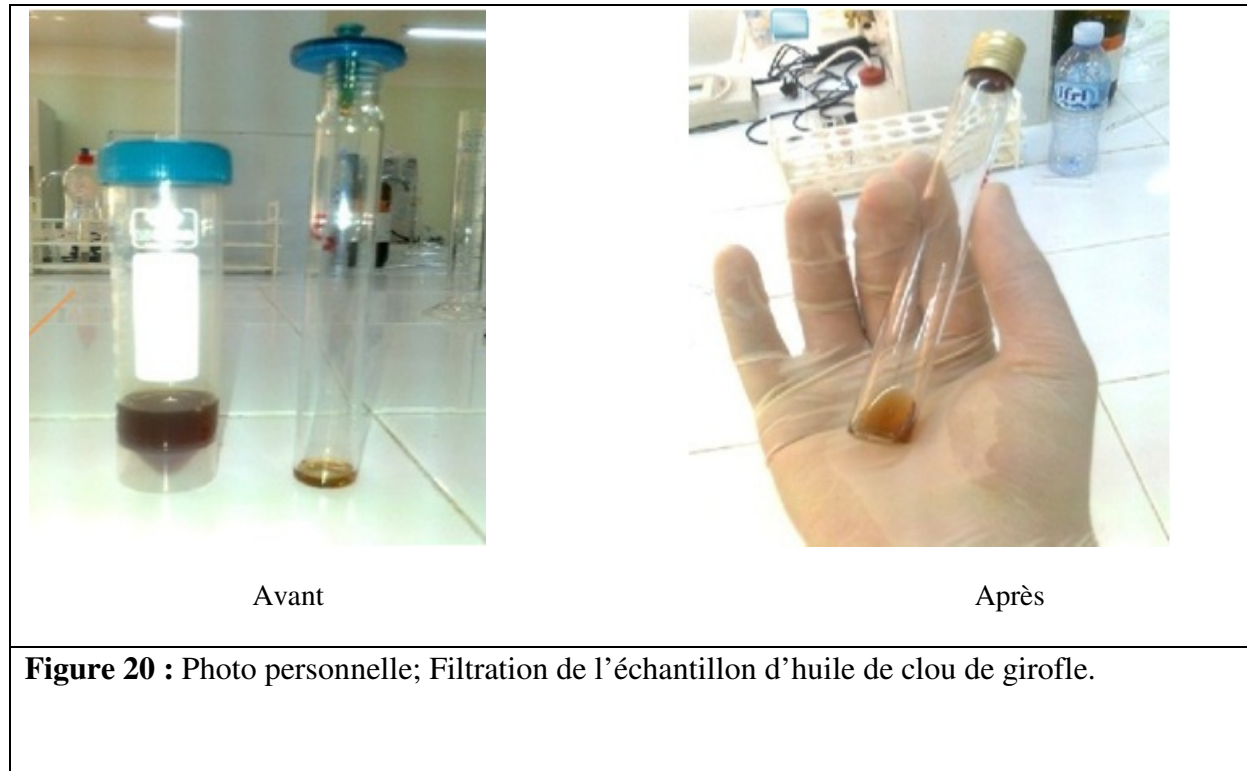
Tableau 03: Les conditions chromatographiques utilisés.

Conditions chromatographiques	
Phase stationnaire	Colonne d'HPLC type silice greffé C18 (125) apolaire (150 x 4,6 mm, dimension particulaire 5 µm).
Phase mobile	L'eau filtrée : méthanol : 2-propanol (50x2 : 45 x 2 : 5 x 2 % v /v), à un débit de 1 ml /min.
Débit de phase mobile	1 ml /min.
Echantillon injecté	20 µl d'huile de clou de girofle filtrée.
Nombre de pompes utilisées	Une seule pompe
Température d'injecteur	Systématique à 35C°.
Température de colonne	/
Température du détecteur	/

B-préparation de l'échantillon d'huile

L'échantillon d'huile de clou de girofle a été filtré, on appliquant un Microfiltre MILLIPORE (0,2 µm, unité de filtration 5 bars).

A l'aide d'une seringue, On exerce une pression de 5 bars sur l'échantillon d'huile, 5 min après l'échantillon d'huile a été purifié de ses impuretés.



C-Préparation de la phase mobile

Après avoir filtré l'eau par un système Millipore. Nous avons versé 100ml de cette eau ultra pure dans une éprouvette graduée.

Dans une autre éprouvette graduée nous avons mis 90ml de méthanol, puis à l'aide d'une pipette nous avons ajouté 10ml de 2-propanol ensuite, nous avons mis l'ensemble des trois solvants (l'eau filtrée, méthanol, 2-propanol) 200 ml dans un flacon que nous avons agité pour obtenir un solvant homogène de phase mobile.

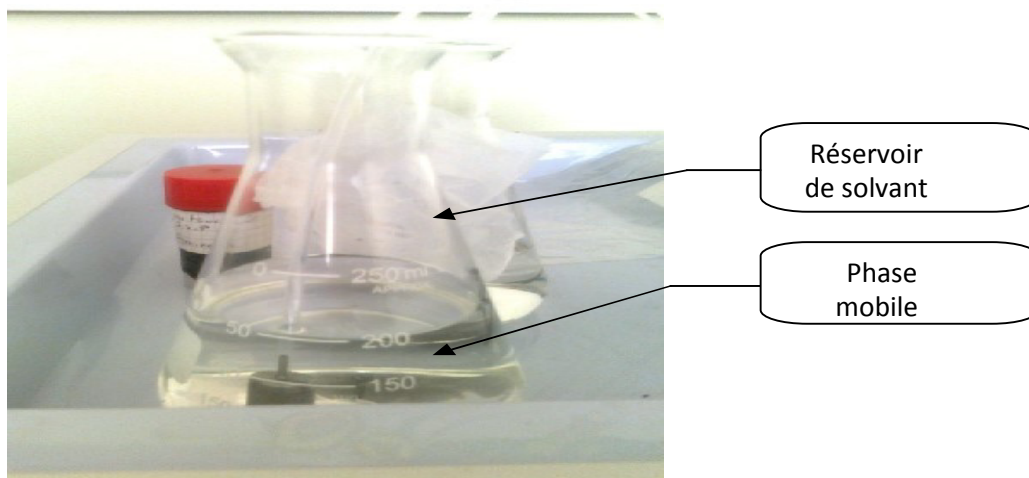


Figure 21 : Photo personnelle; Phase mobile utilisé (Eau filtrée, méthanol, 2-propanol).

D-Mise en marche du système d'HPLC

Après avoir allumé le système d'HPLC, nous avons placé un piston de la pompe au fond du réservoir de La phase mobile.

Puis à l'aide du logiciel YL Clarity de l'appareil d'HPLC nous avons inséré les conditions chromatographiques suivantes:

- 1) Nombre de pompes utilisées : 1
- 2) Type de colonne (PS) : C18 125
- 3) phase mobile utilisée : méthanol /Eau /2-propanol
- 4) Débit de la phase mobile : 1 ml /min
- 5) Volume d'échantillon éjecté : 20 μ l
- 6) Détection UV: 294 nm
- 7) Temps limite de détection : 25 min

On utilisant une seringue d'HPLC, nous avons extrait 20 μ l d'huile filtrée de clou de girofle que nous avons mise dans le dispositif d'injection de l'appareil d'HPLC (**chargé** puis **injecté**).

E-Chargement (remplissage)

Nous avons introduit l'aiguille de la seringue dans le septum du dispositif d'injection.

Puis nous avons rempli la boucle avec l'échantillon contenu dans cette seringue dont le trop plein à été rejeté vers l'extérieur.

Pendant cette étape, la phase mobile circule en permanence sur la colonne Poussée par la pompe sous haute pression.

A ce stade, la seringue est retirée du dispositif d'injection.

