



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعرييرج

Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

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

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques.

Spécialité : Microbiologie appliquée.

Intitulé :

**Activité antifongique et antibactérienne des extraits de
clou de girofle.**

Présenté par:

M. BENTOUATI Fateh, M. CHOUCOU Ahmed & M^{elle}. HOUAIRI Nessrine

Soutenu le 24/06/2023 Devant le Jury:

	Nom & Prénom	Grade	Affiliation / institution
Président :	M ^{me} ZERROUG Amina	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadrant :	M ^{me} ABED Hanane	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Examineur :	M ^{me} SOUAGUI Yasmine	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2022/2023

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier ALLAH le Tout-Puissant et le Miséricordieux de nous avoir donné la santé, la volonté, le courage et la patience pour mener à terme notre formation et pourvoir réaliser ce travail de recherche.

Nous tenons à remercier ensuite, les membres du jury :

M^{me}. ZERROUG Amina et M^{me}. SOUAGUI Yasmine

Qui ont bien voulu nous honorer par leur présence et leur lecture attentive de ce mémoire, ainsi que pour les remarques qu'ils nous adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer notre travail.

Nos remerciements s'adressent particulièrement au

Docteur M^{me} ABED Hanane

, pour son encadrement de qualité, sa motivation professionnelle, ses conseils et critiques constructives, ses corrections, sa gentillesse et sa patience ainsi pour le temps qu'elle a consacré à la réalisation de ce travail.

En guise de reconnaissance, nous tenons à remercier, très sincèrement, tous les Professeurs. Nous avons eu l'honneur et la chance de bénéficier de leurs connaissances et compétences, de leurs précieux conseils et de leur suivi tout au long de notre parcours académique.

Nos remerciements vont également à toutes les techniciennes des laboratoires et tous les membres de l'équipe pédagogique du département de « biologie » de l'université de Bordj, qui nous ont ouvert les portes des structures dont ils avaient la responsabilité et qui ont tout mis à notre disposition pour nous permettre de travailler dans les meilleures conditions.

Nous vous remercions infiniment.

Nous voudrions enfin exprimer nos gratitude à nos proches et les remercier de nous avoir soutenus et encouragés et à nos collègues d'études, particulièrement Notre promotion avec qui nous avons partagé de bons moments.

DEDICACE

Je dédie entièrement ce modeste travail

À ma Mère

Qui m'a donné beaucoup de soutien et d'encouragement dès ma naissance, symbolisant pour moi le sacrifice et la source d'où naît la lumière qui éclaire ma vie, et pour qui aucune dédicace n'exprimera la profondeur de mon amour,

je vous adore,

A l'âme de mon père

la personne la plus idéale qui fut dans ce monde, c'est vrai qu'il n'est pas avec nous aujourd'hui, mais, il reste toujours le plus présent. Mon père HAMLAOUI qui a fait de moi ce que je suis.

Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.

À mes frères et sœurs

qui font de mon univers une merveille, je leurs souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

Je leur souhaite, une vie pleine de succès avec beaucoup de bonheur,

À toute la famille

Surtout : Pour leur véritable et sincère amour, pour tout le soutien qu'ils m'apportent.

À mes amis

Moussa, Khalil, Abdelhakim, Ahmed et Nessrine...

Pour les moments forts et agréables que nous avons passé ensemble, à tous ce qui m'aiment et me souhaitent le bonheur et à tous qui ont contribué de près ou de loin

à la réalisation de ce travail et à l'élaboration de ce mémoire.

Enfin, je les remercie tous.

BENTOUATI Fateh

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A MES PARENTS

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

A mon père, j'espère fier de moi

*A ma femme L.A et mes filles Iness et Serine et ma
petite ange Chaïma pour leurs encouragements permanents,
et leur soutien moral.*

A mes frères et sœurs et tous mes proches.

Je te dédie ce travail.

A mes très chers amis ; Fateh, Benhammid et Nessrine

A tous les membres de ma promotion.

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

CHOUCHOU Ahmed.

Dédicace

A Mes chers parents Houairi Saâdi et Houairi Fadila, Quoi que je dise ou que je fasse, je n'arrivai jamais à vous remercier comme il se doit.

C'est grâce à vos encouragements, vos bienveillances et votre présence à mes côtés, que j'ai réussi ce respectueux parcours.

Je souhaite que vous soyez fiers de moi, et que j'ai pu répondre aux espoirs que vous avez fondé en moi.

A mes chers frères et soeurs (Hicham Fares, Assia, Rita ,Assinat , et ma belle-sœur Anna Eltsova)

A mon mari Boutiche Yacine.

Merci pour votre soutien moral, votre confiance et vos précieux conseils, qui m'ont aidé dans les moments difficiles.

Je vous souhaite le bonheur et la réussite dans vos vies.

A toute ma famille et mes collègues (Chouchou Ahmed et Bentouati Fateh)

À travers ses lignes je ne peux pas vous décrire tous mes sentiments d'amour,

le seul mot que je peux dire est merci, vraiment merci beaucoup à toute personne qui a contribué à la réalisation de ce mémoire..

HOUAIRI Nessrine

Table des matières

Remerciement	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Chapitre I : matériels et méthodes	
I.1. Objectif d'étude	06
I.2. Matériels	06
I.2.1. Matériels non biologiques	06
I.2.2. Matériel Biologique	06
I.2.2.1. Matériel végétale	06
I.3. Méthodes.	07
I.3.1. Méthodes d'extraction	07
I.3.1.1. Hydro-distillation	07
I.3.1.2. Analyse physique des huiles essentielles.....	07
A) Le rendement	07
B) La mesure de pH.	08
C) Conservation de l'huile essentielle	08
I.3.1.3. Macération	08
I.3.1.3.1.Macération à froid.....	08
I.3.1.3.2.Macération à chaud	09
I.3.2. Isolement et identification des agents pathogènes	09
I.3.2.1.Isolement des moisissures.....	09
I.3.2.1. Isolement des bactéries	11
I.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne et antifongique.....	11
I.4.1.Activité antifongique	11
I.4.2. Activité antibactérienne	12
I.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	13
I.5.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice fongique (CMI F)	13
I.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice bactérienne (CMI B).....	15
I.5.3. Mise en évidence du pouvoir antifongique volatile.....	16

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1. Résultats et analyse physiques des extraits	18
II.2. Résultats de l'isolement de la flore fongique de la tomate.....	20
II.2 .1.Caractéristiques des souches isolées	20
II.3 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	25
II.3.1. Résultat de l'activité antifongique.....	25
II.3.2. Résultats de l'activité antibactérienne.....	28
II.4. Concentration minimale inhibitrice.....	30
II.4.1. Résultat de la concentration minimale inhibitrice fongiques CMI F.....	30
II.4.2. Résultats de la concentration minimale inhibitrice bactérienne CMI B	34
II.4.3. Résultat de test micro-atmosphère	36
Conclusion	41
Liste des références	42
Annexe	
المخلص	
Résumé	
Abstract	

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristique des extraits18
Tableau 02 : Activité antifongique des extraits, zones d'inhibition (mm)25

Liste des figures

Figure 01 : Les clous de girofle	06
Figure 02 : Protocole de Hydro-distillation.....	07
Figure 03 : A papier pH , B mesure de pH	08
Figure 04 : Expérimentation de macération à froid	09
Figure 05 : Expérimentation de macération à chaud	09
Figure 06 : Echantillons des fruits de tomates infectées.....	10
Figure 07 : Isolement des moisissures sur milieu gélosé PDA	10
Figure 08 : Examen microscopique effectué entre lame et lamelle / scotche	11
Figure 09 : Schéma explicatif de la technique de réalisation du test de sensibilité et l'interprétation de ces résultats.....	12
Figure 10 : Schéma représentatif de la CMI F concentration minimale inhibitrice fongique.	14
Figure 11 : Détermination de la CMI B concentration minimale inhibitrice bactériennes	16
Figure 12 : Activité antifongique par la méthode micro- atmosphère	17
Figure 13 : Les différents extraits du clou de girofle	19
Figure 14 : Les résultats de la mesure de pH	20
Figure 15 : Caractères morphologiques de souche 01	21
Figure 16 : Caractères morphologiques de souche 02	21
Figure 17 : Caractères morphologiques de souche 03.....	22
Figure 18 : Caractères morphologiques de souche 04.....	22
Figure 19 : Caractères morphologiques de souche 05.....	23
Figure 20 : Caractères morphologiques de souche 06 et 07.....	23
Figure 21 : Caractères morphologiques de souche 08.....	24
Figure 22 : Activité antifongique des extraits sur les champignons	26
Figure 23 : Représentation graphique d'activité antibactérienne des extraits.....	28
Figure 24 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis la bactérie B1.....	29
Figure 25 : Représentation graphique de la concentration minimal inhibitrice fongique CMIF de HEs.....	31
Figure 26 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice fongique CMI F	33
Figure 27 : Résultat de la concentration minimale inhibitrice bactérienne CMI B de B1....	35
Figure 28 : Résultat de la concentration minimale inhibitrice bactérienne CMI B de B1	35
Figure 29 : Représentation graphique de l'activité antifongique à la méthode de micro- atmosphère de HEs.	37
Figure 30 : Résultat de test micro-atmosphère.....	38

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius.

% : Pourcentage

Ø : Diamètre

AFNOR : Association française de normalisation.

ATCC : American Type Culture Collection.

A. alternata : *Alternaria alternata*.

A. flavus : *Aspergillus flavus*

A. niger : *Aspergillus niger*

B. cereus : *Bacillus cereus*.

B. cinerea : *Botrytis cinerea*

C. albicans : *Candida albicans*.

B1 : Bactérie isolé

C. albicans : *Candida albicans*.

CG : Clou de girofle.

CGp : Clou de girofle poudre.

CGnb : Clou de girofle non broyé.

Cm : Centimètre.

Cm² : Centimètre carré

CMI B: Concentration minimale inhibitrice bactérienne

CMI F : Concentration minimale inhibitrice fongique

Disp : Distillat poudre.

Disnb : Distillat non broyé.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DTm : Diamètre de témoin

DI : Diamètre de zone d'inhibition

E.coli : *Escherichia coli*.

F. monoliforme : *Fusarium monoliforme*.

g : Gramme

h : Heure.

H⁺ : Proton d'hydrogène

HE : Huile essentielle.

HEp : Huile essentielle poudre

HEnb : Huile essentielle non broyé

Gen : Gentamicine.

J : Jour

L : Litre

M. gypseum : *Microsporium gypseum*

Mchp : Macération à chaud poudre .

Mchnb : Macération à chaud non broyé .

Mfrp : Macération à froid poudre .

Mfrnb : Macération à froid non broyé

MS : La masse de la matière sèche

MHE : La masse d'huile essentiel

µg : Microgramme.

µl : Microlitre

MH : Mueller-Hinton.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mg : Milligramme

mm : Millimètre.

nm : Nanomètre

N° : Numéro.

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

P. citrinum : *Penicillium citrinum*

P. expansum : *Penicillium expansum*

PCA : Plate count agar.

PDA : Potata Dextrose Agar ou pomme de terre glucosée

P/P : Poids sur poids

pH : Potentiel hydrogène.

R : Rendement

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

S. aromaticum : *Syzygium aromaticum*

SDA : Sabouraud d'extorse agar.

SM : Solution mère.

sp : Espèce.

S. typhimurium : *Salmonella typhimurium*.

T. mentagrophyt : *Trichophyton mentagrophyt*

T. rubrum : *Trichophyton rubrum*

Tm- : Témoin négatif

Tm+ : Témoin positif

V/V : Volume sur volume

x40 : Grossissement fois 40



Introduction

Introduction

Depuis longtemps l'homme reconnaît et utilise les plantes pour se nourrir et pour traiter diverses maladies. Depuis toujours, l'homme a eu recours aux plantes pour se maquiller, se parfumer, mais aussi pour se soigner sans connaître réellement les propriétés de ces plantes, ni avoir la moindre connaissance scientifique, même sommaire, expliquant leurs vertus. Ce n'est qu'au moyen âge que les huiles essentielles ont été réellement découvertes grâce aux premières distillations et plus tard, grâce aux progrès de la science et tout particulièrement à l'apparition de la chimie. Cette médecine traditionnelle ancestrale est le précurseur de la phytothérapie et de l'aromathérapie d'aujourd'hui. (Fontanay *et al.*, 2015).

Actuellement, La population mondiale ne cessant de croître, ce qui exerce une pression constante sur la demande alimentaire mondiale. Donc, il est urgent de redoubler d'efforts et d'innover afin d'augmenter durablement la production agricole, d'améliorer la chaîne d'approvisionnement mondiale, de réduire les pertes et le gaspillage alimentaires. (Département des Affaires Économiques et Sociales des Nations Unies)

Ce défi nécessite de transformer les systèmes agro-alimentaires pour les rendre plus productifs, plus efficaces, plus économes en ressources afin de garantir la durabilité de tous les systèmes alimentaires et diminuer les pertes et le gaspillage des produits alimentaires qui sapent les efforts menés pour éradiquer la faim et améliorer la nutrition.

Cependant, Les bioagresseurs entravent ces efforts. Ces organismes vivants attaquent les plantes cultivées pendant leur croissance ou attaquent les produits entreposés et causent de grandes pertes économiques. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), en 2021, environ 14 pour cent des aliments produits sont perdus entre la récolte et la vente au détail à l'échelle mondiale. Ces organismes nuisibles aux végétaux comprennent l'ensemble des ennemis des cultures et se répartissent en trois grandes familles : les agents phytopathogènes (champignons, bactéries, virus principalement), cause des maladies des plantes, les ravageurs animaux (prédateurs ou parasites des plantes) et les adventices « mauvaises herbes » qui concurrencent les plantes cultivées. Ces dégâts peuvent entraîner des dommages qui sont des pertes quantitatives ou une modification qualitative de la récolte. Les dommages de récolte se traduisent généralement par des pertes économiques.

En premier lieu, les intoxications alimentaires et les détériorations causées par des micro-organismes entraînent d'énormes pertes d'aliments et constituent une préoccupation vitale pour la santé publique .Par conséquent, la sécurité alimentaire est une question cruciale pour

les consommateurs ainsi que pour les industries alimentaires. En effet, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 1 personne sur 10 tombe malade chaque année après avoir mangé des aliments contaminés et que 420 000 en meurent (OMS, 2015).

Cette incidence importante de menace d'origine alimentaire associée aux nouvelles implications sociales et économiques entraîne un besoin urgent d'aliments plus sûrs grâce à la mise au point de nouveaux agents de conservation non toxiques ayant d'importantes propriétés antimicrobiennes et anti-oxydantes. C'est pourquoi, de nombreux agents de conservation synthétiques sont utilisés pour contrôler la croissance microbienne dans les aliments, ce qui réduit l'incidence des maladies d'origine alimentaire et prolonge la durée de conservation des produits alimentaires mais leur utilisation est remise en question en raison de préoccupations possibles perçues pour la santé et d'augmentations potentielles de la résistance microbienne. (McDonald et Linde, 2022).

En effet, les produits chimiques synthétiques eux-mêmes, couramment utilisés pour contrôler les souches pathogènes, soulèvent de graves préoccupations liées à la santé humaine (Prakash et *al.*, 2015 et Falleh et *al.*, 2021). Gutiérrez-del-Río et ses collègues (2018). ont signalé qu'une large gamme de conservateurs synthétiques et de traitements physiques antibactériens sont utilisés pour prolonger la durée de conservation des aliments en inhibant la croissance des bactéries pathogènes. De plus, certains aliments nécessitent une protection spéciale contre la détérioration microbienne lors de leur préparation, de leur stockage et de leur distribution afin d'augmenter leur durée de conservation et leurs propriétés organoleptiques, en évitant la détérioration microbienne, qui modifie généralement le goût, l'odeur, la couleur et les propriétés sensorielles ou texturales. Cependant, certains de ces additifs antimicrobiens peuvent altérer les propriétés nutritionnelles d'un aliment donné, comme dans le cas des sulfites qui détruisent la vitamine B1, ou de l'ajout de nitrates à la viande, ce qui rend leur consommation très dangereuse (cancérogène).

En plus, l'autre problème majeur dans la chimiothérapie antimicrobienne est l'apparition croissante de la résistance aux antibiotiques, ce qui conduit à l'insuffisance du traitement antimicrobien. La sur utilisation d'antibiotiques et la pression de sélection des antibiotiques qui en résulte sont considérées comme le facteur le plus important contribuant à l'apparition de différents types de microbes résistants.,(Schelz et *al.*,2006).

Le maintien d'une forte production agricole nécessite de savoir lutter efficacement contre les bio agresseurs des cultures. Premièrement, les champignons phytopathogènes qui sont grâce à certaines caractéristiques de leur potentiel évolutif (comme l'asexualité partielle ou la

multiplicité des cycles d'infection dans une saison épidémique) des organismes capables de s'adapter très rapidement à des modifications de leur environnement (McDonald et Linde, 2022).

Deuxièmement, Les bactéries sont responsables de plusieurs maladies. Leur résistance aux antibiotiques est de plus en plus prononcée. Pour arrêter ce processus de synthèse-résistance, il est nécessaire de chercher une autre approche afin de diminuer ou d'éliminer les affections sans l'utilisation des antibiotiques et des produits synthétiques, donc il est évident de trouver des solutions par l'utilisation des molécules bioactives qui sont à base de plantes (Vlietinck et Vanden Berghe, 1991).

Donc, La situation est davantage plus préoccupante à cause de l'apparition des souches de micro-organismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants. Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de chercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action (Biyiti et *al.*, 2004).