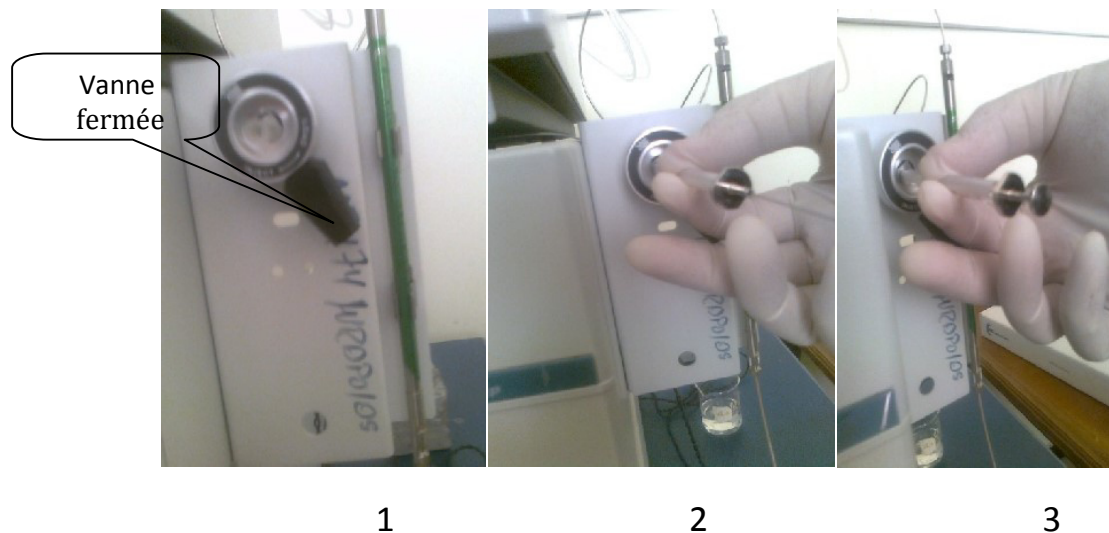


Figure 22 : Photos personnelles; Phase de chargement de la boucle.

F-Injection de l'échantillon

Le contenu de la boucle est injecté, en tournant la vanne d'injection (figure16), la phase mobile est mise en contact avec la boucle et la colonne.

Au cours de cette étape, l'échantillon est véhiculé sur le système chromatographique à l'aide de la phase mobile.

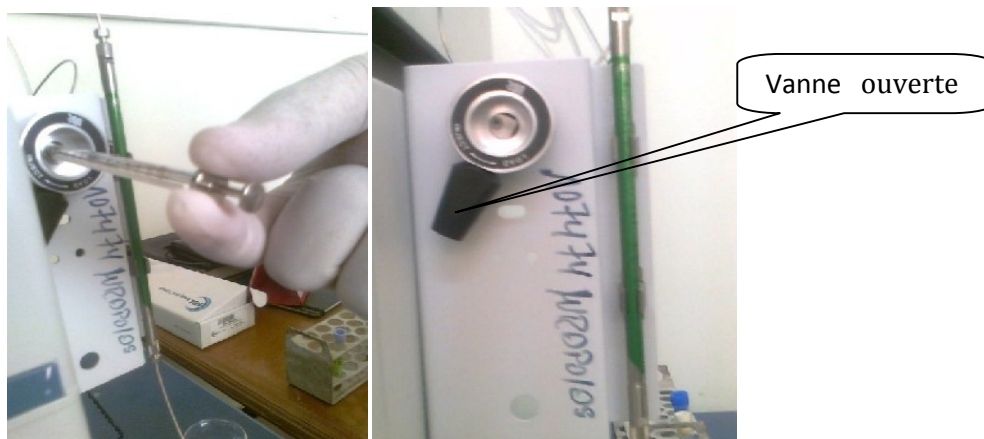


Figure 23 : Photos personnelles; Phase d'injection de l'échantillon.

- On patiente pendant 25 min pour l'analyse d'HPLC.
- A leurs sorties de la colonne et grâce au détecteur UV les différents solutés de l'échantillon sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.
- A la fin du temps de détection, on obtient un chromatogramme complet.

- A l'aide de notre logiciel, nous avons modifié le chromatogramme, en supprimant les bruits de fond.
- Puis nous avons limité chaque pic principal avec deux traits, pour permettre au logiciel de mesurer les surfaces et les hauteurs de ces derniers.
- Enfin on ferme la vanne d'injection et on imprime les résultats de l'analyse d'HPLC.

III-5-Evaluation de l'activité antifongique :

La multi résistance microbienne pose de grands problèmes au niveau de la santé publique. En fait, il ne reste que peu d'agents antimicrobiens effectifs contre certains microbes multi résistants. Les scientifiques sont donc à la recherche de nouveaux produits antimicrobiens. Cette recherche a évalué l'activité antimicrobienne de substances naturelles provenant des plants (nous avons utilisé dans notre étude les huiles et les extraits des clous de girofle).

III-5-1-Les souches fongiques testées :

L'activité antifongique des extraits de la plante a été étudiée en utilisant des souches repiquées par le Laboratoire Microbiologie, département de Biologie université du Boumerdès. Le nombre des souches fongiques testées lors de notre étude est 5 souches qui sont :

- *Aspergillus parasiticus*.
- *Aspergillus flavus*.
- *Aspergillus carbonarius*.
- *Aspergillus niger*
- *Penicillium sp.*

III-5-2- Repiquage des germes :

L'activité antifongique des extraits de la plante a été étudiée en utilisant des souches repiquées par le Laboratoire Microbiologie, département de Biologie université du boumerdès.

Les différentes souches fongiques ont été repiquées sur gélose nutritive en boîtes de pétri (90 mm) par la méthode des stries, puis incubées à 25°C pendant 4 à 7 jours afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation d'inoculum.

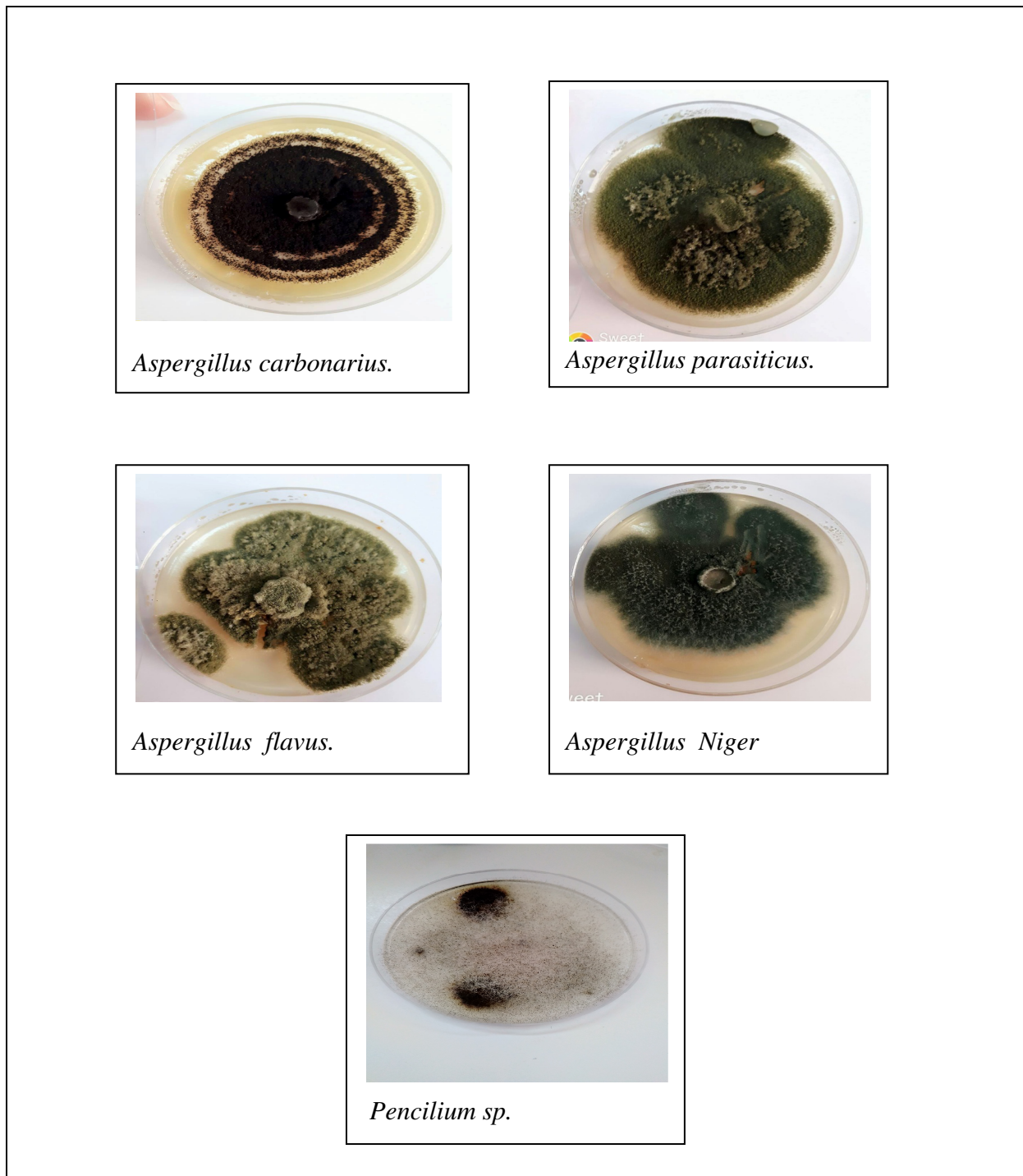


Figure 24 : Aspects macroscopiques des souches après 7 jours d'incubation sur milieu PDA.