Par conséquent, le développement et l'utilisation d'agents antimicrobiens naturels, sûrs et efficaces sont souhaités. De nombreux produits alimentaires doivent être protégés contre la détérioration microbienne pendant leur durée de conservation. La demande croissante des consommateurs pour des produits sûrs et naturels, sans conservateurs chimiques, a donné lieu à des enquêtes approfondies de la part des autorités alimentaires et des chercheurs pour évaluer la faisabilité de techniques de conservation douces et améliorer la qualité microbienne et la sécurité des produits, tout en maintenant leurs bonnes propriétés nutritionnelles et organoleptiques. (Goni et *al.*, 2009)

Pour ces raisons, on peut trouver de nombreuses plantes aromatiques caractérisées par la biosynthèse d'un large éventail de composés organiques qui semblent n'avoir aucune fonction directe dans la croissance et le développement, et ceux-ci sont nommés métabolites secondaires. Ce sont des molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE).

Dans notre étude, en vue de trouver des méthodes alternatives aux fongicides et aux bactéricides synthétiques qui représentent le moyen de lutte le plus utilisé par les maraîchers, Dans le laboratoire, notre travail se concentre sur l'utilisation de produits naturels respectueux

de l'environnement, comme stratégies de contrôle des maladies. Dans ce contexte, nous proposons d'évaluer les propriétés antimicrobiennes des extraits d'une plante aromatique et leur capacité à contrôler les maladies causées par les phytopathogènes.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser les extraits du giroflier connue par ses effets bénéfiques; son bouton floral (clou de girofle) possède une odeur caractéristique et une saveur chaude et piquante. Cet arbre nommé *Syzygium aromaticum* (*S. aromaticum*) (synonyme : *Eugenia caryophyllata*) communément appelé clou de girofle, est un arbre de taille médiane (8-12 m) de la famille des *Myrtacée* originaire des îles Moluques dans l'est de l'Indonésie. (Kamoto et al.,2012).

Le clou de girofle est utilisé dans la Chine ancienne comme épice et parfum depuis plus de 2000 ans. En médecine, dans le domaine de la phytothérapie orientale et comme épices culinaires. Le bouton floral de la plante est utilisé à la fois pour aromatiser et à partir duquel l'huile essentielle est extraite. Les caractéristiques de son huile essentielle sont la nature volatile et les fortes odeurs aromatiques. Par conséquent, l'huile essentielle de clou de girofle a été largement utilisée en aromathérapie et en cosmétique. Il a également été utilisé comme anesthésique naturel en dentisterie. (Chee et Lee, 2007). pour la première fois en 1640 dans « Pratique de la physique » en France.

Le clou de girofle a été choisi tout particulièrement pour ce projet, car cette épice a une huile essentielle qui est considérée comme un antibactérien puissant à très large spectre, l'un des meilleurs chez les épices. En effet, la plante renferme 15 à 20% d'HE extraite à partir des boutons floraux du giroflier. L'essence renferme 85 à 93 % en volume d'eugénol libre et combinés. Xue et al., (2022). Consiste à extraire l'huile essentielle de cette espèce afin de tester son activité antimicrobienne, son potentiel contre les champignons et les bactéries à Gram positif et à Gram négatif dans divers laboratoires à travers le monde.

Parmi les cultures les plus touchées, la tomate, (*Solanum esculentum* Mill) qui représente l'un des fruits les plus consommés au monde. Cependant, des microorganismes nuisibles constituent de véritables ennemis et entravent le développement de cette culture très importante et menacent ses fruits. Certains agents telluriques phytopathogènes sont responsables d'importantes pertes de récoltes en occasionnant diverses maladies dont : la pourriture des semences, la fonte des semis, la pourriture racinaire et le flétrissement des plantes etc. (Blancard et al., 2009).

Ce travail qui s'inscrit dans cette perspective, est dédié à une plante de la pharmacopée traditionnelle. L'objectif principal est d'évaluer *in vitro* les propriétés antibactériennes et antifongiques des extraits des fleurs de *Syzygium aromaticum* commercialisé au niveau de Bordj Bou Arréridj.

La première partie de ce document est consacrée à la partie expérimentale, à savoir:

- ✓ Extraction des huiles essentielles, macérât à froid, macérât à chaud et distillat à partir des bourgeons de clous de girofle broyé et non broyé;
- ✓ Évaluation de leurs activités antibactériennes et antifongiques;
- ✓ Enfin la deuxième partie présente les résultats obtenus ainsi que leurs discussions



Chapitre I

matériels et méthodes

Chapitre I : matériels et méthodes

I.1. Objectif d'étude

L'objectif de notre travail est de tester *in vitro* l'activité antifongique et antibactérienne de plusieurs extraits de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) à l'égard de certaines champignons et bactéries. Il s'agit d'une étude s'étendant sur une durée de trois mois, réalisée au sein des laboratoires de microbiologie et de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers (Mohamed El Bachir El Ibrahim, Bordj Bou Arreridj).

I.2. Matériel

I.2.1. Matériels non biologiques

L'ensemble de matériels non biologiques utilisé pour réaliser cette étude est résumé dans l'annexe 01

I.2.2. Matériel Biologique

I.2.2.1. Matériel végétale

Des boutons floraux séchés de *Syzygium aromaticum* C.Linné, Merr. & L.M.Perry (famille des *Myrtaceae*), ont été utilisés comme matière première des différents extraits. Les échantillons de clou de girofle (CG) sont subdivisés en deux parties, la première est broyée en poudre et la deuxième partie utilisée telle qu'elle est (figure 01).

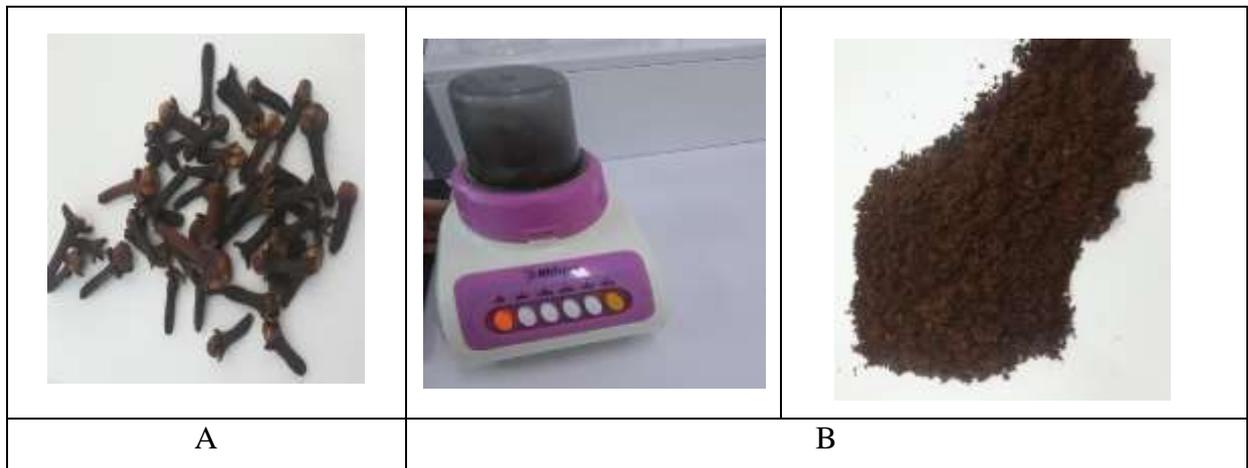


Figure 01 : les clous de girofle ; A : sains, B : broyés (photo personnelle)

Les caractéristiques des boutons floraux :

- En forme de clou, brun rouge.
- Odeur aromatique très caractéristique.
- Saveur brûlante.

I.3. Méthodes

I.3.1. Méthodes d'extraction

I.3.1.1. Hydro-distillation

L'huile essentielle (HE) est extraite à l'aide d'un appareil de type Clevenger (figure 02) les bourgeons broyés et non broyés ont été soumis, séparément, à une hydro distillation pendant 4 à 6 heures. La matière première (50 g) a été directement immergée dans 250 ml d'eau distillée dans un ballon à fond rond (capacité de 1 L). L'ensemble du procédé d'extraction a été opéré à la pression atmosphérique. Cette technique consiste à faire bouillir le mélange, condenser les vapeurs qui se dégagent à l'aide d'une colonne de condensation (réfrigérant). La condensation de ce mélange de vapeur provoque sa séparation en deux phases : une phase organique, appelée huile essentielle, contenant la majorité des composés odorants, et une phase aqueuse, appelée eau aromatique (distillat) qui contient très peu de composés odorants. Recueillir le distillat dans un Erlenmeyer et on stopper le chauffage. A la fin l'HE a été filtré par filtre membrane. (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

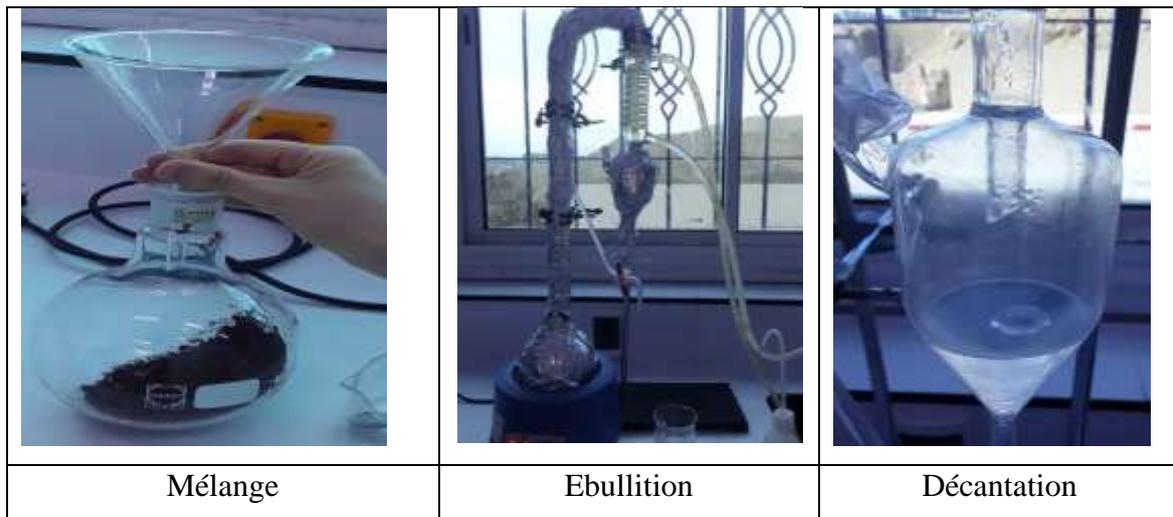


Figure 02 : Protocole de l'hydro-distillation (photo personnelle)

I.3.1.2. L'analyse physique des huiles essentielles

A) Le rendement

Le rendement (R) en l'huile essentielle est le rapport entre le poids de ce produit et le poids de la plante à traiter. Le rendement d'extraction a été calculé comme suit :

$$R \% = \frac{M_{HE} \times 100}{MS}$$

Ms : masse de la matière sèche (g), MHE : masse d'huile essentielle(g) (Ben Hassine et *al.*, 2021).

B) La mesure de pH

Le potentiel d'hydrogène pH mesure l'activité chimique des ions Hydrogènes (H⁺) en solution. Le pH des huiles obtenus est réalisé à l'aide de papier pH (figure 03).

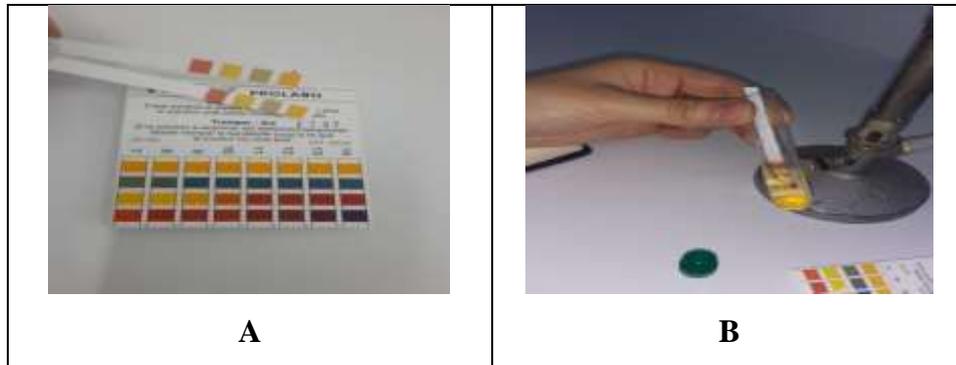


Figure 03 : A papier pH, B mesure de pH (photo personnelle)

C) Conservation de l'huile essentielle

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables. Après l'extraction l'HE avait été conservée dans des flacons en verre opaques, brun ou bleu pour la préserver de la lumière et de l'oxygène, bien scellés. Il faut également éviter le contact avec l'air (pas d'ouverture prolongée des flacons), par la suite il faudra garder les flacons à une température basse entre 4 et 5 C° (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

I.3.1.3. Macération

I.3.1.3.1 Macération à froid

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner une plante dans un solvant à froid pour en extraire les composés solubles (arômes, principes actifs). La macération peut se faire dans une solution alcoolique, de l'eau, de l'huile... Cette technique préserve les espèces chimiques fragiles car elle est pratiquée à froid mais elle n'est pas toujours aussi efficace que les techniques qui utilisent le chauffage (Handa et *al.*, 2008).

La technique consiste à placer 10 g de clous de girofle convenablement broyé « poudre », ou non broyé dans un Erlenmeyer couvert par papier aluminium contenant 100 ml de l'eau distillée approprié et bouché. Laisser le système au repos pendant trois jours, avec des agitation, le liquide est ensuite filtré et le résidu solide est pressé pour récupérer le maximum de solution occluse (figure 04) (Handa et *al.*, 2008).

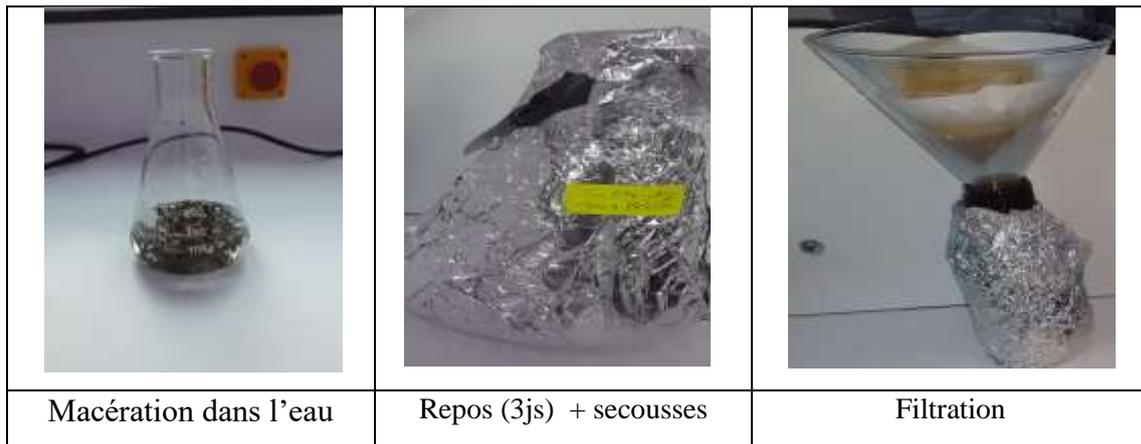


Figure 04 : Expérimentation de macération à froid (photos personnelles).

I.3.1.3.2. Macération à chaud

Dix gramme de clous de girofle broyé, ou non broyé sont placés dans un Erlenmeyer contenant 100 ml de l'eau distillée approprié et bouché. Bouillir le mélange à 100°C pendant 30 minutes. Après ébullition, filtrer et récupérer le macérât (figure 05) (Handa et *al.*, 2008).

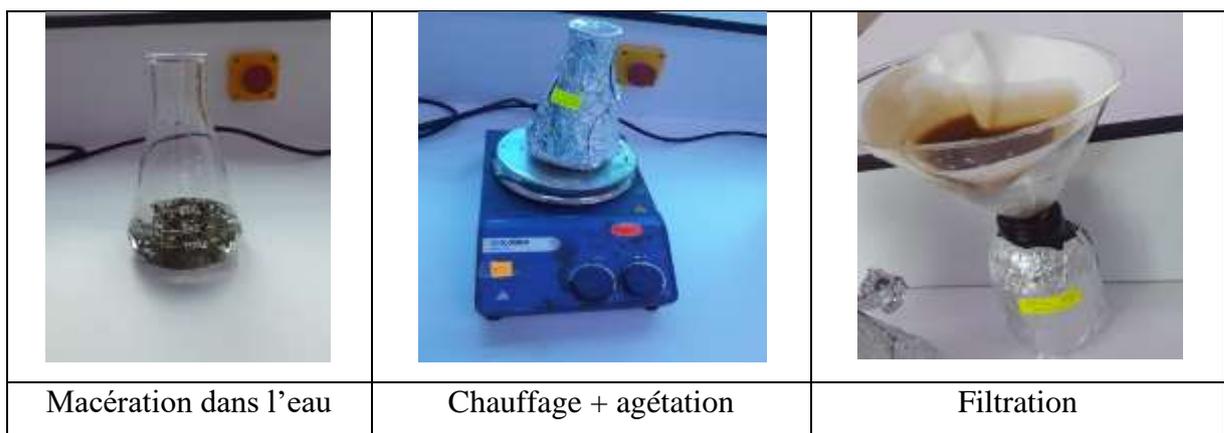


Figure 05 : Expérimentation de macération (photo personnelle).

1.3.2. Isolement et identification des agents pathogènes

I.3.2.1. Isolement des moisissures

Les moisissures ont été isolées à partir des fragments des tomates infectées (figure 06). Les tomates échantillonnées ont été découpées en petits fragments d'en moins de 10 mm de diamètre (zone saine et blessée). Les tissus obtenus de tomate ont été aseptiquement placés en boîtes de Pétri coulées de pomme de terre glucosée (PDA) (Annexe), à raison de quatre à cinq fragments par boîte. Le milieu de culture PDA sert à l'ensemencement et la purification des souches fongiques. Les boîtes ont été ensuite hermétiquement scellées à l'aide d'un para-film. L'incubation durait 72 heures à 28 °C (figure 07). (Bessadat et *al.*, 2014).



Figure 06 : Echantillons des fruits de tomates infectées (photo personnelle).

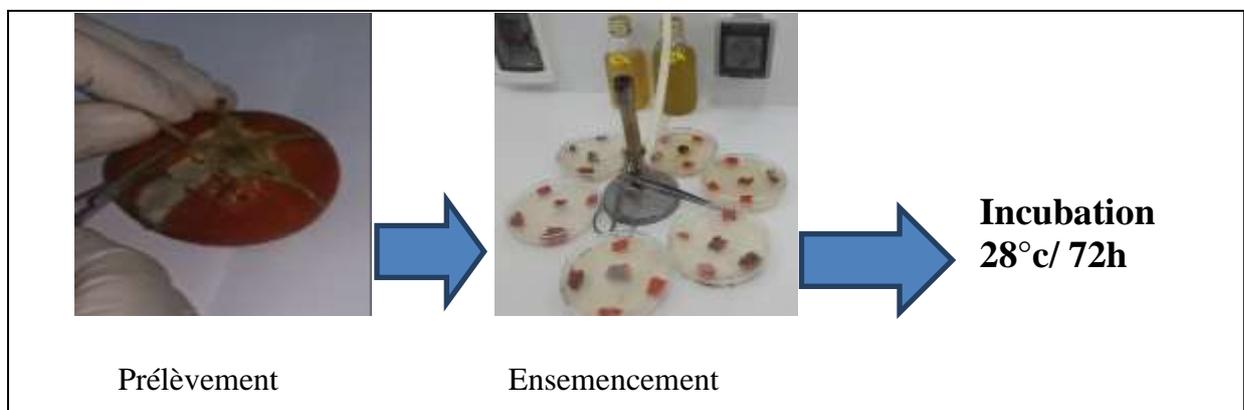


Figure 07 : Isolement des moisissures sur milieu gélosé PDA (photo personnelle)

La caractérisation et l'identification des isolats obtenus ont été faites à l'échelle du genre, à partir des caractères macroscopiques culturaux (forme, taille, couleur, aspect, contour) et microscopiques. L'examen microscopique effectué entre lame et lamelle /scotche des cultures ayant servi à l'étude des caractéristiques culturelles (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,) (figure 08). (Compaore et *al.*, 2016).

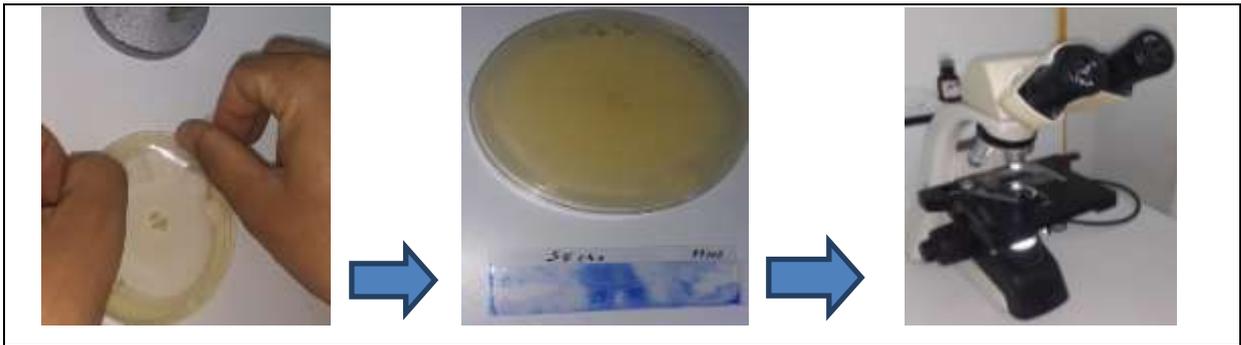


Figure 08 : L'examen microscopique effectué entre lame et lamelle /scotche (photo personnelle)

I.3.2.1. Isolement des bactéries

L'isolement des bactéries a été réalisé sur des milieux de culture gélosés, selon la méthode de (Goszczyńska, 2000). Les fruits de tomate présentant des symptômes typiques sont lavés à l'eau distillée stérile pour éliminer les débris de surface avant de procéder à l'isolement. Les parties infectées du tissu végétal sont coupées à la limite (zone saine/zone malade) à l'aide d'un scalpel stérile. Ces morceaux de fruits ont été ensemencés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PCA (Plate count agar). Ensuite, les boîtes ont été incubées à une température de 37 °C pendant 24 h. Les colonies obtenues sont purifiées par réensemencement dans des boîtes de Pétri coulées de milieu PCA par la méthode de stries. Afin de déterminer la pureté et le type de Gram des souches isolées, nous avons réalisé la coloration de Gram.

I.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique

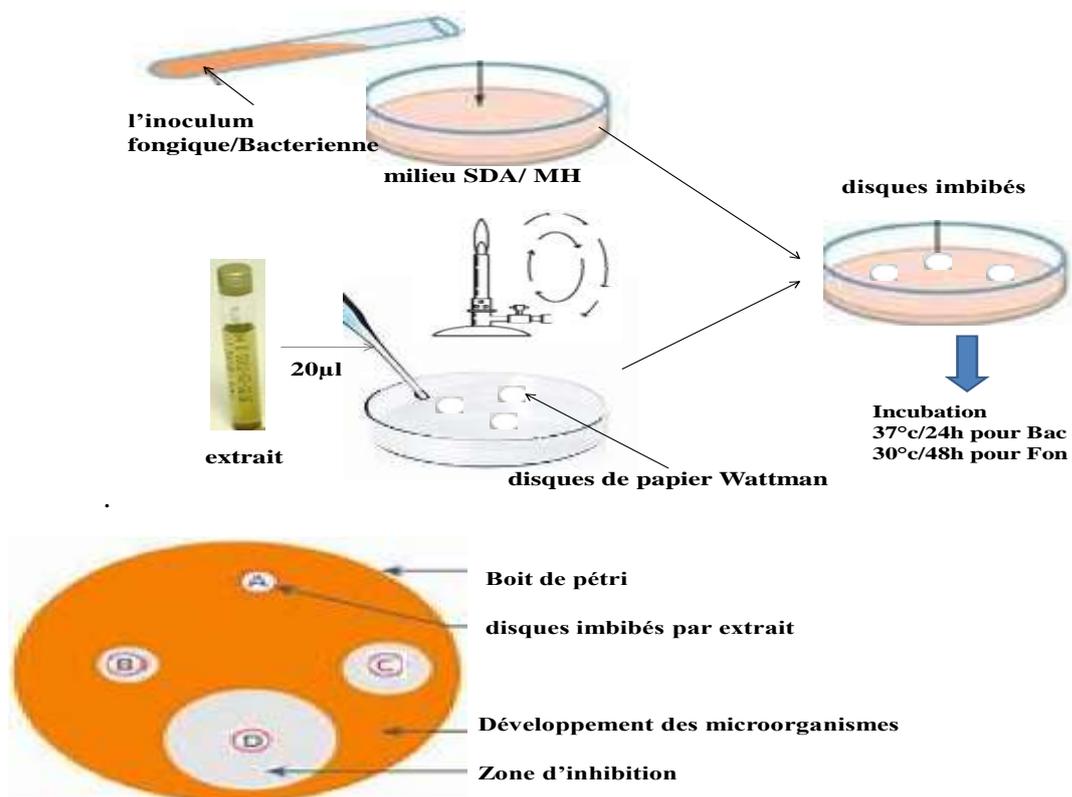
I.4.1. Activité antifongique

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide Sabouraud (SDA) pour évaluer l'activité antifongique vis-à-vis des 05 isolats. La gélose a été ensemencée par inondation avec 2 ml de chaque inoculum fongique à environ 10^5 spore/ml (selon le standard Mac Farland, une densité optique de 0.5 à 1 correspond approximativement à une concentration de 10^5 spore/ml à la longueur d'onde $\lambda = 730$ nm), l'excès a été éliminé. Puis, les boîtes ont été séchées 15 minutes à la température ambiante. Des disques de papier Wattman stériles N° 3 et de diamètre 06 mm ont été imprégnés par 20 μ l de chaque extrait placés à la surface du milieu dans la boîte de pétri. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque extrait. Des disques imbibés par une solution aqueuse stérile considérés comme témoins négatifs (Tm-). Les boîtes ont été ensuite incubées à 30 °C pendant 48 h. La mesure

des diamètres des zones d'inhibition entourant les disques contenant les échantillons à tester a été réalisée à l'aide d'une règle (figure 09) (Yala et *al.*, 2016).

I.4.2 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose. La gélose Muller- Hinton (MH) a été ensemencée par écouvillon émergé dans l'inoculum bactérien à environ 0,5 Mac Farland, (selon le standard Mac Farland, une densité optique de 0.08 à 0.1 correspond approximativement à une concentration de 10^8 UFC/ml à la longueur d'onde $\lambda = 625$ nm). Enfin, 20 μ l de chaque extrait ont été déposés sur des disques de papier wattman et les boîtes incubées à 37°C/24h. Deux répétitions ont été réalisées pour chaque extrait. Un Disque de gentamycine commercialisée (à 10 μ g/ disque) est utilisé comme témoin positif (Tm+). Les activités antibactériennes ont été évaluées en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition induite par les extraits ou les antibiotiques (figure09) (Ben Abdallah et *al.*, 2019)



extrait	lectures	résultat
A	— $\varnothing < 8\text{mm}$	résistée
B	+ $09 \leq \varnothing \leq 14$	intermédiaire
C	++ $15 \leq \varnothing \leq 20$	Sensible
D	+++ $\varnothing \geq 20$	Très sensible

Figure 09 : Schéma explicatif de la technique du test de sensibilité et l'interprétation de ses résultats

I.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

I.5.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice fongique CMI F

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI F) des huiles essentielles ont été déterminées selon la méthode rapportée par Remmal et *al.*, (1993). et Satrani et *al.*, (2001). Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc aussi au milieu de culture, la mise en émulsion a été réalisée grâce à une gélose molle à 0,2 % afin de favoriser le contact germe/composé. Des dilutions ont été préparées à 150 µl/ml, 100µl/ml, 75µl/ml, 50µl/ml et 25µl/ml dans cette solution d'agar.

Dans des tubes à essais contenant chacun 13,5 ml de milieu Sabouraud (SDA), stérilisés à l'autoclave (20 min à 121 °C) et refroidis à 45 °C, on a ajouté 1,5 ml de chacune des concentrations de façon à obtenir les concentrations finales de 15 µl/ml, 10 µl/ml, 7,5 µl/ml, 5 µl/ml et 2,5 µl/ml (v/v). Puis on agite convenablement les tubes avant de les verser dans des boîtes de Pétri. Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés. L'ensemencement se fait par dépôt de fragments de 0,5 cm², prélevés à partir de la périphérie d'un tapis mycélien et provenant d'une culture de 7 jour (j) dans milieu Sabouraud. L'incubation se fait à l'obscurité pendant 7 j à 25 °C (figure10) (El Ajjouri et *al* , 2009).

Les résultats sont exprimés sous forme d'un pourcentage d'inhibition calculer selon la formule suivante (Bouzidi et *al.*,2019)

$$\text{Le \% d'inhibition} = \frac{(D_{Tm} - DI) \times 100}{D_{Tm}}$$

D Tm= diamètre de témoin DI= diamètre d'inhibition

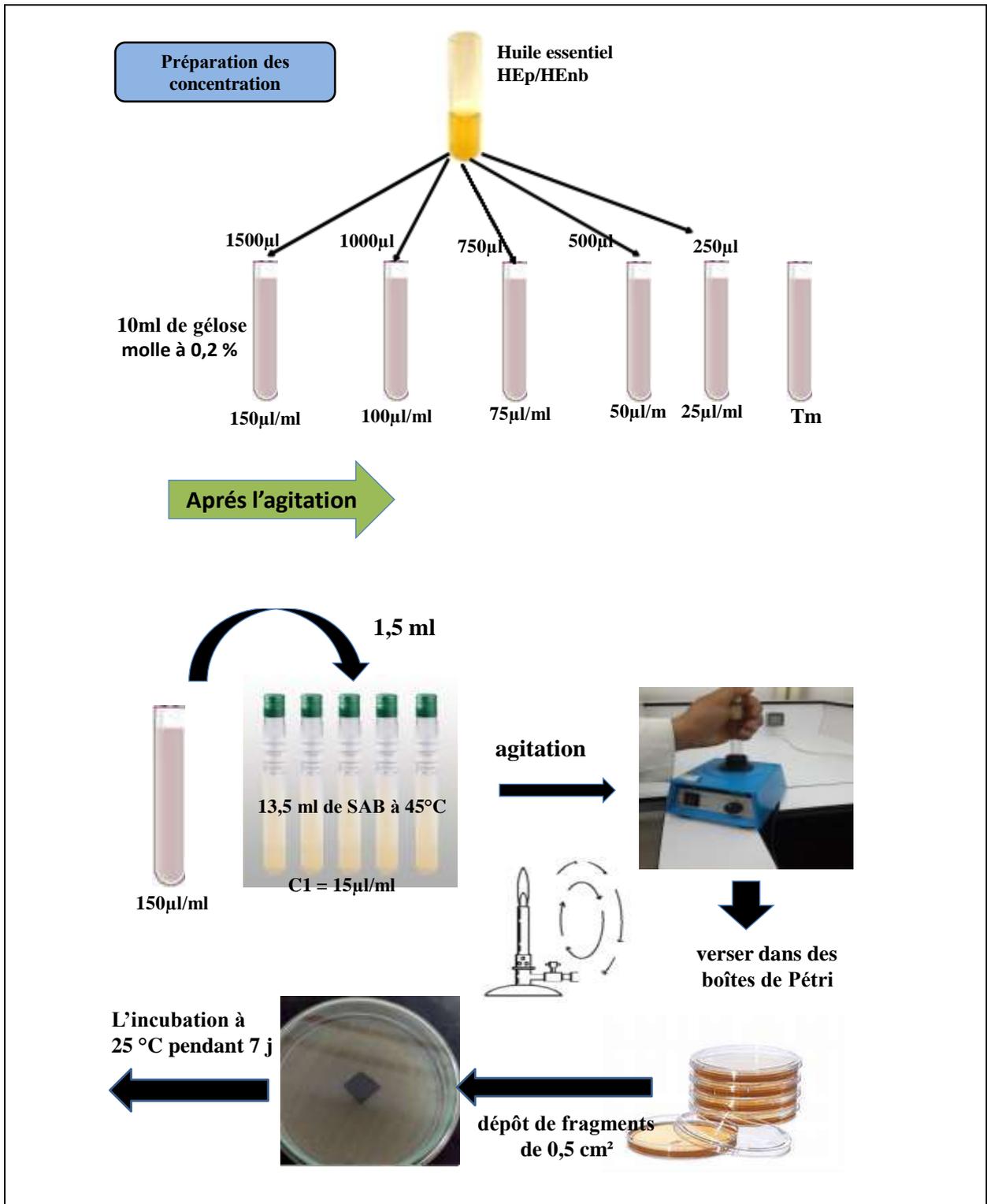


Figure 10 : Schéma représentatif de la CMI F (concentration minimale inhibitrice fongique)

I.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice bactérienne CMI B

Afin de mieux évaluer cette activité une étude plus poussée a été menée par la détermination des concentrations minimales inhibitrices bactérienne (CMIB) des huiles essentielle de clou de girofle (poudre/non broyé) vis-à-vis la souche bactérienne. Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide (MH) qui a été ensemencé par l'inoculum microbien à 0,5 Mac Farland .

Des dilutions sont préparées au 15µl/ml, 10µl/ml, 7,5 µl/ml, 5 µl/ml et 2,5 µl/ml dans une solution de Diméthylsulfoxyde (DMSO). De ce fait, chacun des disques de papier Wattman stérile N°3 et de diamètre 06 mm est imprégné par 20 µl de chaque concentration et placé à la surface du milieu dans la boîte de Pétri en présence des disques imbibés par une solution DMSO (témoins négatifs) et des disques gentamicine commercialisée (à10µg/disque) comme témoins positifs. Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 h. La mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm) entourant les disques contenant les concentrations à tester est effectuée à l'aide d'une règle. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance microbienne visible à l'œil nu (figure 11), (Oke et *al.*, 2009).