III-5-3-Méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits) :

C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antimicrobien, elle est aussi appelée : la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs.

Des boîtes de Pétri contenant du milieu potata dextrose agar(PDA) pour les champignons sontensemencées aseptiquement par une suspension qui provient d'une culture jeune de champignons, L'ensemencement se fait par écouvillonnage, Après le séchage des boîtes, la gélose est perforée au centre à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur. Les cavités ainsi formées sont remplies de la solution aqueuse.

Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 25°C pendant 4 à 7 jour

L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions.

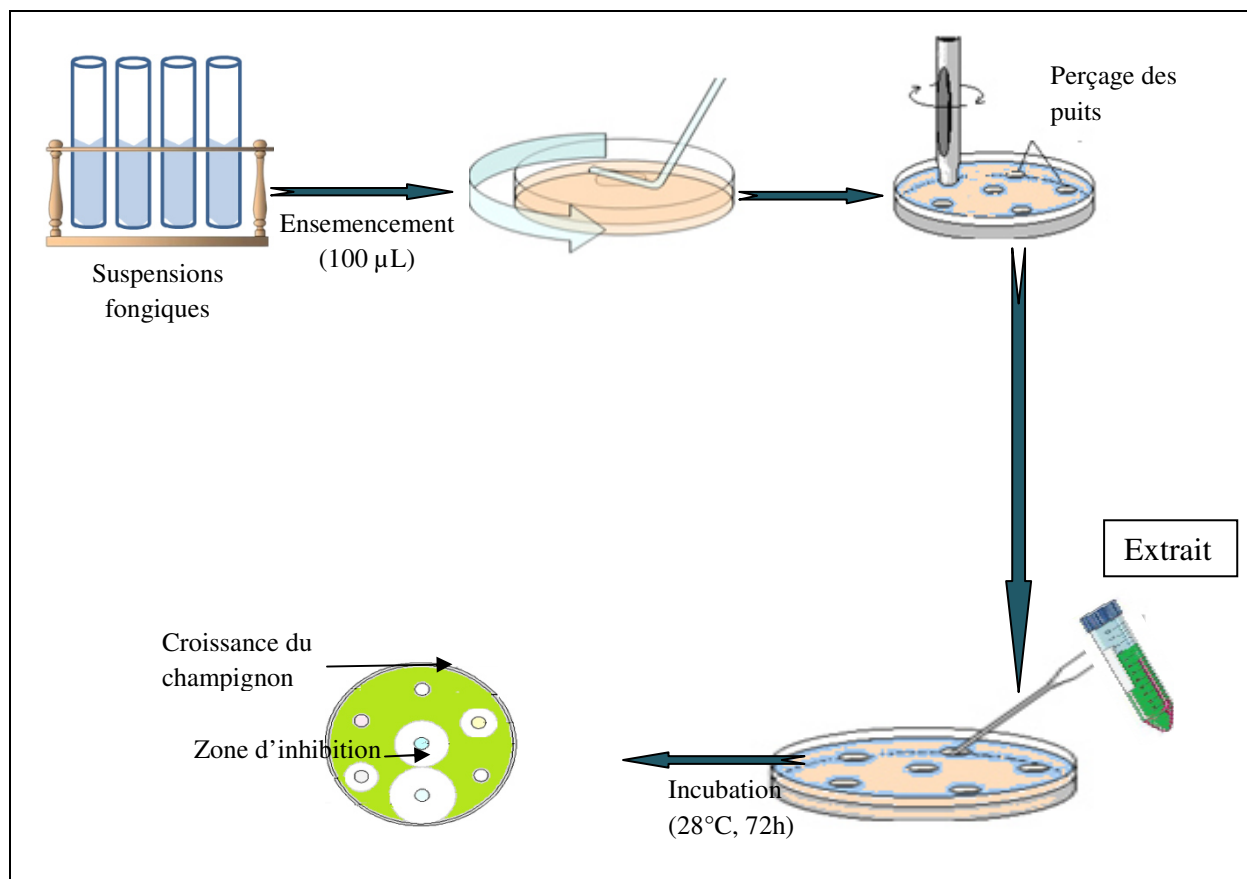


Figure 25 : Schéma des différentes étapes de la réalisation du test antifongique.

III-5-4-Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide :

Cette méthode permet la détermination de la CMI à partir d'une gamme de concentrations de la substance antimicrobienne en milieu solide. Les essais de détermination de la CMI sont effectués selon la méthode de dilution standard

Le but des méthodes de dilution est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance des espèces fongique[46].

III-5-4-1-Préparation de dilution des huiles :

Préparation des dilutions de l'HE On prépare 4 tubes en verre stériles (1/2,1/4,1/8,1/16) ; le premier contient 500µl de DMSO et 500 µl des huiles .On ajoute dans le deuxième tube (1/4) 500 µl du premier tube (1/2) et 500 µl DMSO, agité bien. On répète le procédé jusqu'on terminé Comme le montre dans la figure suivant :

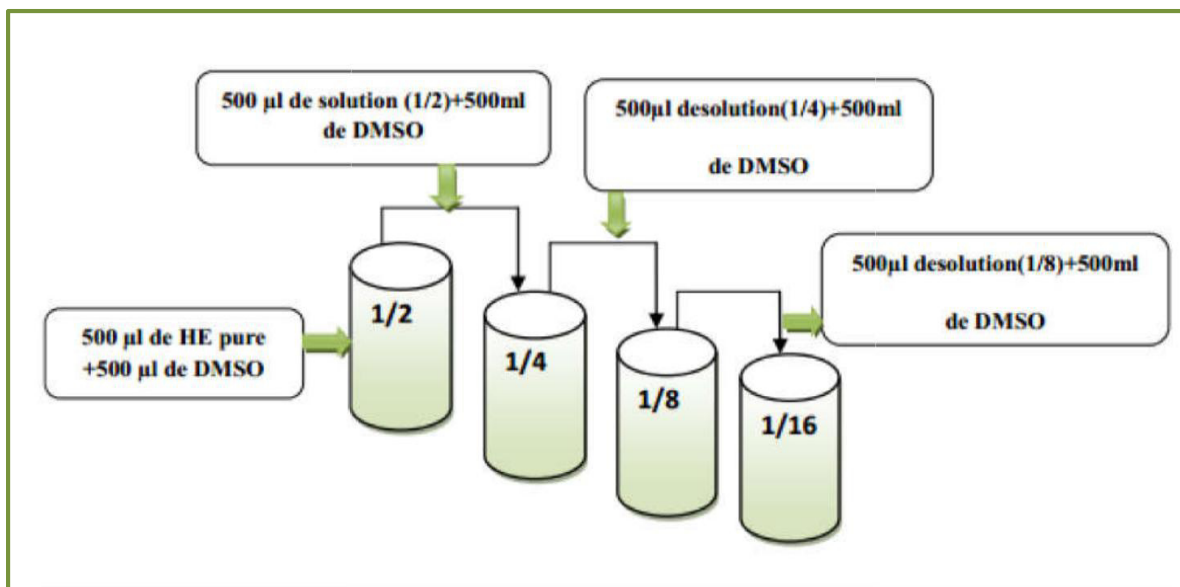


Figure 26 : préparation des dilutions de l'huile essentielle de clou de girofle

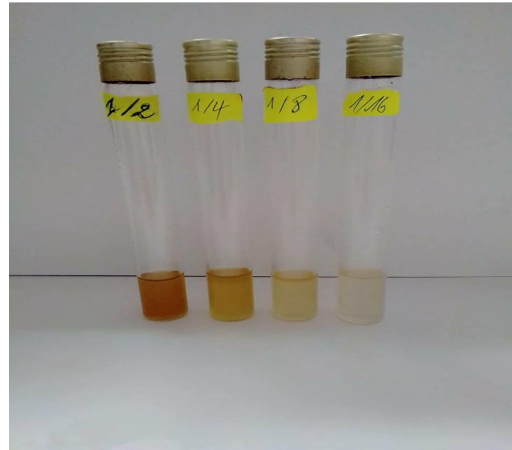


Figure27: Les dilutions de l'huile.