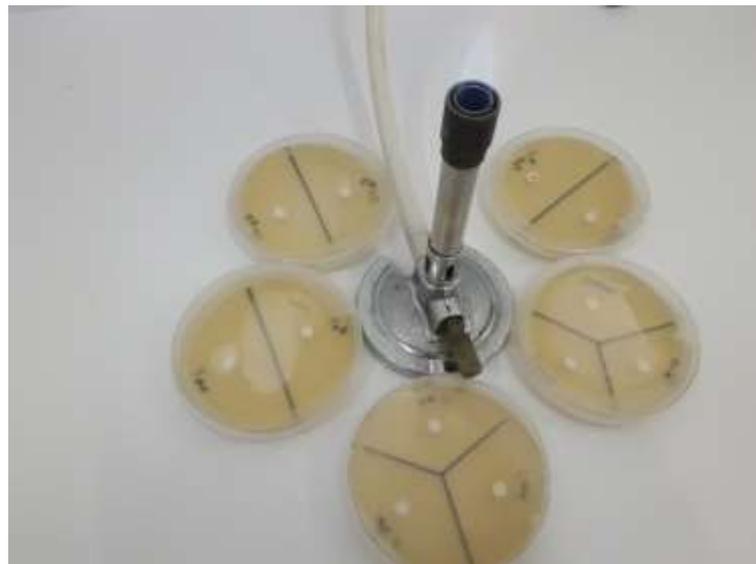
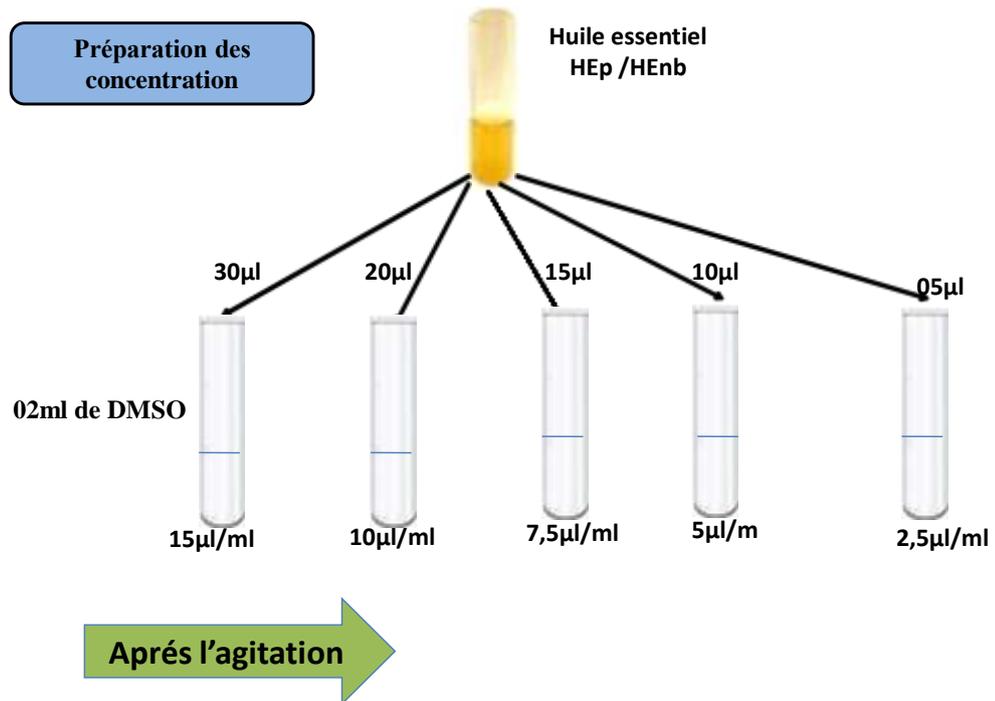


Figure 11 : Détermination de la CMI B concentration minimale inhibitrice bactérienne

(Photo personnelle).

I.5.3. Mise en évidence du pouvoir antifongique volatile

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles a été évalué par la méthode de micro-atmosphère. Dans cette technique, une boîte de Pétri (90 mm) contenant 25 ml de milieu gélosé PDA est d'abordensemencée par un fragment de diamètre de 5 mm prélevé à la

périphérie d'une culture fongique dans le milieu PDA âgée de sept jours. Puis, des disques de papier Wattman imbibés d'une quantité de (20µl) de chaque concentration est déposés au centre du couvercle de la boîte de Pétri. La culture est ensuite incubée à l'obscurité, couvercle en bas, pendant sept jours à 25 °C. Chaque essai est répété 02 fois. Un témoin, dépourvu d'huile essentielle, est préparé dans les mêmes conditions avec un disque de papier imprégné d'eau distillée (figure 12). (Hmiri^a et *al.*, 2011).

Les résultats sont exprimés sous forme d'un pourcentage d'inhibition calculer selon la formule suivante.(Bouzidi et *al.*,2019).

$$\text{Le \% d'inhibition} = \frac{(D_{Tm} - DI) \times 100}{D_{Tm}}$$

D_{Tm}= diamètre de témoin DI= diamètre d'inhibition



Figure 12 : L'activité antifongique par la méthode micro- atmosphère (photo personnelle).



Chapitre II

Résultats et Discussions

Chapitre II : Résultats et Discussion

II.1. Résultats et analyse physiques des extraits

Le nombre d'extraits obtenus après différents types d'extraction était de huit : deux huiles essentielles (HEp et HEnb), deux distillats (Disp et Disnb), deux macérâts à chaud (Mchp et Mchnb) et deux macérâts à froid (Mfp et Mfnb). Les extraits de clou de girofle broyé, poudre (CGp) avaient un faible rendement (Disp = 62%, Mchp= 65% et Mfp= 70%) par rapport aux extraits de clou de girofle non broyé (CGnb) : (Disnb = 64%, Mchnb = 70% et Mfnb= 85%). Par contre, le CGp avait un grand rendement en HE de (5,06 %) par rapport aux CGnb qui était de (4,76 %), (voir tableau 01).

On a observé aussi que la couleur des extraits de macération était brune (Mchp, Mchnb, Mfp et Mfnb) tandis que les couleurs des distillats étaient différentes : transparente pour Disp et blanche "trouble" pour Disnb. Nous avons obtenu une HEp de couleur jaune clair, et une HEnb de couleur jaune (figure 13).

Tous les extraits ont un goût âcre et épicée, très fort surtout chez les HEs, mais ce goût est moins fort chez les Dis et faible chez les extraits de macération. Même remarque pour l'odeur, elle est très forte chez les HEs, forte chez les Dis et faible dans les extraits de macération. (tableau 01).

Tableau 01 : Caractéristique des extraits :

	Clou de girofle non Broyé				Clou de girofle Broyé "poudre "			
	HEnb	Disnb	Mchnb	Mfnb	HEp	Disp	Mchp	Mfp
Quantité %	4,76%	64%	70%	85%	5,06%	53%	65%	70%
couleur	Jaune	Blanche	brune	brune	Jaune claire	transparent	brune	brune
Odeurs	Très Fort	fort	Faible	Faible	Très Forte	fort	faible	faible
Gout	Très épicée	épicée	Faible	Faible	Très épicée	épicée	Faible	Faible

HEp : huile essentiel poudre, HEnb : huile essentiel non broyé, Mchp : macérât a chaud poudre, Mchnb : macérât a chaud non broyé, Mfrp : macérât a froid poudre ; Mfnb : macérât a froid non broyé, Disp : distillat poudre et Disnb : distillat non broyé.

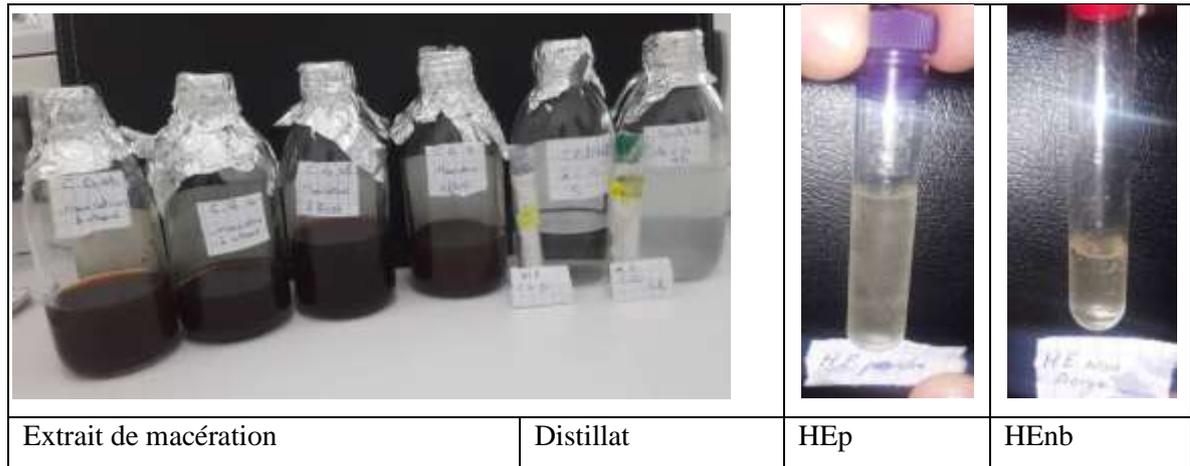


Figure 13 : les différents extraits du clou de girofle (photo personnelle).

Les résultats obtenus de notre expérimentation ont montré que les échantillons broyés présentaient un rendement d'extraction d'HE de 5,06 %. Alors que les bourgeons de girofle non broyés présentaient un rendement moins, environ 4,76 %. Ces résultats sont en accord avec la norme minimale d'AFNOR qui varie de 5% à 8%. Ces résultats ne coïncident pas avec ceux des travaux réalisés par d'autres auteurs comme Ben hassine et *al.*, (2021), qui a trouvé que les bourgeons de girofle non broyés ont un rendement d'extraction d'HE de $7,1 \pm 0,8\%$ et les bourgeons de girofle broyés ont présenté un rendement d'extraction plus élevé de $14,3 \pm 0,6\%$. De même, Kapadiya et Desai (2017). Ben hassine et *al.*, (2010). ont trouvé un rendement d'extraction égal à 11,35 % et une granulométrie du clou de girofle était d'environ 565 microns pendant 45 minutes (temps d'extraction total) .

Cette différence de rendement est probablement due au niveau de la manipulation à une perte d'huile essentielle dans la phase aqueuse du distillat. En effet, durant l'étape de récupération de l'HE à partir de l'hydro-distillation, nous avons remarqué la présence de gouttelettes qui restent dissoutes dans l'eau et que nous n'avons pas pu récupérer à cause de la difficulté de leur séparation qui nécessite l'utilisation des solvants organiques spécifiques. En plus, la simplicité du dispositif d'hydro-distillation utilisé, lors des différentes étapes d'extraction, divers facteurs ont pu influencer les résultats obtenus et des pertes ont été observées dans les tuyaux servant à transporter la vapeur ce qui n'a pas permis de recueillir le maximum d'HE. Nous pensons que d'autres facteurs peuvent influencer sur le taux du rendement comme la qualité de l'échantillon choisie, la durée et les conditions de stockage...

Les données actuelles ont montré l'influence de la méthode de broyage sur le rendement d'extraction de l'HE. En effet, cette technique est plus pratique en agrandissant la surface de contact entre le milieu solide et l'eau bouillie (Johner et *al.*, 2018). Donc la diminution de la taille des particules est liée à l'augmentation du rendement d'extraction des huiles essentielles. De plus, le broyage améliore la vitesse d'extraction et le rendement d'hydro-distillation. Mais, un broyage extrême peut perturber la circulation de la vapeur, et donc ralentir la vitesse d'extraction (Ben Hassine et *al.*, 2010).

Selon (Boukhatem et *al.*, 2019), quel que soit le procédé utilisé, l'extrait final correspond à une concentration des composés initialement présents dans la matière première. De plus, au niveau biologique les méthodes de production tout comme l'origine géographique, le climat, le sol, la période de récolte ou bien encore les pratiques agricoles, peuvent avoir une influence directe sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle (Boukhatem et *al.*, 2019).

II.1.1 Les résultats de la mesure de pH

Après avoir mesurer le pH de l'huile essentielle obtenue, que ce soit à partir du clous de girofle broyé ou non, la valeur était comprise entre 5 et 6, ce qui signifie que l'huile essentielle est acide en raison de sa composition chimique.

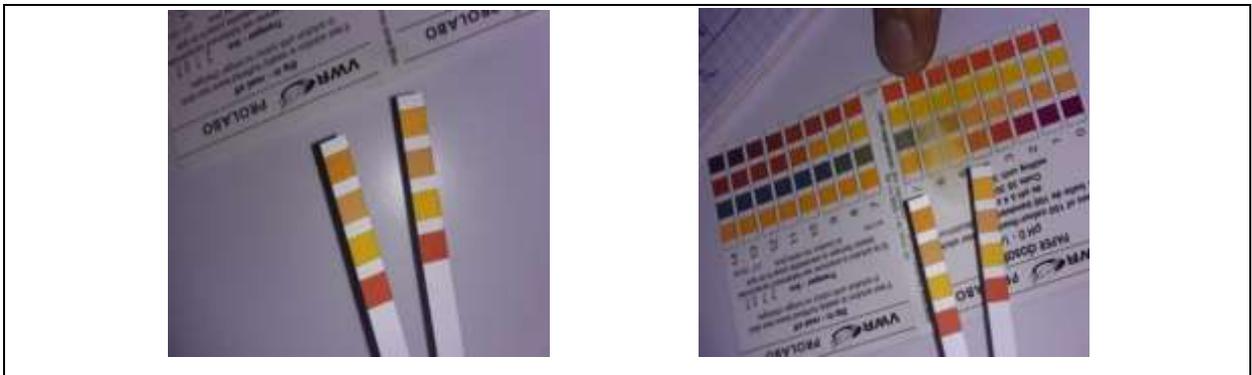


Figure 14 : Les résultats de la mesure de pH (photo personnelle).

Les résultats consignés notre pH de 5 à 6. C'est un pH légèrement acide; ceci est dû à la composition chimique des HE de *Syzygium aromaticum* qui se considère comme donneur des H⁺. ce qui lui donne la propriété d'être un bon conservateur.

II.2 Résultats de l'isolement de la flore fongique de la tomate

II.2.1 caractéristiques des souches isolées :

L'isolement a permis d'obtenir 8 souches fongiques pures. Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques ont été décrites comme suit :

Souche 01 : Les colonies présentent une couleur blanche puis rapidement noirâtre et une texture granuleuse homogène (figure 15. A1) et une couleur jaune pâle au revers de la boîte (figure 15. A2). Les conidiophores sont dressés, simples et incolores ou bruns pâle (figure 15. B1). Ils ont une paroi épaisse et lisse avec des vésicules gonflées globuleuses portant des phialides toute autour de la surface en sorte de goupillon (figure 15. B1).

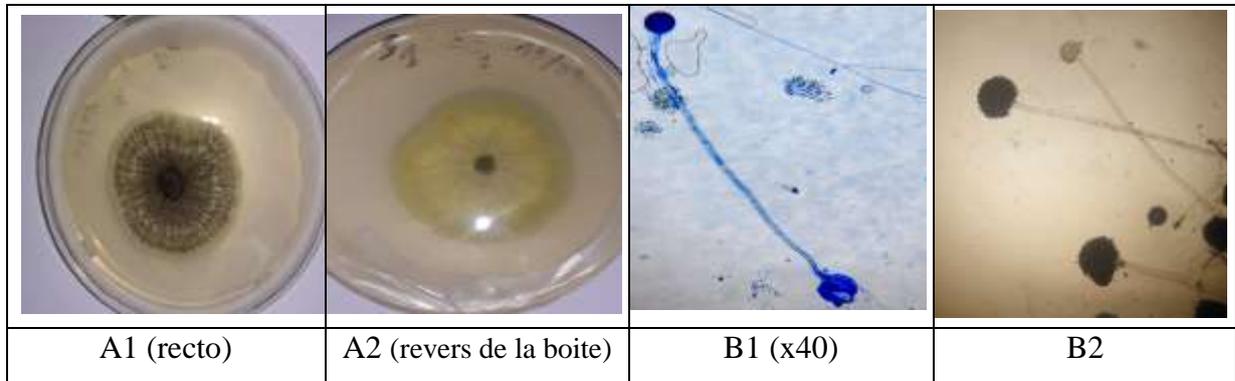


Figure 15: Caractères morphologiques de souche 01 (A1, A2) colonie fongiques B1 Conidiphores ($\times 40$) et B2 photo de référence (Tomé et Gilberto, 2015).

Souche 02 : Les colonies ont un aspect poudreux, plates et au pourtour finement frangé ; la surface de la boîte est entièrement recouverte de mycélium blanc (figure 16 A1 et A2). Arthrospores ($\times 40$) (arthroconidies) issues de la fragmentation de l'hyphe transparente à paroi épaisse rectangulaire puis s'arrondissant blanc (figure 16 B1).

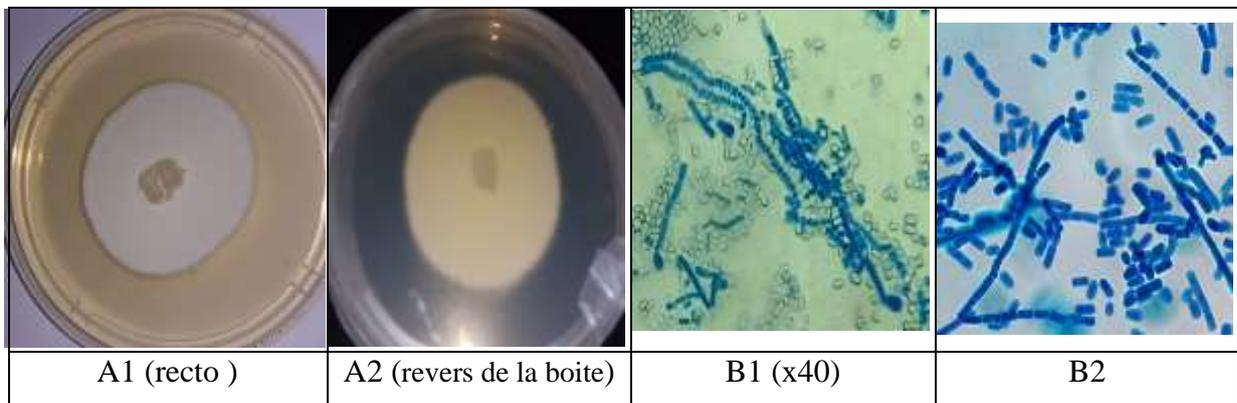


Figure 16 : Caractères morphologiques de la souche 02 (A1, A2) colonie fongiques, B1 Arthrospore ($\times 40$) et B2 photo de référence (Tomé et Gilberto 2015).