III-5-5-Préparation de l'inoculum :

A partir des boîtes contenant les germes pathogènes on a préparé des suspensions pour chaque espèce. A l'aide d'une pipette pasteur on prélève deux ou trois colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérilisée. La suspension a été bien homogénéisée dans le vortex pendant quelques secondes.

Pour que le dénombrement soit précis, on utilise la méthode spectrophotométrique. La concentration est déterminée en mesurant l'absorbance à 530 nm. Elle correspond à une absorbance allant de 0,08 à 0,13. Afin de minimiser le nombre de microorganismes, on procède à une dilution de la suspension jusqu'à 10^{-4} ml.

Tout d'abord, on verse l'inoculum dans la cuve. Cette cuve est placée dans le spectrophotomètre à la longueur d'onde 530 nm devant un blanc qui est l'eau physiologique. Si la densité optique de la suspension mesure de 0,08 à 0,13, cela signifie que le nombre des souches est de 10^6 à 10^8 Cellules/ml.

A la lecture de l'absorbance, si une valeur n'est pas comprise dans l'intervalle prédéfini, on ajuste. Dans le cas où la valeur est supérieure à la valeur maximale on ajoute de l'eau physiologique. Si cette dernière est inférieure à la valeur minimale on ajoute des colonies.

La concentration 10^8 cellules/ml permet d'obtenir des tapis de colonies confluentes suffisamment denses[47].



Figure 28: inoculum de différente souche Fongique.



Figure29 : mesure de DO à l'aide d'une Spectrophotométrie.

III-5-6-Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour l'étude de l'activité antifongique est le PDA (Potata Dextrose Agar ou pomme de terre glucosée et gélosée) acidifié. Une fois préparé, le milieu de culture a été stérilisé par autoclavage. Avant utilisation milieu de culture est fondu dans un bain marie et coulée dans les boites de pétrie, l'épaisseur de la gélose est de 3 mm répartie uniformément dans les boites (Environ 15 ml du milieu préparé dans chaque boîte de Pétri), les géloses sont pré-séchées avant l'emploi.

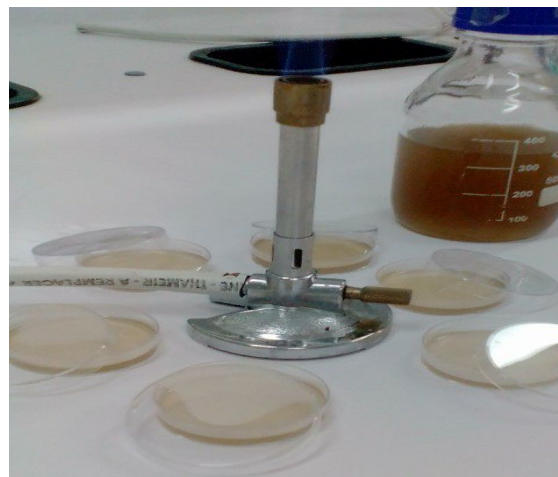


Figure 30 : préparation de boîte pétrie.

III-5-7-Ensemencement :

Les milieux de cultures préalablement préparés, sont ensemencés par étalement à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension fongique déjà préparée. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des souches fongiques sur les milieux.

III-5-8-Incubation et lecture :

Les boîtes sont mises à 4°C pendant deux à quatre heures pour assurer la diffusion des extraits testés dans le milieu ensemencé, puis une incubation dans l'étuve à 27°C pendant 3 à 7 jours. La lecture de l'activité inhibitrice se fait par la mesure des diamètres d'inhibition autour du puits, exprimée en millimètres. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible. Le Classement se fait dans l'une des catégories : sensible ou résistante, la souche ayant un diamètre[48] :



Figure 31 : Mesure des diamètres d'inhibition.

I-Les analyses physiques de l'huile essentielle et de l'extrait brut

I-1. Le rendement:

Le rendement de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation et le rendement de l'extrait bruts obtenu par macération à l'échelle de laboratoire à partir des Clous de girofle est montre dans le tableau suivant :

Tableau 4: Résultat du rendement de l'huile et l'extrait

	Huile essentielles	Extraits bruts	Norme AFNOR
Rendement (%)	2.8	4	Min= 5 Max= 8

Le rendement de extrait brut obtenus par macération et plus grandes que le rendement d'huile essentiel obtenus par hydrodistillation car Le rendement en huile essentiel et de extraits varient suivant diverses conditions : La méthode employée, les parties végétales utilisées et les produits et réactifs utilisés pendant l'extraction, l'environnement, , son origine géographique, la période de récolte de cette plante, le degré de séchage, les conditions de séchage, la température et la durée de séchage, présence de parasites, de virus et mauvaises herbes . En plus cette faiblesse de rendement en H.E est probablement due à une perte d'huile dans la phase aqueuse du distillat et la simplicité de notre dispositif d'hydro- distillation. Lors de l'hydrodistillation, le matériel végétal se trouve immergé dans l'eau qui dissout plusieurs constituants de l'huile essentielle.

I-2. PH :

Les résultats de la détermination des caractéristiques physiques des ces produit sont montre dans le tableau suivant :

Tableau 05 : Résultat du PH

	Huile essentielles	Extraits bruts	Norme AFNOR
PH	5.9	6.58	Min= 5.5 Max= 7

Selon les analyse, notre ph sont acide (**ph < 7**) ceci est due à la composition chimique des ces produit. Ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes; ce qui permettra à ces huiles essentielles de jouer le rôle de conservateurs dans les produits alimentaires.

Nos extaris sont acides donc sont conformes aux normes internationales des huiles essentielles.

II- L'analyse chimique :

II-1.Chromatographie liquide sous haute pression (HPLC):

11-1-1. L'huile essentielle :

L'analyse de l'huileessentielle de S.aromaticum par HPLC a permis d'identifier 26 composés majeurs cites dans le tableau 08 par ordre d'élution. 26 composants représentant la somme des pourcentages des composants obtenus ont été identifiés dont 80,93 % sont des phénols,8,56 % sont des hydrocarbures sesquiterpéniques, 10,48 % des esters et 0,03 % alcoolterpenique.

Les composants majeurs de cette huile sont : Eugenol (80,83 %), acetate eugenyle (10,48 %), β -caryophyllène(7,21 %) et α humulène (0,87 %).

Tableau 06: Concentration en % et temps de rétention des différents composés obtenus par analyse HPLC en phase gazeuse de l'huile essentielle de *S. aromaticum*.

Composé	Temps de rétention (min)	Concentration (%)
Acétate d'eugényl	89,6	10,48
Eugénol	85,3	80,83
β -caryophyllène	53,4	7,21
α -humulène	57,8	0,87
Oxyde de caryophyllène	76,7	0,08
α -cububène	43,4	0,02
α -copoène	46,0	0,03
Isocaryophyllène	51,6	0,02
Aromadendrène	54,2	0,01
α -himachallène	58,8	0,02
Zonarène	57,0	0,02
γ -himachallène	58,8	0,01
Geremacrène	50,4	0,01
β -himachallène	60,9	0,01
Selinadiène isomère	61,2	0,01
α -farnecène	61,9	0,02
Geraniol	67,5	0,03
Calamène	67,6	0,01
Epoxydesesquiterpénique	72,8	0,01
Epoxyde isomère	73,9	0,01
Oxyde de caryophyllène	76,7	0,08
Méthyleugénol	76,9	0,01
Epoxy-6.7 Humulène	79,7	0,01
Sesquiterpénol	79,9	0,01
Cubenol	80,6	0,01
Chavicol	92,7	0,09

III. Activité antifongique

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Ces résistances ont conduits à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part et sans exercer des effets délétères sur la santé humaine. Dans notre travail on a étudié l'activité antifongique des extraits de plants (l'extraits bruts et huiles essentielles de clou de girofle (sec). Ces extraits étudiés se sont avérés non seulement actifs contre les bactéries mais aussi contre les champignons Cette étape constitue une plateforme pour plusieurs applications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle.

III-1. Expression des résultats:

Le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles et d'extrait brut de clou de girofle a été examiné vis à vis du *A.flavus*, *A.niger*, *A.carbonarus*, *A.parasiticus* et *Penicillium* par la technique de contact direct utilisant l'Agar Dextrose de Pomme de terre (PDA) comme milieu de culture. L'utilisation des témoins a favorisé une comparaison juste et fiable de l'effet des huiles essentielles et d'extrait brut contre ces champignons.

L'activité antifongique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance autour des puits contenant la substance inhibitrice testée. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits à l'aide d'une règle (mm). Le diamètre de la zone d'inhibition montre la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits de la plante.