Souche 03 : La surface de la culture est de couleur jaune verdâtre, souvent avec des tâches jaunes avec une texture veloutée à poudreuses (figure 17, A1). Couleur rosée du revers de la boîte (figure 17. A2) Les hyphes sont cloisonnés et les conidiophores sont longs dressés (figure 17. B1). Les phialides sont formés sur la majeure partie des vésicules sphériques rayonnés (figure 17, B2).

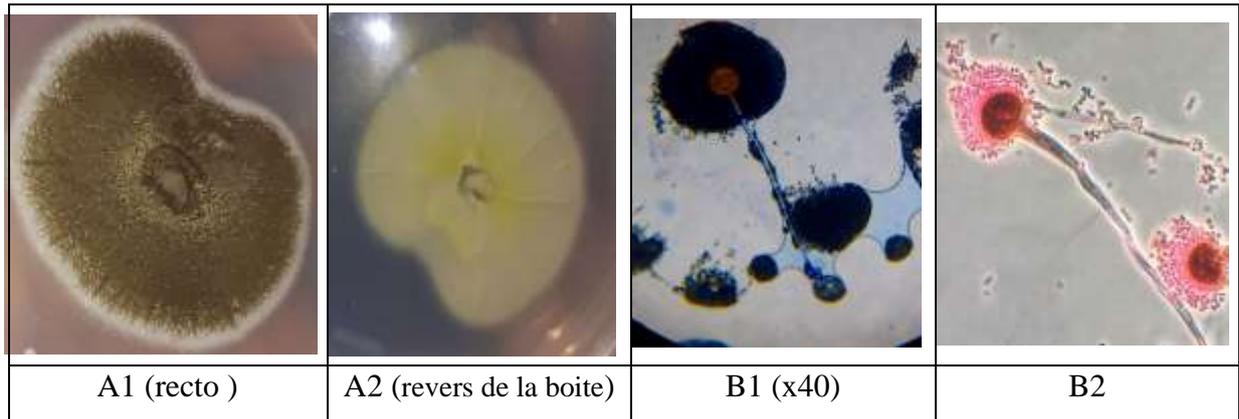


Figure 17: Caractères morphologiques de souche 03, (A1, A2) colonie fongiques et B1 Conidiophores ($\times 40$) et B2 photo de référence (Tomé et Gilberto, 2015).

Souche 04 : la colonie apparaît de couleur blanche, crème, (figure 18. A1) Le revers de la boîte est de couleur pâle (figure 18, A2). Les colonies ressemblent à des levures, constituées de cellules unicellulaires bourgeonnantes, les hyphes se décomposant en arthrospores individuelles (figure 18, B1).

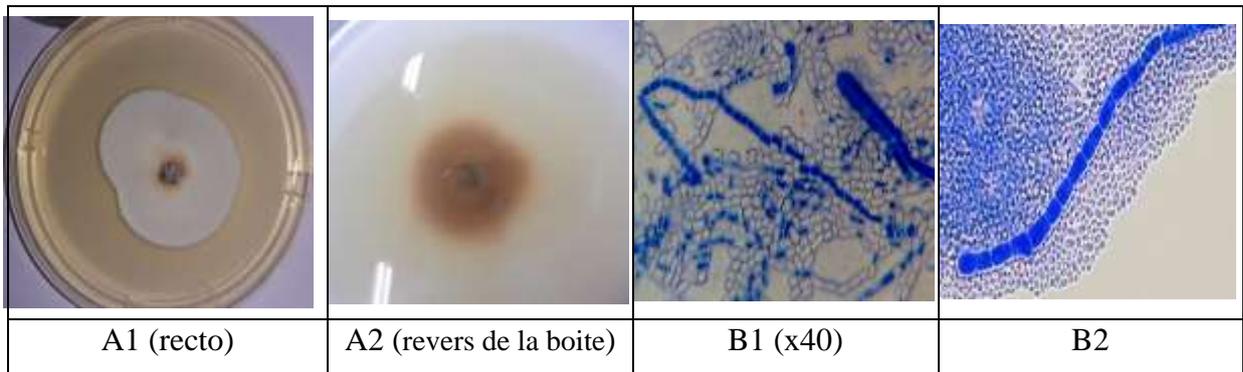


Figure 18 : Caractères morphologiques de souche 04, A1 et A2 colonie fongiques : B1 arthroconidie ($\times 40$) et B2 photo de référence (Yuri ,2017).

Souche 05 : Les colonies cotonneuses à granuleuses. La coloration est blanche à jaune pâle avec un revers (figure 19 A1 et A2). Des hyphes cloisonnés hyalins caractéristiques avec des arthroconidies unicellulaires à parois lisses et des hyphes irrégulièrement ramifiés, (figure 19, B1).

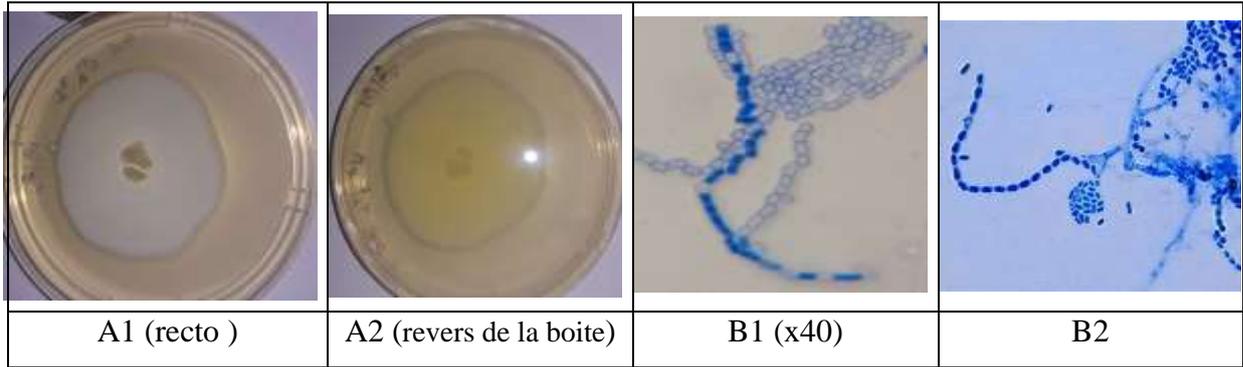


Figure 19 : Caractères morphologiques de souche 05 (A1, A2) colonie fongiques, B1 Arthrospor (x40) et B2 photo de référence (Tomé et Gilberto, 2015).

Souche 06 : Sont des champignons filamenteux, la colonie de cette souche développe rapidement une couleur vert bleuâtre (la couleur des phialides) d'aspect très poudreux (figure 20. A1). Revers de la boîte jaune (figure 20. A2). Les conidiophores portant des branches appelées métules sur lesquelles s'insèrent les phialides (figure 20, B2). Ces derniers portent des chaînes de conidies sphériques unicellulaire l'ensemble de la structure forme l'aspect caractéristique aux pénicilles «pinceau» (figure 20, B2).

Souche 07 : champignons filamenteux, la colonie couleur brun avec un mycélien aérien (figure 20, C1et C2).

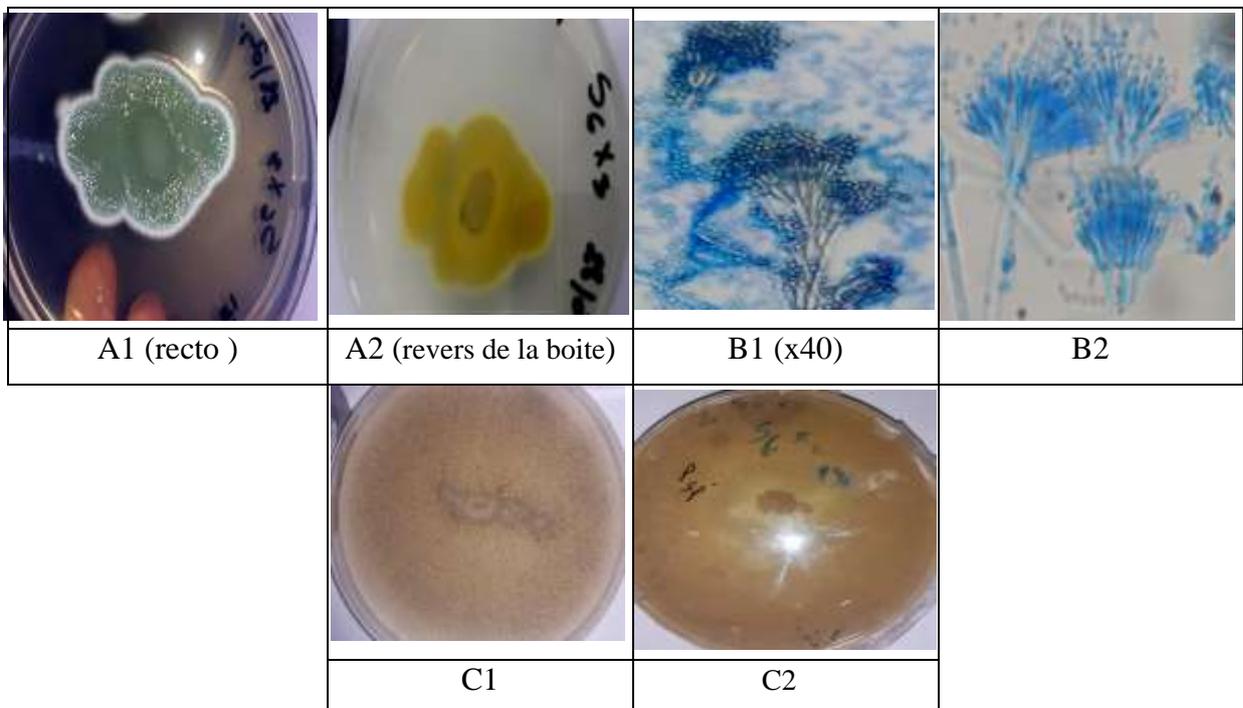


Figure 20 : Caractères morphologiques de souche 06 et 07, A1, A2, C1 et C2 colonie fongiques : B1 Conidiophores (x40) et B2 photo de référence (Tomé et Gilberto, 2015).

Souche 08 : Il s'agit d'une souche bactérienne B1 qui forme de petites colonies beiges et bombées avec un centre jaune sur milieu PCA. Sous microscope, elle présente une forme de bacille et une couleur rose : Gram négatif (Après coloration de Gram) (figure 21).

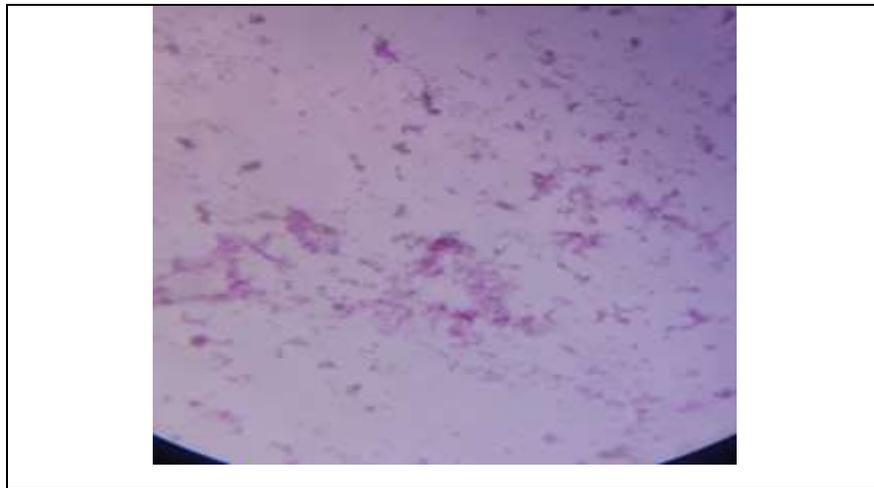


Figure 21 : Caractères morphologiques de souche 08 Après coloration de Gram.(x40)

L'identification a été faite à partir des caractères cultureux (identification macroscopique) et morphologiques (identification microscopique). Ces caractéristiques ont permis d'identifier certains genres fongiques en s'appuyant par Tomé et Gilberto (2015). Ce type d'identification fondé sur l'étude morphologique de mycélium et des spores a permis d'identifier les souches fongiques suivantes

Souche 01 et 03 : *Aspergillus* sp. **Souche 02 :** *Geotrichum* sp. **Souche 04 :** *Aureobasidium* sp.
Souche 05 : *Arthrographis* sp. **Souche 06 et 07 :** *Penicillium* sp.

En effet, une fois cueillies, les tomates sont sujettes à plusieurs infections et altérations fongiques qui causent de grandes pertes économiques en empêchant leur conservation plus de quelques jours. Parmi les moisissures les plus rencontrées dans l'altération des tomates fraîches, on peut citer les espèces *Aspergillus* sp et *Penicillium* sp responsables de lésions molles, humides et sombres, *Geotrichum* sp, ce champignon levuriforme est associé à des pourritures liquides, *Fusarium* sp et *Aureobasidium* sp. agent de détérioration des fruites surtout pendant le stockage et le transport *Arthrographis* sp. *Alternaria* sp, *Botrytis* sp connu pour ses taches fantômes. (Blancard et al., 2009).

II.3 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

II.3.1. Résultat de l'activité antifongique

L'activité antifongique des extraits a été évaluée par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance autour des disques contenant les extraits testés vis-à-vis des souches isolées à partir des fruits de tomates : *Aspergillus* sp, *Geotrichum* sp, *Aureobasidium* sp, *l'Arthrographis* sp et *Penicillium* sp, sur milieu de culture (Sabouraud), (figure : 22). La lecture a été faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm). Ces diamètres montrent le degré de sensibilité des souches en se basant sur les normes qui suivent : $\emptyset < 10$ mm, non sensible ; $10 \leq \emptyset \leq 15$ mm, sensible ; $15 \leq \emptyset \leq 20$ mm, très sensible et $\emptyset \geq 20$ mm, extrêmement sensible (Razzouk et al., 2022).

D'après le tableau ci-dessous, Les résultats obtenus ont montré que les extraits de clou de girofle broyé, Mchp, Mfrp et Distp, évalués avaient une action inhibitrice moyenne sur la croissance des isolats testés avec des zones d'inhibition allant de 8 à 28 mm. Tandis que, la souche *Geotrichum* sp était la plus sensible aux ces trois extraits.

L'activité antifongique de l'HEp et HEnb était très satisfaisante contre les souches testées, avec une moyenne égale à : $36,19 \pm 9,32$ mm (HEp) et $37,728 \pm 6,74$ mm (HEnb). À l'échelle des espèces, *Penicillium* sp apparaît le plus sensible 50 ± 10 mm et $46,66 \pm 5,77$ mm aux huiles HEp et HEnb, respectivement. Alors que, *Arthrographis* sp est le plus ou moins sensible (HEp : $27,33 \pm 2,30$ mm) et (HEnb : $27,66 \pm 4,72$ mm). Par contre, les extraits restants (Mchnb et Mfrnb) n'avaient aucun effet sur toutes les souches (Tableau 02).

Tableau 2 : Activité antifongique des extraits, zones d'inhibition (mm)

Extraits Souches	Huiles essentiels		Macérât chaud		Macérât froid		Distillat	
	HEp	HEnb	MChp	MChnb	MFRp	MFRnb	DISp	DISnb
<i>Aspergillus</i> sp	$33,33 \pm 5,77$	$37,67 \pm 4,04$	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	$8,5 \pm 0,70$
<i>Geotrichum</i> sp	$41 \pm 8,54$	$38,33 \pm 2,88$	$25 \pm 7,07$	0 ± 0	$09 \pm 1,41$	0 ± 0	28 ± 01	0 ± 0
<i>Aureobasidium</i> sp	$29,33 \pm 1,15$	$38,33 \pm 2,88$	$15 \pm 7,07$	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	08 ± 00	0 ± 0
<i>Arthrographis</i> sp	$27,33 \pm 2,30$	$27,66 \pm 4,72$	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Penicillium</i> sp	50 ± 10	$46,66 \pm 5,77$	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Moyenne	$36,19 \pm 9,32$	$37,73 \pm 6,74$	$8 \pm 11,51$	0 ± 0	$1,8 \pm 4,02$	0 ± 0	$7,2 \pm 12,13$	$1,7 \pm 3,8$

(moyenne \pm écart-type), HEp : huile essentiel poudre, HEnb : huile essentiel non broyé, Mchp : macérât a chaud poudre, Mchnb : macérât a chaud non broyé, Mfrp : macérât a froid poudre ; Mfrnb : macérât a froid non broyé, Disp : distillat poudre et Disnb : distillat non broyé.

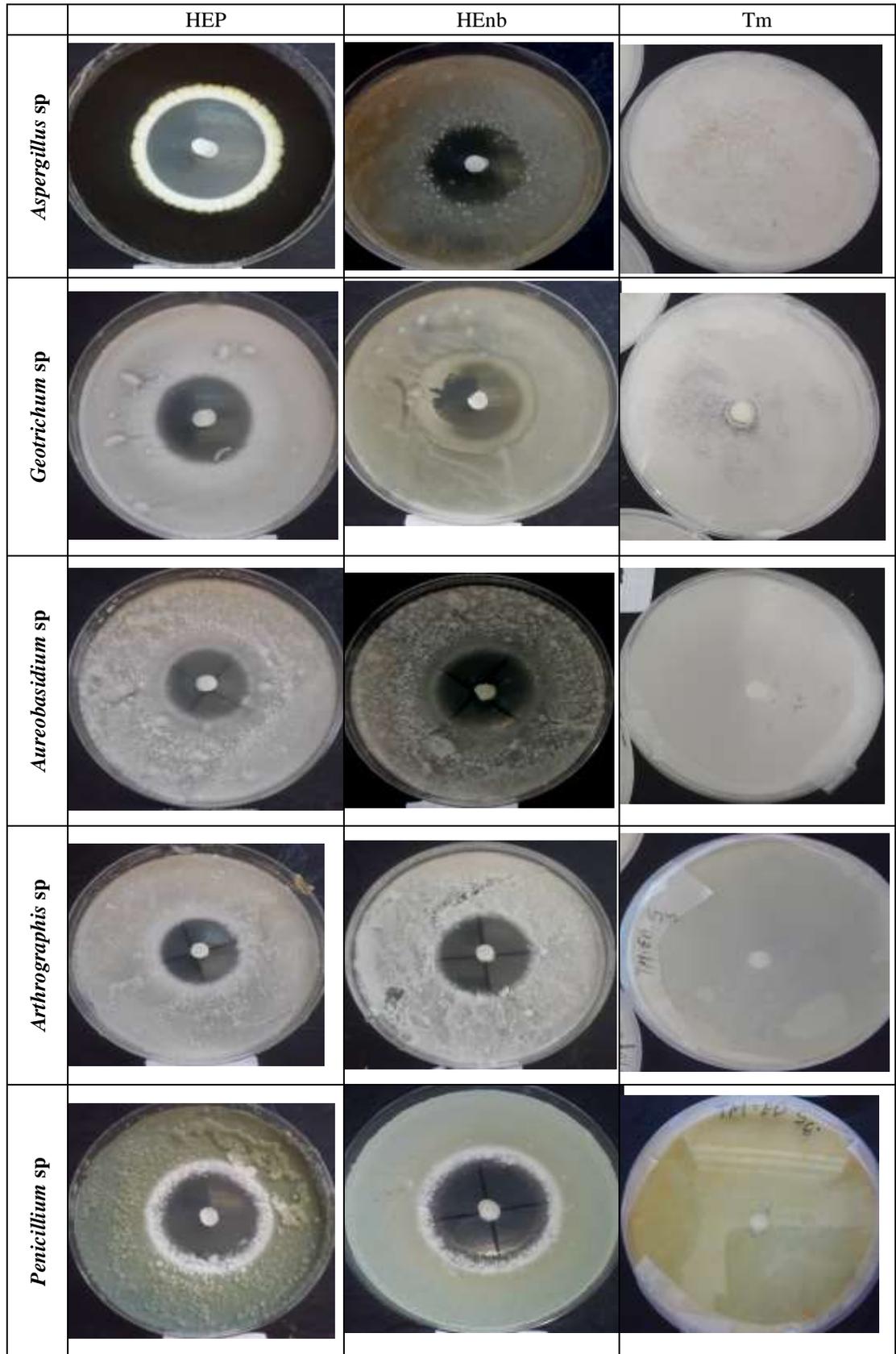


Figure 22 : L'Activité antifongique des extraits sur les champignons. HEP : huile essentiel poudre, HEnb : huile essentiel non broyé et Tm : l'eau physiologie.

Les huiles essentielles extraites et utilisées dans notre expérience ont montré un pouvoir antifongique très élevé sur toutes les espèces fongiques testées. Le diamètre des zones d'inhibition allant de $27,33 \pm 2,30$ à 50 ± 10 mm. Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Rana, et *al.*, (2011). Dans une étude de criblage préliminaire indiquent clairement que l'huile essentielle de clou de girofle est hautement antifongique vis-à-vis de toutes les espèces fongiques testées. Une variation considérable de la taille des zones d'inhibition allant de 12 à 22 mm a été observée parmi les isolats fongiques en fonction de leur sensibilité à l'huile essentielle de clou de girofle. L'ordre de sensibilité décroissant était : *Mucor* sp. 22mm > *M. gypseum* 18mm > *F. moniliforme* 15mm > *T. rubrum* 15mm > *Aspergillus* sp. 12mm.

Razzouk et *al.*, (2022). ont montré que *A. niger* a la sensibilité la plus élevée aux huiles essentielles de clou de girofle (diamètre d'inhibition de 44,00 mm) par rapport aux levures *C. albicans* 14,00 mm et *C. glabrata* 24,67mm.

Ceci peut s'expliquer par la forte teneur des HEs en principe actif qui peut être probablement l'un des composés aromatiques volatils. En effet, l'HE du clou de girofle possède une composition chimique riche en Eugénol qui présente le constituant principal avec un pourcentage d'environ 83,02 % et de 85,3%, (Yage et *al.*, 2011) et (Pento et *al.*, 2009) respectivement.

L'activité antifongique des distillats (hydrolats) a été moins forte si on la compare avec celle des HE. Cela peut s'expliquer par leur faible teneur en composants actifs. Plusieurs travaux confirment nos résultats et indiquent que pour que l'hydrolat soit plus efficace, on doit l'utiliser en forte concentration. Selon les travaux de Hussien et *al.*, (2011). Bien que la composition chimique des hydrolats n'ait pas été bien élucidée, on sait qu'ils contiennent des composants solubles dans l'eau et des gouttelettes micronisées de molécules d'huile essentielle (Suzanne, 2001). dissoutes dans la solution d'hydrolat. Cela indique que la composition chimique des hydrolats d'épices diffère de celle des huiles essentielles pures. Peu de rapports sur l'analyse des composants volatils dans les hydrolats et les huiles essentielles pures respectives ont révélé la présence d'une concentration extrêmement faible du principal composant volatil dans les hydrolats (Inouye et *al.*, 2008). Cette différence pourrait suggérer que l'intensité de l'activité antimicrobienne des hydrolats n'est pas toujours la même que celle de l'huile essentielle.

II.3.2. Résultats de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est effectuée *in vitro* sur un milieu gélosé solide Muller Hinton par la méthode de diffusion sur disques, qui permet de mesurer l'efficacité des extraits à inhiber la croissance microbienne (figure : 24). Le diamètre de la zone d'inhibition a été mesuré (mm) et classé selon les normes comme suit : $\emptyset < 08$ mm : non sensible ; $09 \leq \emptyset \leq 14$ mm : sensible ; $15 \leq \emptyset \leq 19$ mm : très sensible et $\emptyset \geq 20$ mm : extrêmement sensible (Razzouk et *al.*, 2022).

Les résultats de ce teste sont présentés dans l'histogramme ci - dessous (figure 23). La plupart des extraits ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis la croissance de la souche bactérienne isolée B1, avec des diamètres de zones d'inhibition allant de 8,00 mm à 20 mm. En effet, les huiles du clou de girofle (HEp et HEnb) ont montré une activité antimicrobienne très satisfaisante et ont le même pouvoir inhibiteur de gentamicine (Témoin positif) avec un diamètre de 20 mm. Aussi, les extraits (Mchp, Mchnb et Mfrp) ont été plus ou moins efficaces avec des diamètres très proches, 10mm, 08mm et 09mm successivement. Tandis que, les extraits (Mfrnb, Disp et Disnb) n'ont pas montré d'effet inhibiteur sur la B1.

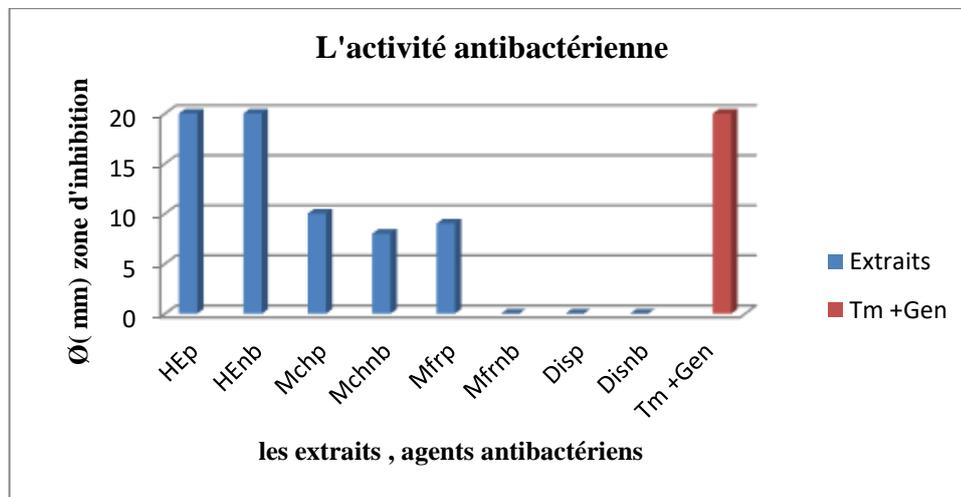


Figure 23 : Histogramme de l'activité antibactérienne des extraits. HEp : huile essentiel poudre, HEnb : huile essentiel non broyé, Mchp : macérât a chaud poudre, Mchnb : macérât a chaud non broyé, Mfrp : macérât a froid poudre ; Mfrnb : macérât a froid non broyé, Disp : distillat poudre et Disnb : distillat non broyé, et Tm+ : antibiotique Gentamicine.

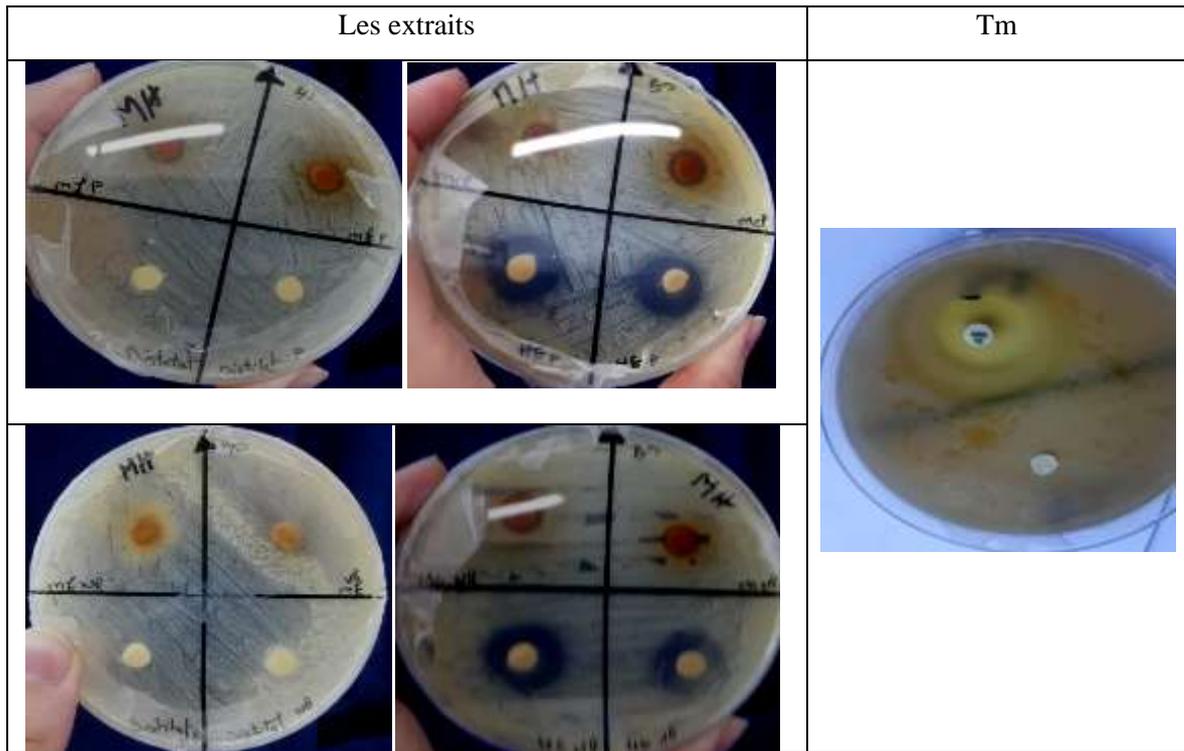


Figure 24 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis la bactérie B1.

Après analyse de l'histogramme ci-dessus, les résultats montrent que nos extraits agissent comme un agent antimicrobien avec de différentes efficacités vis-à-vis la souche B1 à Gram - exprimées par différents diamètres d'inhibition allant de 0 à 20 mm. Ce qui signifie que cette dernière est sensible à quelques extraits du clou de girofle. Mathieu et Jean-Philippe (2013), confirment cette sensibilité bactérienne dans leurs travaux sur l'extrait de Clou de girofle contre 06 souches différentes d'*E. coli* où les zones d'inhibition égale de $16,8 \pm 0,02$ mm. Hiwandika et *al.*, (2021), ont montré que le clou de girofle présente une capacité d'empêcher la croissance de *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* avec des diamètres d'inhibition égales de $14,6 \pm 0,37$ mm, $15,8 \pm 0,41$ mm, $13,4 \pm 0,11$ mm et $11,9 \pm 0,34$ mm, respectivement.

Nos résultats montrent que les HE des bourgeons de girofle moulus et non moulus ont un effet antibactérien significatif. Ce qui coïncide avec les travaux de Ben Hassine et *al.*, (2021). qui démontrent que l'HE des bourgeons de clou de girofle était très active contre les bactéries Gram + et Gram- avec un diamètre de zone d'inhibition compris entre $17,2 \pm 4,5$ et $35,5 \pm 2,6$ mm. Ponce et *al.*,(2003), ont montré dans leurs étude du sensibilité de la microflore native de la bette à carde à 12 huiles essentielles différentes, déterminée par la méthode de diffusion sur gélose, a montré que le clou de girofle produisait un halo

d'inhibition de $22,2 \pm 2$ mm de diamètre, ce qui en faisait de cette huile avec l'effet inhibiteur le plus élevé en le comparant avec les huiles de l'eucalyptus, à l'arbre à thé, au romarin, au citron et à la menthe qui ont montré une sensibilité également appréciable, avec des zones d'inhibition de diamètres respectifs de 16 ± 1 , 17 ± 2 , 15 ± 1 , 17 ± 1 et 17 ± 1 mm. (Deans, et al., 1995), L'huile essentielle de clou de girofle *Syzygium aromaticum* L. ont montré une activité antimicrobienne significative contre une collection de 25 genres différents de bactéries testées et 20 isolats différents de *Listeria monocytogenes*. ce qui signifie qu'elle a un large spectre contre les bactéries.

L'activité des autres extraits (Macérats) était moins efficace que celle de l'HE à cause de leur faible teneur en composants actifs qui restent emprisonnés peut être dans les bourgeons du clou de girofle ou évaporés sous l'effet de la chaleur. L'absence totale de l'activité antibactérienne chez les distillats vis - à -vis la souche bactérienne testée B1 peut s'expliquer de la même manière que celle des souches fongiques. Les actions antibactériennes des hydrolats, sont souvent observées à de fortes concentrations. Hussien et al. (2011). montré que l'hydrolat d'*Elettaria cardamomum* (cardamome) utilisé à 15% (v/v) pouvait inhiber la croissance de *Salmonella typhi*, *S. aureus* et *E. coli*. Néanmoins, cette concentration n'inhibe la croissance de *P. aeruginosa* que de 10%. Ces informations montrent, à ce jour, que l'action antimicrobienne des hydrolats reste limitée du fait de la forte concentration de produit nécessaire à l'obtention de l'effet désiré. Les résultats de notre étude ressemblaient à ceux référencés où les zones d'inhibition étaient généralement satisfaisantes surtout pour l'HE.

II.4. les résultats de la concentration minimale inhibitrice

II.4.1. Résultat de la concentration minimal inhibitrice fongiques CMI F

La CMI relative aux extraits des HEs appliquées comme agents antifongiques sur les souches fongiques testées : *Aspergillus* sp, *Geotrichum* sp, *Aureobasidium* sp, *l'Arthrographis* sp et *Penicillium* sp par la méthode de contact directe sur le milieu de culture (SDA) a été évaluée en mesurant le pourcentage d'inhibition de la croissance de ces moisissures sous l'effet de différentes concentrations d'HE du clou de girofle (broyé / non broyé) par rapport à la croissance du témoin. Après sept jours d'incubation à 25°C, nous avons obtenu les résultats qui sont représentées par l'histogramme ci – dessous (figure:25)

Nous avons observé qu'aucunes des souchesensemencées ne s'est développée dans les boîtes. Tandis que, dans les témoins, en absence d'agent antifongique, les souches ont montré une croissance satisfaisante avec un diamètre de développement allant de 65 à 80 mm,

(figure : 26). Ce qui signifie que toutes les concentrations des huiles essentielles (HEp, HEnb) appliquées ont inhibé complètement la croissance mycélienne des cinq souches étudiées. Donc, on peut constater que la CMI F est inférieure à 2,5 $\mu\text{l/ml}$.