- **Non sensible** (-) ou résistante : diamètre < 8mm
- **Sensible** (+): diamètre compris entre 9 à 14
- **Très sensible** (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm
- **Extrêmement sensible** (+++): diamètre > 20 mm

Les résultats de l'évaluation antifongiques de HE et des extraits de clou de girofle sont repris ci-dessous :(nous avons utilisé le DMSO comme un témoin négative).

Tableau 07 : Evaluation de l'activité antifongique d'extrait et d'huile essentielle de clou de girofle sur différentes Souches testés.

Les Souches	Huile essentielle		Extraits bruts		DMSO	
	Diamètre	sensibilité	Diamètre	sensibilité	Diamètre	Sensibilité
<i>A.flavus</i>	9mm	+	25 mm	+++	0	-
<i>A.niger</i>	10mm	+	31mm	+++	0	-
<i>A.carbonarus</i>	10mm	+	30mm	+++	0	-
<i>A.parasiticus</i>	11mm	+	26mm	+++	0	-
<i>Penicillium</i>	18mm	++	32mm	+++	0	-

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'activité antifongique de l'HE et d'extrait brut sur ces souches sont tout à fait satisfaisants, les diamètres obtenus vont de 9 mm à 18 mm pour huile essentiel et de 25mm à 32mm pour l'extrait brut. L'extrait brut présente la meilleure activité antifongique sur souches testées.

Les extraits obtenus à l'aide de solvants organiques volatils sont plus complets que les huiles essentielles car ils contiennent non seulement les composés volatils mais aussi d'autres constituants qui n'étaient pas entraînés par la vapeur d'eau (triglycérides, cires, colorants de nature lipidique et composés sapides). Notons que le solvant doit être éliminé avec le plus grand soin de manière à ne pas faire disparaître les constituants les plus volatils. Par ailleurs, la plupart des solvants utilisés sont l'objet d'une réglementation stricte dictée par des considérations de santé. En particulier, leur teneur résiduelle dans les aliments doit être inférieure au 1 mg/kg; par ailleurs, seuls les solvants sans risque de toxicité sont autorisés.

III-1-1-Especies Aspergillus :

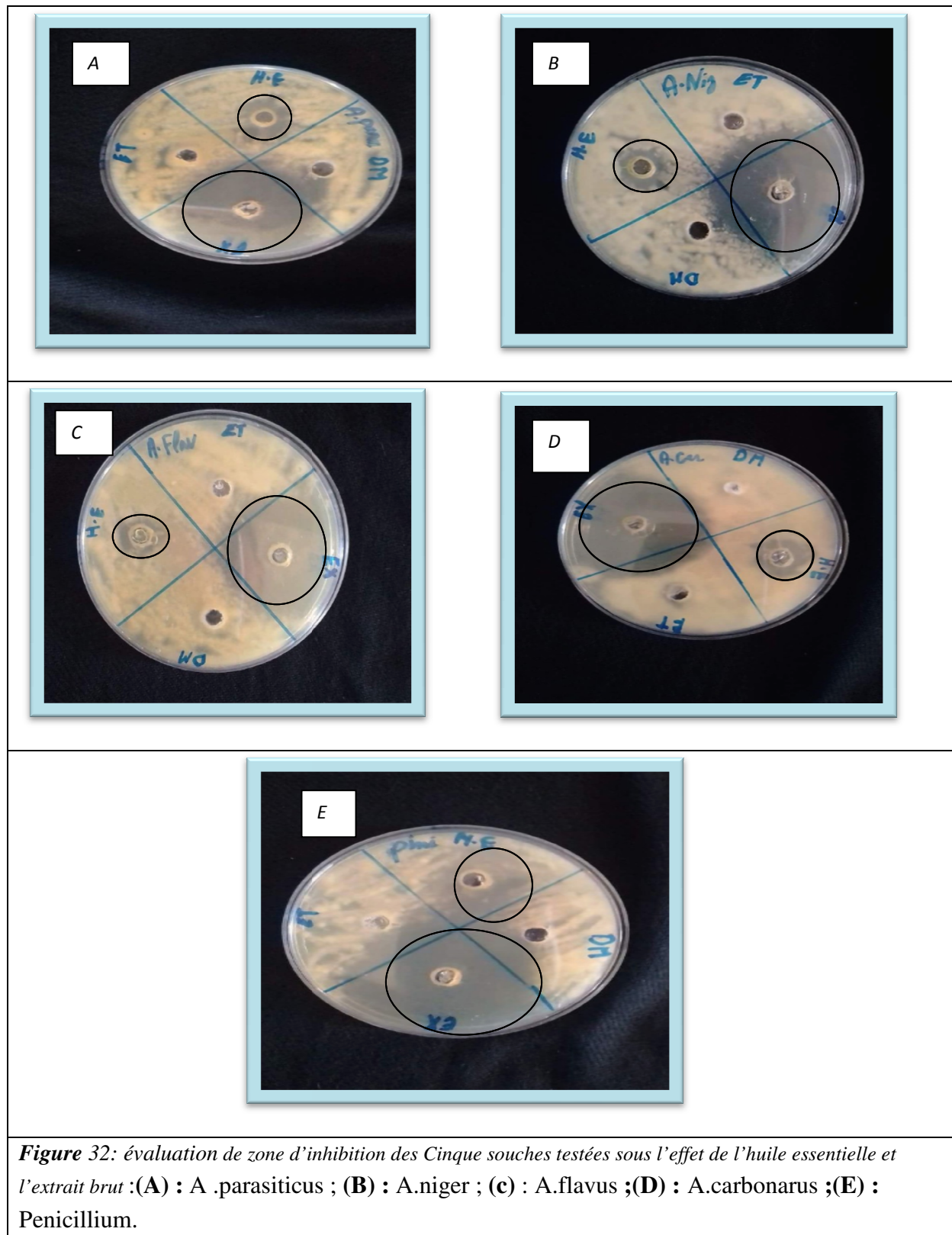
Les résultats obtenus pour toutes les souches *Aspergillus* varient entre HE et l'extrait brut, on remarque une différence entre les diamètres des zones d'inhibition dont la plus grande zone est enregistrée avec l'extrait brut.

Le pouvoir antifongique d'extrait brut le plus élevé a été observé contre *A.niger* dont le diamètre est de 31mm, les autres souches *A.flavus* et *A.parasiticus* et en dernier *A.carbonarus* ont des diamètres des zones d'inhibitions de 25mm, 26mm, 30mm respectivement, ces valeurs obtenus supérieure a 20mm qui nous montre une forte activité d'extrait brut sur les souche fongiques . Tandis que le pouvoir antifongique d'huile essentiel le plus élevé a été remarqué contre *A .parasiticus* dont le daimètre est de 11mm et les autre souches (*A.carbonarus* , *A.niger* et *A.flavus*) ont de diamètre proche varient entre 9mm et 10mm qui montre une sensible de toute les souche fonfique vis-à-vis d' huile essentiel

III-1-2--Penicillium :

Ces souches se sont montrées très sensibles à l'huile essentielle testée puisque les diamètres des zones d'inhibitions sont très importants, ils sont de 18mm. L'extrait brut a une forte activité sur les souches de *penicillium* dont le diamètre est de 32 mm.

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir antimicrobiennes n'est pas le même sachant que les mêmes concentrations d'extraits a été appliquées pour les Cinq souche fongiques. on constate que l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce microbienne, et la nature du produit testé et aussi de milieu de culture utilisé, le témoins (DMSO) n'exercé aucune activité inhibitrice, le colonies se développent normalement en présence de témoins, donc bon diluant pour notre extraite. L'activité antifongique de notre extrait, peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique de cette plante. Le clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre les pathogènes fongiques.



III-2- Détermination de Concentration minimale inhibitrice (CMI) pour huile essentielle :

Il s'agit de déterminer le diamètre d'inhibition et la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La plus faible concentration se traduit par l'inhibition de la croissance visible des souches testées en utilisant la méthode du puits. La méthode de puits a permis de déterminer l'action de l'huile essentielle du clou de girofle dissout et dilué dans le DMSO sur les différentes souches. Celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du puits [49].