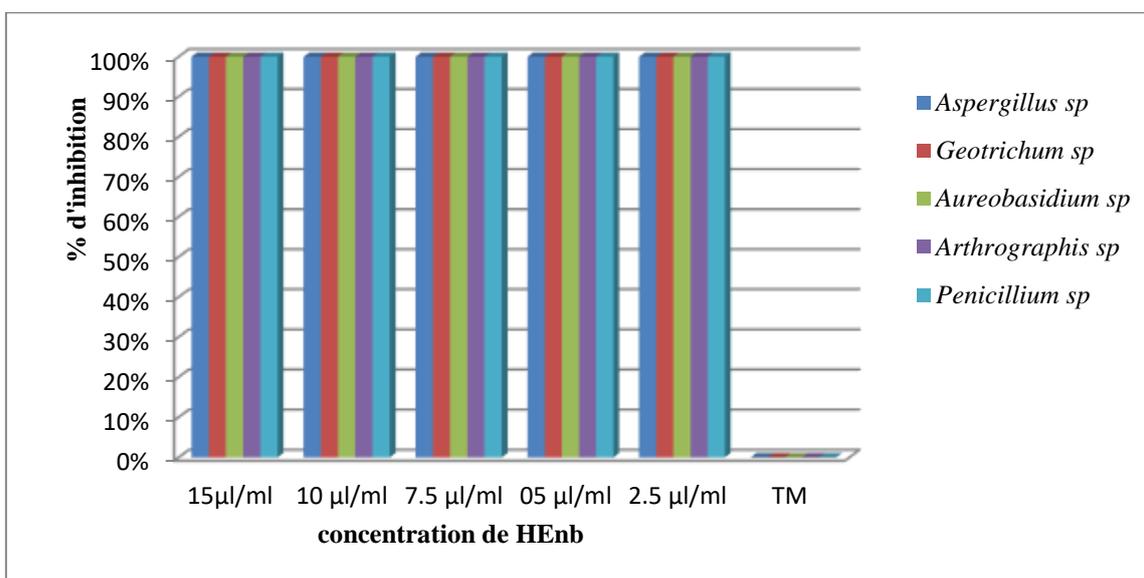
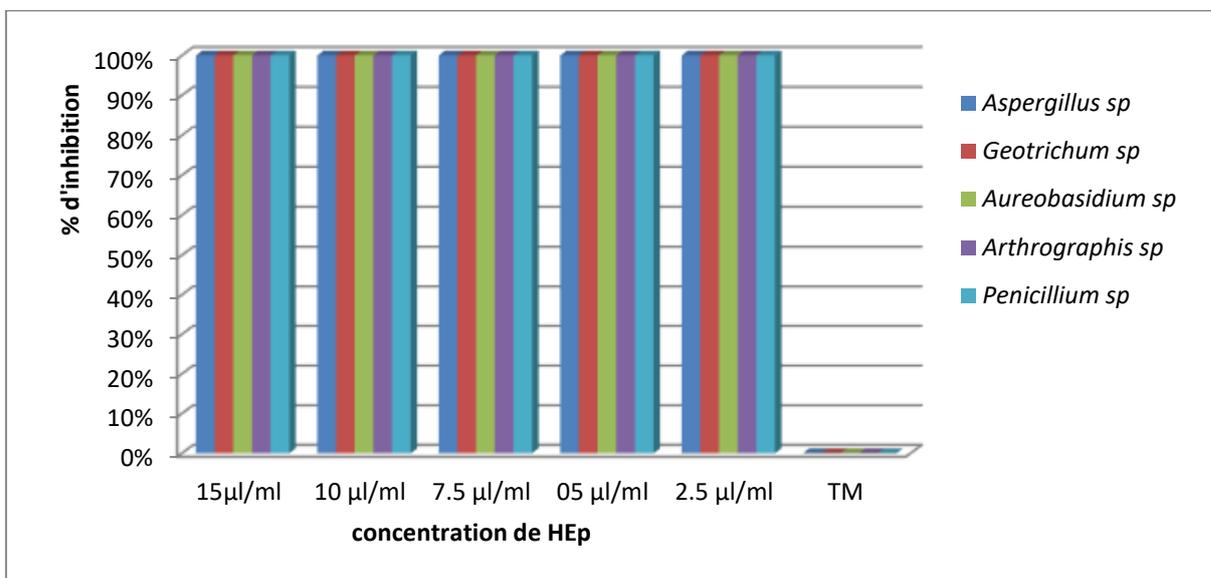
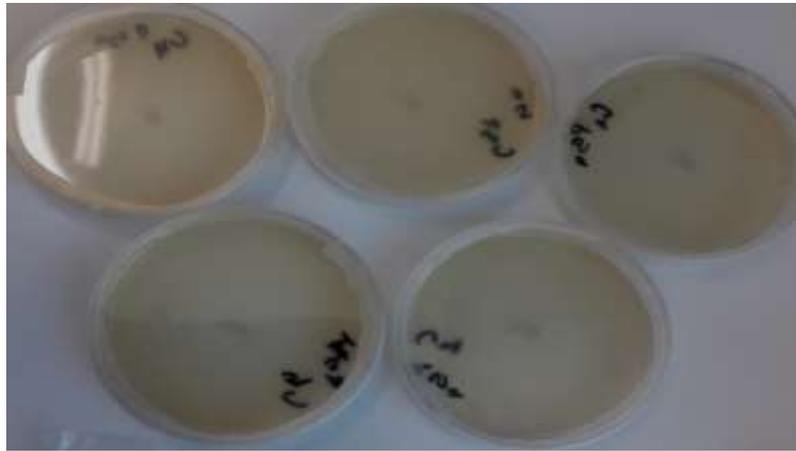


Figure 25 : Histogramme de la concentration minimal inhibitrice des fongique CMI F de HES

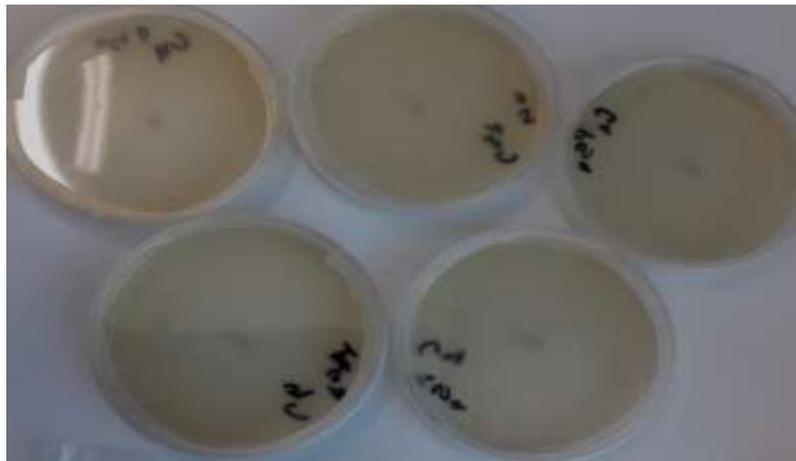
Aspergillus sp



Geotrichum sp



Aureobasidium
sp



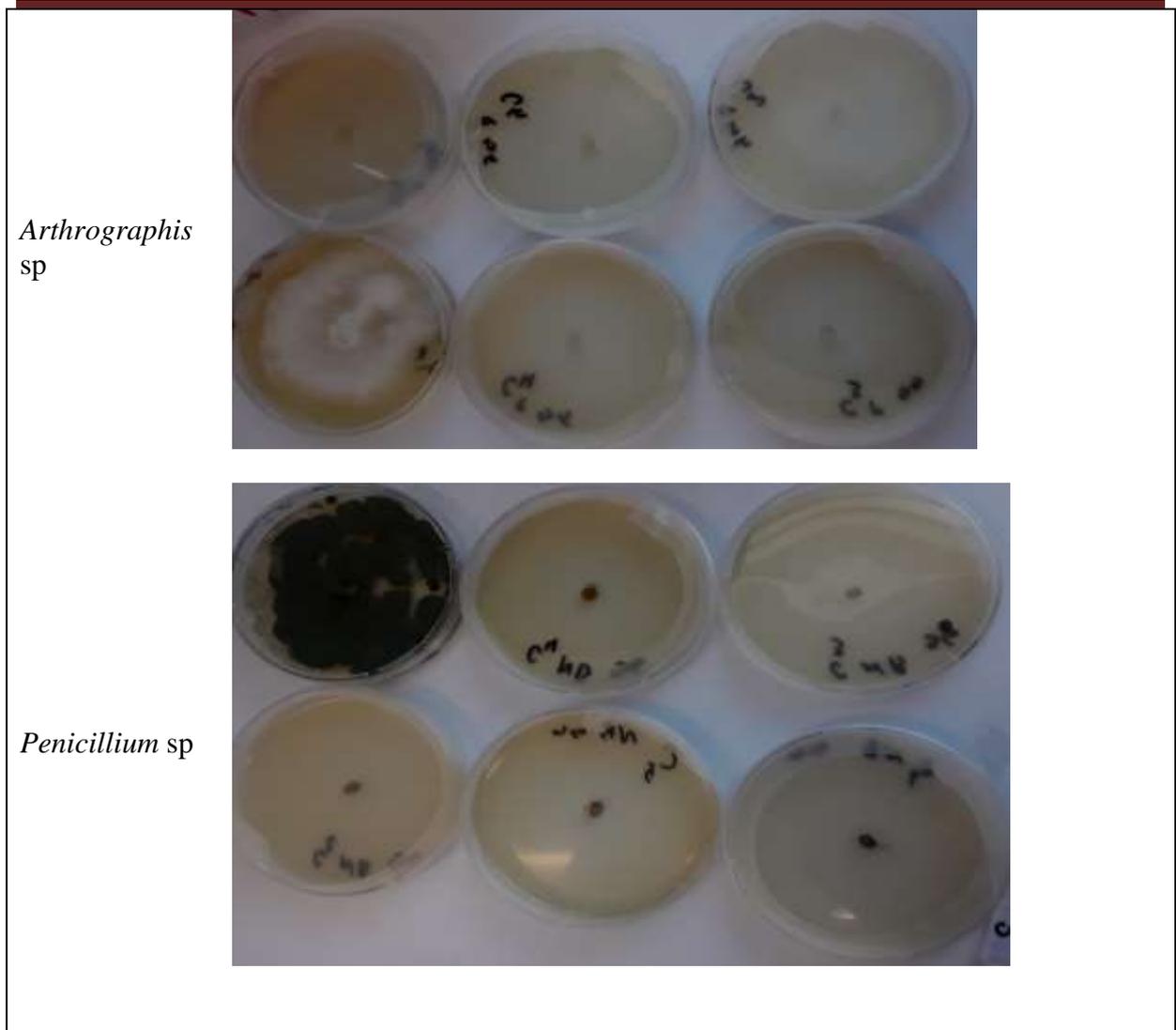


Figure 26: Résultats de la concentration minimale inhibitrice fongique CMI F.

Les résultats de l'évaluation de la CMI F de notre étude *in vitro* expriment une très forte activité antifongique des deux HEs vis-à-vis les cinq souches testées avec un pourcentage d'inhibition de 100% et à des concentrations très minimales allant de 15 $\mu\text{l/ml}$ jusqu' à 2,5 $\mu\text{l/ml}$. Ces résultats prouvent que l'HE peut agir à des concentrations inférieures à 2,5 $\mu\text{l/ml}$ et confirment d'autres travaux antérieurs sur le pouvoir antifongiques comme ceux de Pinto et al., (2009), qui ont trouvé une CMI F de l'huile du clou de girofle appliquée sur l'*Aspergillus* sp. de 1,25 $\mu\text{l/ml}$ et ceux de Uwineza et al.,(2018). avec une CMI F de 0,312 $\mu\text{l/mL}$ sur le *Fusarium culmorum*. Et ceux de Deans, et al., (1995) où L'huile a été testée également contre trois souches fongiques : un phytopathogène, un type d'altération et une souche mycotoxigène. Cela a entraîné des niveaux élevés d'inhibition de la croissance aux deux concentrations de 1 et 10 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de milieu de croissance.

Par contre, la valeur de CMI F de notre expérience était inférieure à celle trouvée par Yage et *al.*, (2011), qui ont révélé que l'huile de girofle possédait des activités antifongiques très fortes contre *A. flavus* et *P. citrinum* avec une CMI F de 25 µL/mL.

Ces résultats ont indiqué que l'huile de clou de girofle a montré un large spectre d'activité contre une variété de champignons phytopathogènes. Elle s'est avérée plus active et les valeurs de CMI F trouvées étaient similaires pour toutes les souches isolées à partir de la tomate. Donc, grâce à ce bon potentiel, on peut l'utiliser comme un agent antifongique naturel pour les applications dans la lutte contre les phytopathogènes présentes dans les fruits de tomates comme le prouvent les études de Yage et *al.*, (2011). *in vivo*, les traitements à l'huile de clou de girofle ont considérablement réduit la décomposition fongique, et cette huile à une concentration de 3,0 % a montré un contrôle complet d'*A. flavus* et de *P. citrinum* dans les fruits inoculés par blessure.

De nombreuses études affirment que les propriétés fongistatiques et fongicides de l'huile sont probablement associées à sa forte teneur en eugénol. Pinto et *al.* (2009) ont étudié l'activité antifongique de l'huile essentielle de clou de girofle, obtenue à partir de *S. aromaticum*. Ils ont déterminé la CMI F pour évaluer l'activité antifongique de l'huile de clou de girofle et de son composant principal, l'eugénol, contre les souches cliniques *Candida*, *Aspergillus* et dermatophytes. L'huile essentielle et l'eugénol ont montré une activité inhibitrice contre toutes les souches testées.

II.4.2. Résultats de la concentration minimale inhibitrice bactérienne CMI B

Les deux huiles essentielles de clou de girofle broyé et non broyé à des concentrations décroissantes par la méthode de diffusion sur le milieu PCA n'ont présenté un effet inhibiteur sur la souche bactérienne testée B1 à Gram- qu'avec la concentration de 15 µl/ml. L'action inhibitrice se traduit par l'apparition d'une zone autour du disque de papier Watman imprégnée d'extrait d'HEs avec de petits diamètres d'inhibition de 08 mm et 10 mm comme le montre la courbe (figure : 27 et 28).

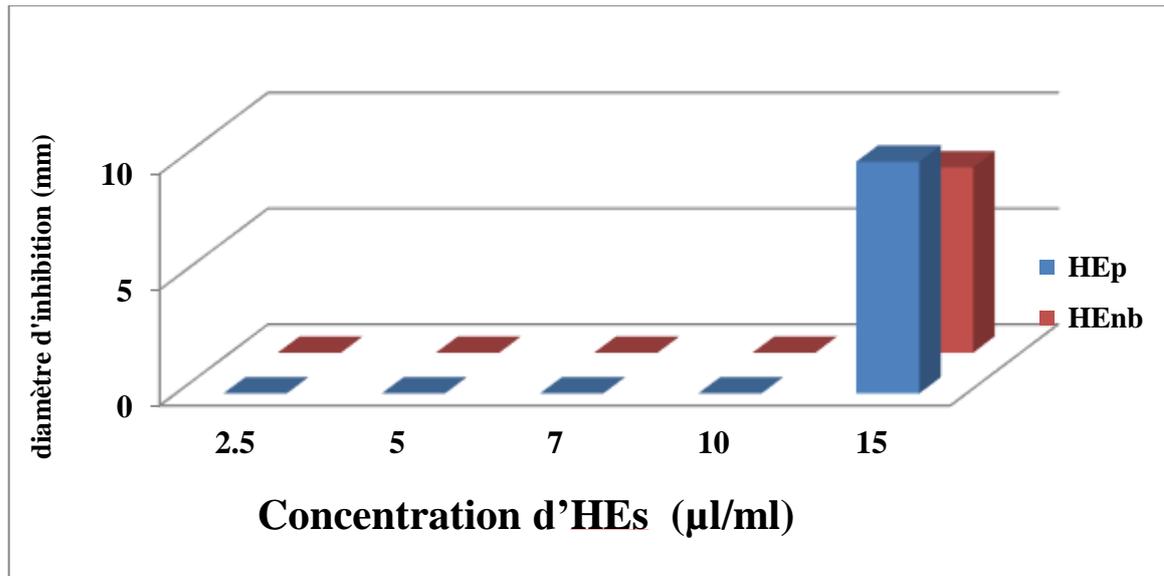


Figure 27 : Résultat de la concentration minimale inhibitrice bactérienne de B1 CMI B.

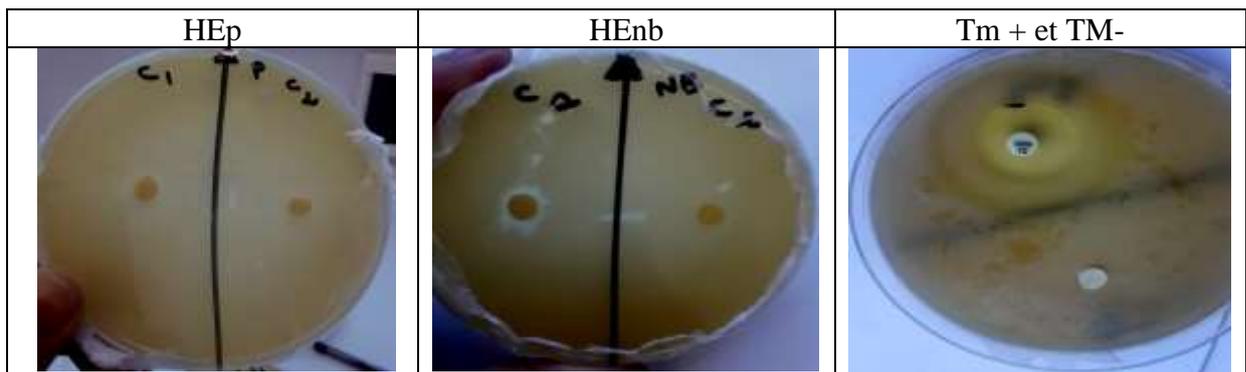


Figure 28: résultat de la concentration minimale inhibitrice bactérienne de B1 CMIB.