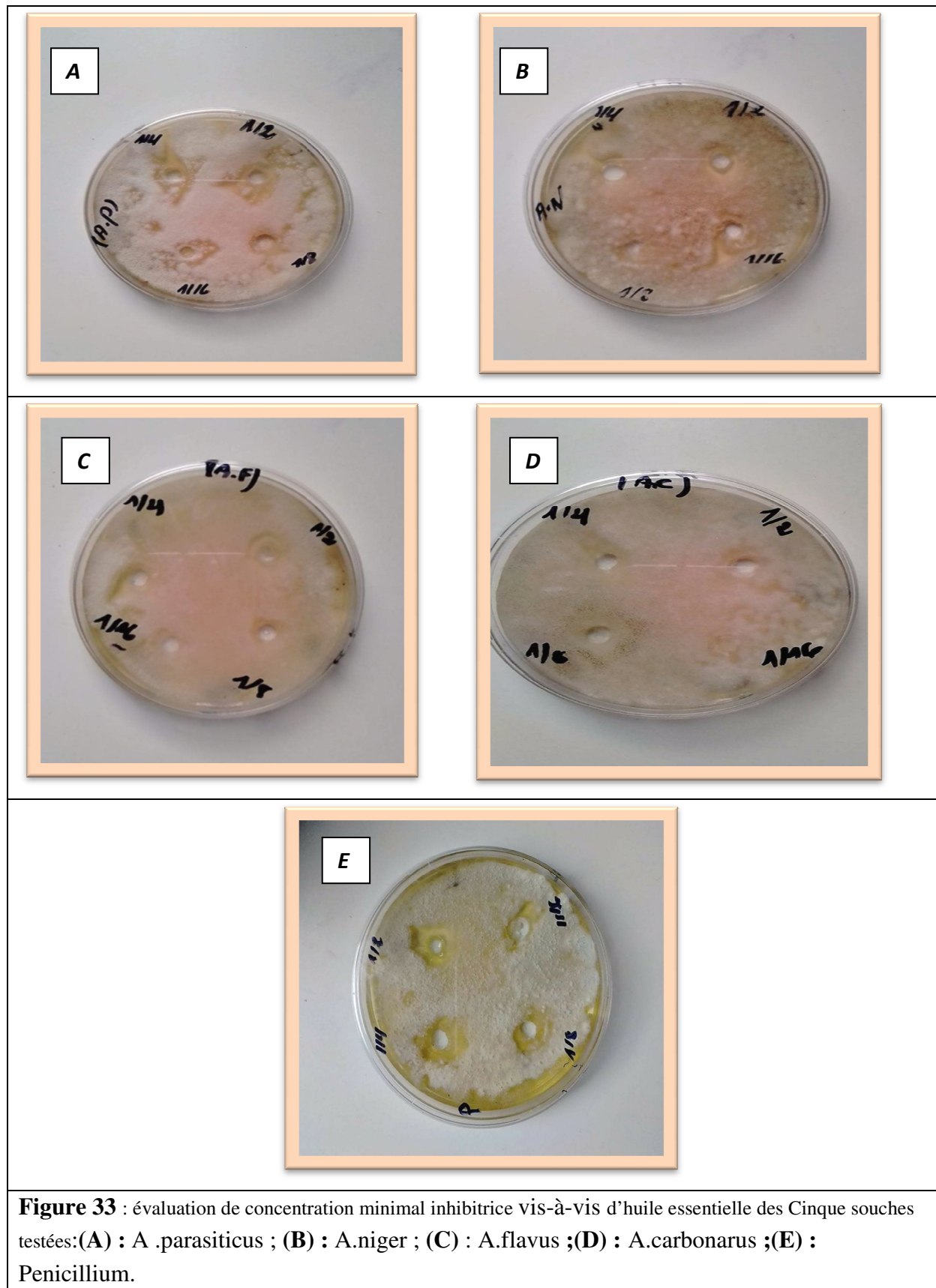
Les résultats de l'évaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont résumés dans le tableau:

Tableau 08: Les CMI d'huile essentielle vis-à-vis des Cinq souches fongiques.

Souches fongiques	Dilution d'huile essentielle (Concentrations (mg/ml))			
	1/2 (25)	1/4 (12,5)	1/8 (6,25)	1/ 16 (3,125)
A.flavus	-	-	+	+
A.niger	-	-	+	+
A.carbonarus	-	-	-	+
A .parasiticus	-	-	+	+
Penicillium	-	-	-	+

(+) : Croissance

(-) : Inhibition



Pour l'évaluation de la CMI, plusieurs dilutions ont été préparées à partir de la solution mère allant de 1/2 jusqu'à 1/16. Les résultats enregistrés dans le tableau montrent qu'aux plus faibles concentrations des 5 souches testées sont montrés une croissance. A partir de la dilution 1/8 la croissance est apparue chez *Aspergillus Niger* et *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* donc la CMI est 1/4 qui correspond de 12.5 mg/ml, alors que pour *Aspergillus carbonarius* et *penicillium* une Croissance est apparue à partir de la dilution 1/16 indique que la CMI de cette dernière est 1/8 qui correspond de 6,25 mg/ml.

D'après les résultats des CMI obtenues on peut dire qu'*aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* ainsi que *Aspergillus parasiticus* présente une sensibilité un peu moins élevée que l'*aspergillus carbonarius* et *penicillium*.

La sensibilité de ces souches aux extraits de huile essentielle de notre plante est peut être due:

-En fonction de nombreux facteurs, notamment la nature et la concentration de l'huile essentielle et leur composition chimique de cette plante qui peuvent être dues à la période de récolte et l'âge de la plante. Ainsi que la souche fongique étudiée.

- A la paroi fongique qui est constitué essentiellement de polysaccharides, exclusives de glucanes liés à la chitine. La chitine dans la paroi forme des micro-fibrilles, ce qui confère une grande résistance au milieu extérieur.

En perspective un développement de recherches effectuées sur cette plante est nécessaire, il serait intéressant dans l'avenir:

- ✓ D'établir un protocole d'extraction plus sélectif.
- ✓ D'élargir cette étude sur d'autres aspects tels que l'activité antivirale antibactérienne contre des souches microbiennes tout en déterminant la CMI, et surtout de caractériser les molécules responsables de ces activités par d'autres techniques.

Utilisées depuis toujours par les civilisations, les plantes ont apporté aide et réconfort aux maux les plus divers. Les huiles essentielles extraites de certaines plantes odoriférantes ont prouvé, à ce même titre, leur valeur inestimable pour la santé. Il faut garder à l'esprit que les HE, comme l'ensemble des plantes médicinales, ont un rôle de médicament, que leur actions thérapeutiques sont souvent puissantes et nécessitent qu'elles soient utilisées de manière appropriée.

L'apparition des souches fongiques résistantes aux traitements chimiques à base de fongicides synthétiques pousse à la recherche d'alternatives plus efficaces et plus sûres. Dans ce cadre, l'objectif de notre travail consistait à étudier les caractéristiques physicochimiques et biologiques et l'activité antifongique de l'huile essentielle et l'extrait brut de clou de girofle sur la croissance de différentes souches fongiques.

Les résultats obtenus indiquent que le rendement d'extraction de l'huile essentielle par hydro distillation est de 2.8% et 4% pour l'extrait brut pour la cinétique d'extraction a montré que la quasi- totalité de l'huile essentielle est extraite au bout des 80 premières minutes.

L'analyse de la composition chimique par HPLC a permis d'identifier 26 composants.

Pour la mise en évidence de l'activité antifongique de l'huile essentielle et l'extrait brut de clou de girofle, il s'est avéré qu'elle possède des activités variables vis à vis les souches tests et que *Penicillium* est le moisissure le plus sensible suivait par *A.niger* , *A.carbonarus*, *A .parasiticus*, *A.flavus* respectivement, donc l'huile essentielle étudiée a présenté une activité fongistatique et fongicide à la fois pour ces genres.

Les résultats montrent que l'extrait du clou de girofle possède une forte activité antifongique représentée avec des diamètres d'inhibition variant entre 25 mm et 32 mm pour les souches fongiques et avec un diamètre de 9 mm à 18 mm pour huile essentielle

L'huile essentielle et l'extrait de clou de girofle mériterait une place importante à l'officine. Des études complémentaires, sur sa toxicité chez l'Homme, pourraient motiver son utilisation dans le cadre de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Annexe 1

Le milieu de culture :

PDA (Potato, Dextrose, Agar) :

- Pomme de terre200 g.
- Agar- agar, gélose ou de gélatine15 g.
- Dextrose ou de sucre blanc de cannes20 g.
- Eau distillée 1000 ml.

Préparation :

1. Dissoudre 20g d'agar-agar dans 300 ml d'eau distillée, homogénéiser la solution.
2. Peser 200g de pomme de terre, éplucher la pomme de terre, mélanger 200g de pomme de terre bien découpé avec 300 ml d'eau distillée, bouillir à 100° C pendant 20 à 25 minutes, ensuite recueillir l'eau de la pomme de terre environ 300 ml.
3. Le 300 ml de l'eau venant de la pomme de terre est mélangé à 300 ml de la solution agar - agar.
4. Ajuster ensuite le volume du mélange au moyen de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.
5. Auto - claver le mélange à la température de 125° C, la pression de 1,4 bar pendant 15 minutes.
6. Sous hotte à flux laminaire, couler la solution obtenue sur des boîtes de Pétri.

Annexe 2

Les *Aspergillus*

Généralités sur le genre *Aspergillus* :

Le nom *Aspergillus* est donné à un genre de champignons imparfaits (Deutéromycètes) qui comprend environ 180 espèces, réparties en 18 sections.

Les formes parfaites (téломorphes) de certaines d'entre elles sont connues, et appartiennent à l'embranchement des Ascomycota (genres *Eurotium* et *Emericella* notamment).

Ce sont des contaminants fréquents de nombreux substrats, tels que les grains et les produits dérivés (farines, aliments composés pour animaux, etc...).

Certains d'entre eux sont pathogènes, et/ou produisent des métabolites toxiques pour les mammifères.

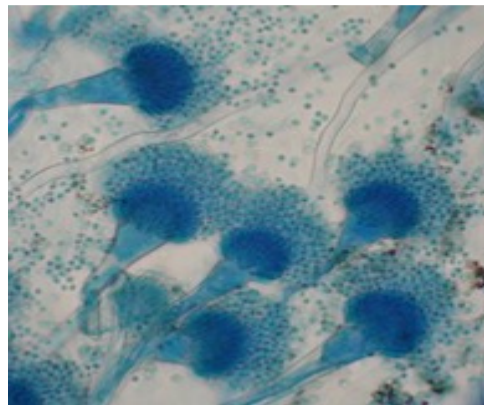


Figure : Conidiophores d'*A. fumigatus*.

Morphologie :

Les *Aspergillus* sont caractérisés par la présence de conidiophores dressés, terminés par une vésicule supportant, soit une seule rangée de phialides (structure unisériée), soit une rangée de phialides et une rangée de cellules sous-jacentes appelées métules (structure bisériée).

Les phialides et les métules sont également dénommées stérigmates.

Les conidies produites en grand nombre par les phialides donnent, à la tête conidienne, un aspect radié si les stérigmates couvrent l'ensemble de la vésicule, ou une apparence en colonne si seule la partie supérieure de celle-ci est fertile.

Annexe 3

Les *Penicillium* :

Généralités sur le genre *Penicillium* :

Le nom *Penicillium* est donné à un genre de champignons imparfaits (Deutéromycètes) qui comprend environ 300 espèces, réparties en quatre sous genres.

Les formes parfaites (téléomorphes) de certaines d'entre elles sont connues, et appartiennent à l'embranchement des Ascomycota (genres *Eupenicillium* et *Talaromyces* notamment).

Ce sont des contaminants fréquents de nombreux substrats, notamment des aliments.

Certains d'entre eux produisent des métabolites toxiques pour les mammifères.

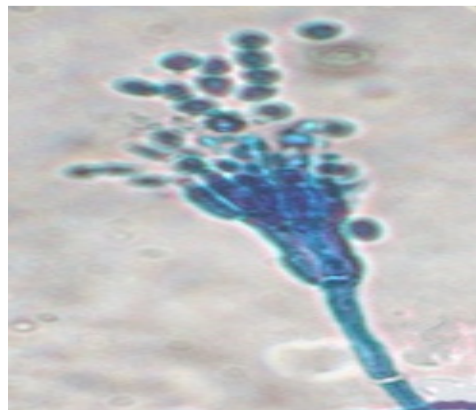


Figure: Conidiophore de *Penicillium*.

Morphologie :

Les *Penicillium* sont caractérisés par la présence de conidiophores dressés, plus ou moins ramifiés, terminés des phialides.

Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Elles sont insérées directement (*Penicillium* monoverticillés) ou par l'intermédiaire d'une rangée de métules (*Penicillium* biverticillés) ou de deux rangées successives de métules (*Penicillium* triverticillés) sur les conidiophores.

Les phialides sont serrées les unes contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau (ou pénicille).

Les conidies produites en grand nombre par les phialides restent en chaîne et contribuent à donner à la tête conidienne un aspect en pinceau.

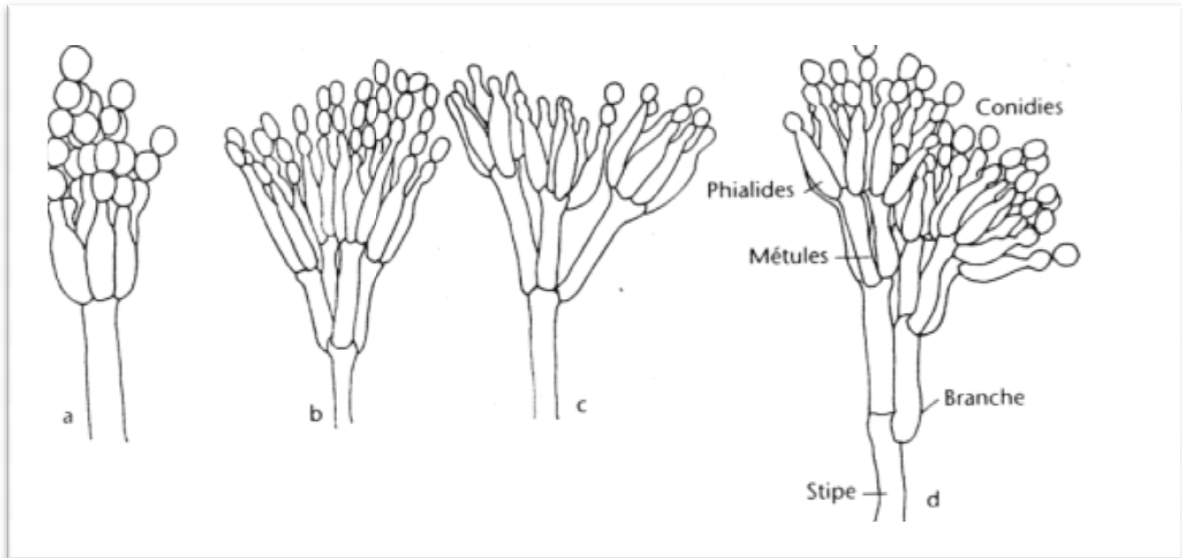


Figure : Caractères morphologiques des Penicillium : (a) ; Pinneau monoverticillé, (b) ; biverticillé, (c) ; biverticillé fourchu (furcatum) (d) ; terverticillé.

Annexe 4

La structure de la paroi fongique :

Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de polysaccharides, de glycoprotéines et de monoprotéines). Les polysaccharides sont majoritairement la chitine, polymère de molécules de N-acétylglucosamine et les glucanes, polymères de molécules de D-glucose. Ces deux polysaccharides assurent la protection des moisissures vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire, les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence et les monoprotéines forment une matrice autour de la paroi.

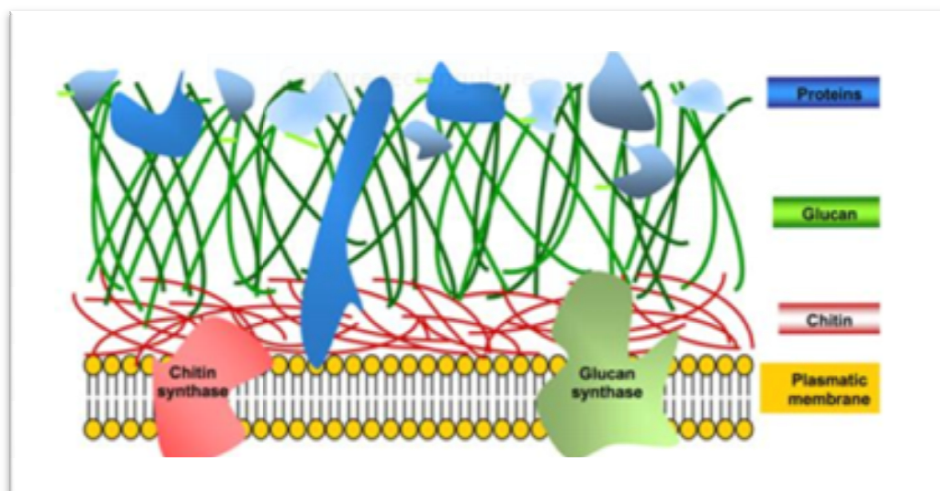


Figure : Schématisation de la structure de la paroi fongique.

Les références :

1. Danthu, P., et al., *Le giroflier à Madagascar: une «success story»... à l'avenir incertain*. Bois et forêts des tropiques, 2014. 35.
2. Kumar, P., et al., *Medicinal, therapeutic and pharmacological effects of Syzygium aromaticum (LAU G)*. 2011.
3. François, E., *Giroflier et Girofle*. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée, 1936. 16(180): p. 589-608.
4. Charles, D.J., *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources* 2013: Springer Science & Business Media.
5. Razafimamonjison, G., et al., *Bud, leaf and stem essential oil composition of Syzygium aromaticum from Madagascar, Indonesia and Zanzibar*. International Journal of Basic and Applied Sciences, 2014. 3(3): p. 224.
6. Ranoarisoa, K.M., *Evolution historique et Etat des lieux de la filière girofle à Madagascar*. 2012.
7. Mazerolles, C., *giroflier*. 2008.
8. Koba, K., et al., *Antibacterial Activities of the Buds Essential Oil of Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry from Togo*. Journal of Biologically Active Products from Nature, 2011. 1(1): p. 42-51.
9. Coquery-Vidrovitch, C. and M.d.q.B.-J.C. . *L'Afrique des routes: histoire de la circulation des hommes, des richesses et des idées à travers le continent africain* 2017: Actes Sud.
10. Perrier de la Bathie, H., *Les Myrtacées utiles de la Région Malgache*. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée, 1952: p. 112-116.
11. Craven, L.A. and E. Biffin, *An infrageneric classification of <I>Syzygium</I> (<I>Myrtaceae</I>)*. Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants, 2010. 55(1): p. 94-99.
12. Ghedira, K., P. Goetz, and R. Le Jeune, *Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier*. Phytothérapie, 2010. 8(1): p. 37-43.
13. Danthu, P., et al., *Le giroflier à Madagascar: une «success story»... à l'avenir incertain*.
14. François, E., *Giroflier et Girofle*. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée, 1936: p. 589-608.

15. Leroy, J.-F., *Le Giroflier et les Plantes à parfums*. *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale*, 1946. 26(286): p. 425-429.
16. Lardry, J.-M. and V. Haberkorn, *L'aromathérapie et les huiles essentielles*. *Kinesithérapie, la revue*, 2007. 7(61): p. 14-17.
17. HAMADOU, F. and S. TOUKI, *Extraction, Caractérisation des huiles essentielles des épices: Girofle, Poivre Noir*, 2017.
18. Mohammedi, Z., *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen*. Mémoire de Magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 105p, 2006.
19. Chiasson, H. and N. Beloin, *Les huiles essentielles, des biopesticides" Nouveau genre*. *Bulletin de la Société d'Entomologie du Québec*, 2007. 14(1): p. 3-6.
20. Mr HAMDANI, D., *action des poudres et des huiles de quelques plantes aromatiques sur les paramètres biologiques de la bruche du haricot acanthoscelides obtectus say (coleoptera: buchidae)*, 2012, Université Mouloud Maameri de Tizi Ouzou.
21. BOUCHIKHI TANI, Z., *Lutte contre la bruche du haricot Acanthoscelides obtectus (Coleoptera, Bruchidae) et la mite Tineola bisselliella (Lepidoptera, Tineidae) par des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles*, 2014.
22. Razafimamonjison, G., et al., *Pour l'optimisation de la qualité des produits du giroflier de Madagascar (clous et huiles essentielles): étude des facteurs de leurs variabilités*. 2016.
23. Lobstein, A., F. Couic-Marinier, and S. Barbelet, *Huile essentielle de Clou de girofle*. *Actualités Pharmaceutiques*, 2017. 56(569): p. 59-61.
24. Cortés-Rojas, D.F., C.R.F. de Souza, and W.P. Oliveira, *Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2014. 4(2): p. 90-96.
25. Satrani, B., et al., *Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation fractionnée du bois de Cedrus atlantica Manetti*. *Acta Botanica Gallica*, 2006. 153(1): p. 97-104.
26. Cherif, H., et al., *Identification et caractérisation de quelques composés chimiques chez Aristolochia longa L*. *Agricultura, agricultural practice and science journal*, 2010. 71(3-4).
27. Pirot, R., *Distillation*. 1990.

28. CHEMAT, F. and M.E. LUCCHESI, *Extractions assistées par micro-ondes des huiles essentielles et des extraits aromatiques*. Journal de la Société ouest-africaine de chimie, 2005(20): p. 77-99.
29. Chassaing, V., *L" Aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval*. Violaine Chassaing, 2006: p. 4-8.
30. Després, J., *L'univers des champignons* 2012: Presses de l'Université de Montréal.
31. Adl, S.M., et al., *The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists*. J Eukaryot Microbiol, 2005. 52(5): p. 399-451.
32. France, S.b.d. and C.n.d.l.r. scientifique, *Bulletin de la Société botanique de France* 1854: La Société.
33. Slama, A., et al., *Mucormycose post-traumatique de la face : à propos d'un cas*. Journal de Mycologie Médicale, 2008. 18(2): p. 111-115.
34. Crié, L., *Nouveaux éléments de botanique... contenant l'organographie, l'anatomie, la morphologie, la physiologie, la botanique rurale... et des notions de géographie botanique et de botanique fossile* 1884: O. Doin.
35. Kiffer, E. and M. Morelet, *Les Deutéromycètes: Classification et clés d'identification générique* 1997: Quae.
36. Quequet, C., *Vaincre l'allergie: souffrir n'est plus une fatalité* 2005: Alpen éditions. 42.
37. Roquebert, M.-F., É. Bury, and A. Cazenobe, *Étude des moisissures dans une réserve de bibliothèque*. BULLETIN-BIBLIOTHEQUES DE FRANCE, 2002. 47(6): p. 84-90.
38. Chapeland-Leclerc, F., et al., *Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses)*. Revue Francophone des Laboratoires, 2005. 2005(373): p. 61-66.
39. Reboux, G., *Mycotoxines: effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques*. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 2006. 46(3): p. 208-212.
40. Reboux, G., et al., *Moisissures et habitat: risques pour la santé et espèces impliquées*. Revue française d'allergologie, 2010. 50(8): p. 611-620.
41. CHAREYRON, N., I. George, and F. Vigouroux, *Conservation, manipulation et conditionnement des éléments humains, l'expérience du musée des Confluences*. Cahiers du Musée des Confluences. Études scientifiques, 2012. 3: p. 49-56.
42. De Cliff, S. and P.C. Harerimana, *Extraction de l'Huile Essentielle Complète des Fleurs de Cananga Odorata de la Plaine de l'Imbo: Vers la Vulgarisation d'une*

Nouvelle Filière de Plante Industrielle au Burundi. Revue de l'Université du Burundi-Série Sciences Exactes N° 28, 2013: p. S. De Cliff et PC Harerimana (Extraction de l'huile essentielle...).

43. Tirel, M., et al., *Enquête sur la production d'huile essentielle de girofle : le point de vue des propriétaires d'alambics dans la région de Fénérive-est, 2015, CIRAD: Montpellier, France. p. 46.*
44. Bendahou, M., et al., *Influence of the processes extraction on essential oil of Origanum glandulosum Desf. Journal of Applied Sciences, 2007. 7(8): p. 1152-1157.*
45. Mansourian, A., et al., *The comparative study of antifungal activity of Syzygium aromaticum, Punica granatum and nystatin on Candida albicans; an in vitro study. J Mycol Med, 2014. 24(4): p. e163-8.*
46. Tsirinirindravo, L. and B. Andrianarisoa, *Activités antibactériennes de l'extrait des feuilles de Dalechampia clematidifolia (Euphorbiaceae). International Journal of Biological and Chemical Sciences, 2009. 3(5).*
47. Cavallo, J., et al., *Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 2006, Communiqué.*
48. Soussy, C., et al., *Sensibilité aux antibiotiques de souches d'Escherichia coli isolées en 1998 et 1999: résultats d'une enquête multicentrique française. Médecine et maladies infectieuses, 2000. 30(10): p. 650-656.*
49. *Derbré, S., P. Licznar-Fajardo, and J. Sfeir, Intérêt des huiles essentielles dans les angines à Streptococcus pyogenes. Actualités Pharmaceutiques, 2013. 52(530): p. 46-50.*

Introduction

Générale

Chapitre I

Synthèse

bibliographique

Chapitre II

Matériels et méthodes

Chapitre III

Résultats et discussion.

Conclusion
&
Perspectives

Annexes