À partir des résultats enregistrés, avec la concentration de 15µl/ml, les deux extraits de l'huile ont agi plus ou moins positivement en inhibant la croissance de la souche bactérienne B1, mais le pouvoir antimicrobien le plus élevé a été observé chez l'huile non broyée avec un diamètre de 10mm. Ce qui signifie que la CMI B est égale à 15µl/ml. En effet, dans une étude similaire *in vitro*, il a été démontré que les valeurs de CMI B de l'huile de clou de girofle et de l'eugénol vis-à-vis de *Bacillus cereus* étaient de 25 et 15 µg/mL, Cette activité pourrait être attribuée au composé majeur « eugénol >85% » (Ben Hassine et al., 2021). La CMI B était plus grande que celle trouvée dans d'autres travaux. Kim et al,(2015). ont rapporté que la CMI B de l'HE de clou de girofle pour 10 souches de *Salmonella enterica* et 10 souches de *Listeria. monocytogenes* sont de 0,6 µg/mL à 2,5 µg/mL,

En comparant les résultats de la CMIB de la souche B1 de notre expérience avec celles des souches testées dans les autres travaux précédents, On peut déduire que cette bactérie s'est montrée moins sensible que les autres souches. Cette différence de sensibilité pourrait être attribuée à la structure membranaire des bactéries à Gram-.

II.4.3. Résultat de test micro-atmosphère

L'objectif de l'étude présentée ici était d'acquérir des connaissances sur l'activité antimicrobienne en phase vapeur des huiles essentielles sélectionnées et de leurs principaux constituants potentiellement actifs contre une gamme de souches fongiques d'origine alimentaire. Dans une première étape, les activités antimicrobiennes en phase vapeur de deux huiles essentielles HEp et HEnb ont été évaluées contre les moisissures isolées (*Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Aureobasidium* sp, *Geotrichum* sp et *Arthrographis* sp) (figure 30).

Au fur et à mesure que la concentration en huile augmente, le taux d'inhibition de la croissance des champignons s'élève comme le montrent l'histogramme (figure 29). À la plus faible concentration de 2,5 µl/ml, les deux huiles testées HEp et HEnb ont montré une activité antifongique très faible à l'égard de toutes les souches qui varie entre 0% et 30,76%, surtout pour le *Penicillium* sp avec un taux d'inhibition de 7,14% et 0% respectivement pour les deux huiles. Alors que, la concentration 15 µl/ml de l'HEnb semblent être très efficaces contre les différents isolats testés. Nous avons enregistré des pourcentages d'inhibitions allant de 21,42 et 56,92 %, où *Aureobasidium* sp apparaît le plus sensible. En revanche au l'effet inhibiteur de la concentration 15µl/ml de HEp, Les pourcentage d'inhibitions ont été enregistré allant de 28,57 et 61,53%. Sur le plan des individus, *Arthrographis* sp. était le plus sensible.

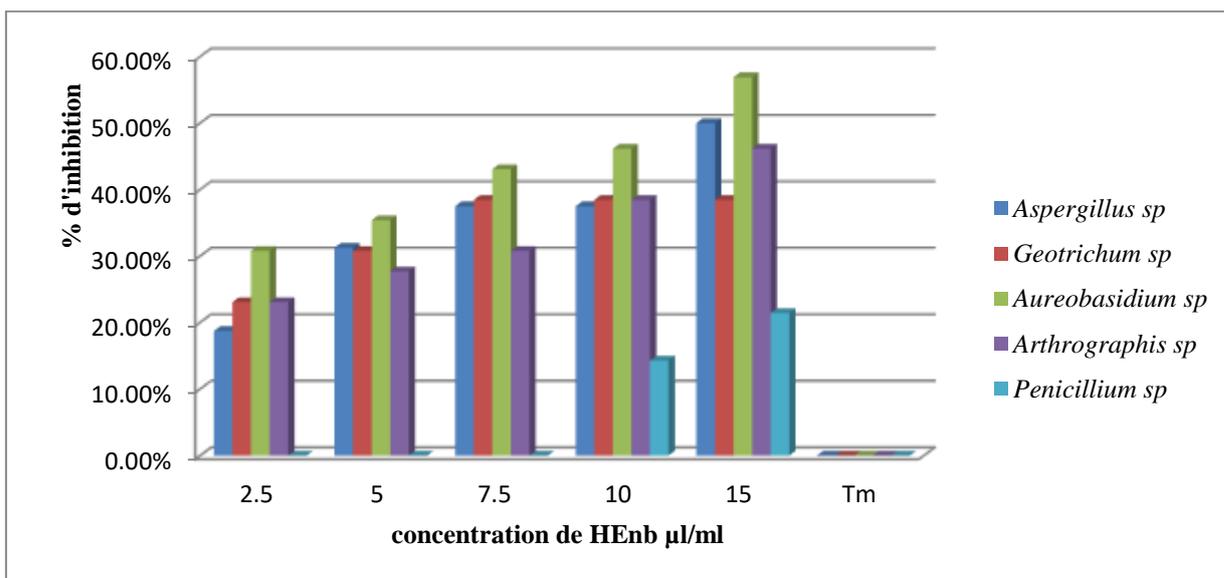
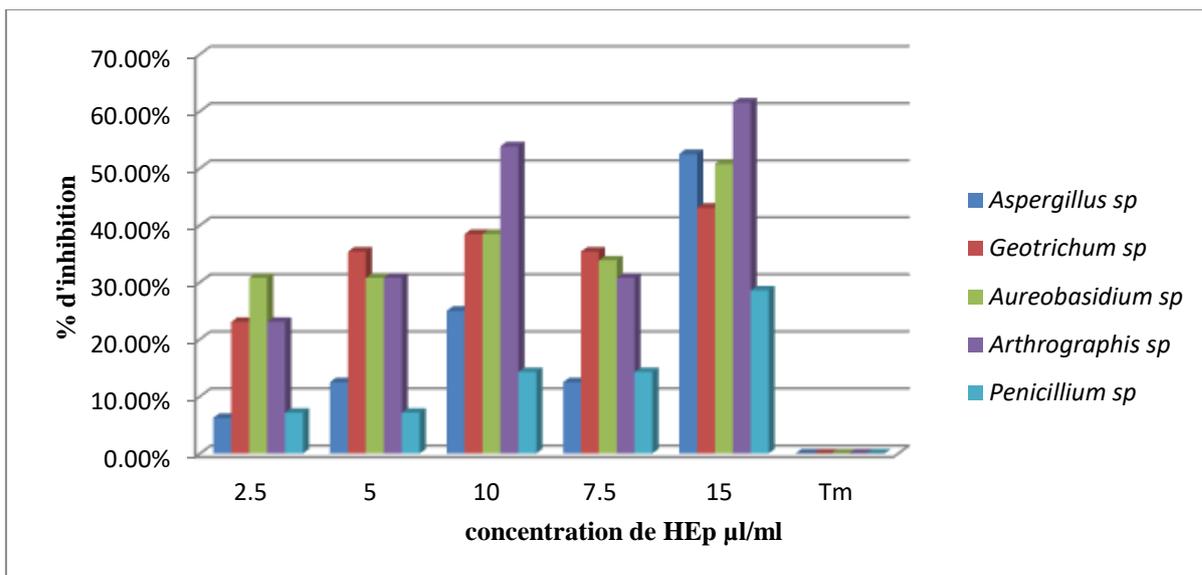


Figure 29 : Histogrammes de l'activité antifongique par la micro-atmosphère de HEs.

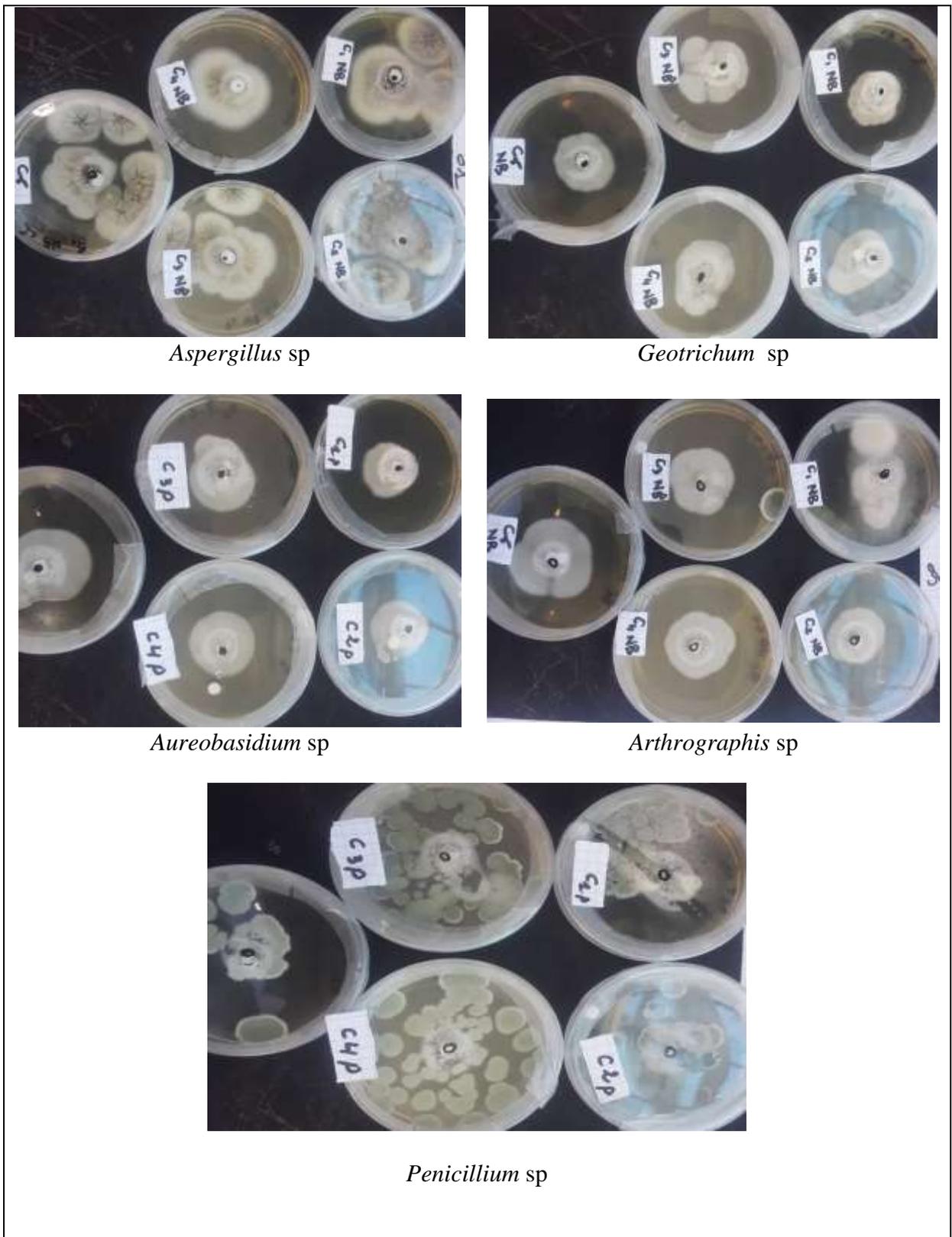


Figure 31 : Résultat de test micro-atmosphère.

Notre étude sur le pouvoir antifongique des huiles essentielles de clou de girofle vis-à-vis des cinq champignons causant la pourriture des tomates par la méthode micro-atmosphère révèle que l'activité de l'HEp était légèrement supérieure à celle de l'HEnb. Une proportion directe entre l'inhibition de la croissance des souches et les concentrations des deux huiles. En effet, une analyse antimicrobienne in situ utilisant du pain a montré que les champignons filamenteux microscopiques du genre *Penicillium* étaient inhibés par les vapeurs d'huile essentielle de clou de girofle à toutes les concentrations testées. (Kacáňiová et al., 2021). Hmiri et al., (2011). Pour évaluer l'activité antifongique des huiles essentielles ont choisis la méthode de micro-atmosphère décrite par Neri et al., (2006). En présence d'eugénol, les champignons testés (Les moisissures *A. alternata*, *B. cinerea* et *P. expansum*) ont manifesté une sensibilité relative ; *B. cinerea* a été inhibé à partir d'une concentration de 156 µl/l, alors que *A. alternata* et *P. expansum* ont résisté jusqu'à 300 µl/l. En effet, Neri et al. (2006). et Amiri et al., (2008). ont également rapporté que l'eugénol peut exercer, en fonction de sa concentration, une activité fongistatique ou fongicide sur *B. cinerea* et *P. expansum*. Les travaux de He et al., (2007). et Chami (2005). ont montré l'activité antifongique in vitro et in vivo de l'eugénol sur *Candida albicans*.

L'analyse des résultats obtenus dans les deux méthodes (contact direct et volatile) montre qu'il y a une grande différence. Pour la première, il y avait une inhibition totale 100% des souches testées à de faibles concentrations 2,5 µl /ml d'HE. Par contre, L'HE utilisée dans la méthode de micro-atmosphère avait présenté un effet inhibiteur à une concentration de 15 µl /ml qui était moins efficace sur toutes les souches allant de 21,42% à 61,53%.

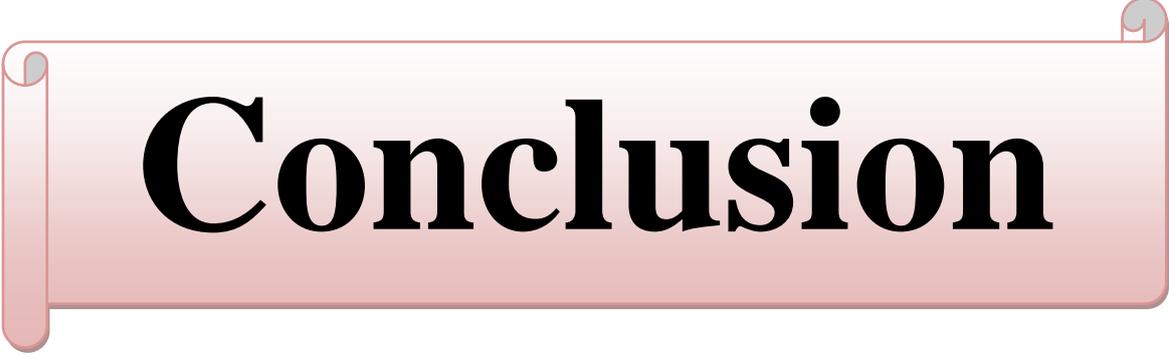
Donc, on peut dire qu'il y a des différences au niveau de la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis des huiles en comparaison avec la méthode de contact direct. Comme l'explique les travaux de Bouzidi et al., (2019), ces différences peuvent s'expliquer, au moins en partie, par la différence de composition entre la phase liquide de l'HE utilisée dans la méthode contact direct et la phase vapeur, mise en œuvre dans la technique de micro atmosphère et d'autre part, par la concentration d'HE utilisée. Il serait probable que les vapeurs des HEs sont moins efficaces par rapport au contact direct. L'activité antimicrobienne des HEs est principalement fonction de leurs compositions chimiques, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent sur les moisissures en inhibant la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production des toxines. (Mandras et al., 2016). Les différentes activités antifongiques en liquide et en vapeur phase pourraient être dues aux caractéristiques des huiles essentielles telles que hydrophobicité et volatilité élevées. En fait, lorsqu'il est ajouté à un support, l'huile essentielle se répartit plus

ou moins dans la phase aqueuse en fonction de son hydrophobicité relative. En phase liquide, l'activité dépend de la diffusibilité et la solubilité des huiles essentielles dans le milieu en le test de vapeur dépend de la volatilité. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et de leurs composants est influencée par plusieurs facteurs, y compris chimiques compositions et conditions expérimentales.

La composition des huiles essentielles varie considérablement en raison de plantes différentes espèces et chémotypes, origine géographique, saison et procédure d'extraction. En effet, l'HE de clou de girofle obtenu avec un rendement de 12,8% a été analysé par GC et GC-MS, et les résultats ont présenté la composition chimique suivante. Au total, 22 composants de l'huile essentielle ont été identifiés, représentant 95,80% de la quantité totale. L'eugénol (76,23%) s'est avéré être le composant principal de l'huile essentielle, suivi du β -caryophyllène (11,54%), de l'oxyde de caryophyllène (4,29%) et de l'acétate d'eugénol (1,76%). (Xu et al., 2016).

Les activités antimicrobiennes des HEs sont fortement associées à la présence des composés majeurs, à savoir le citral, le carvacrol, le thymol et l'eugénol qui appartiennent au phénol montre une activité significative. Ces composés phénoliques agissent efficacement comme perméabilisateurs membranaires, ils sont responsables de maximiser l'activité antimicrobienne à travers divers aspects, y compris l'altération de la perméabilité de la membrane, les changements d'acides gras membranaires et l'inhibition de la force motrice des protons (Bhavaniramy et al., 2019). Il existe certains mécanismes d'inhibition de l'eugénol et de l'HE de clou de girofle pour empêcher la croissance de diverses bactéries, telles que l'inhibition de la migration bactérienne, l'adhésion bactérienne, le métabolisme bactérien et l'invasion bactérienne. Chez *E. coli* (O157 : H7), l'eugénol inhibe significativement l'expression des gènes liés à la migration, des gènes de virulence et des gènes d'adhésion (Hu et al., 2018). De plus, l'eugénol peut inhiber le quorum sensing de *P.aeruginosa*, et cette fonction est associée à l'inhibition de la production de facteurs de virulence en inhibant le biofilm (Zheng et al., 2007).

D'une autre part, pour les champignons, les analyses chromatographiques ont montré que l'eugénol était le principal composé responsable de l'activité antifongique par la lyse des spores et des micelles, la perturbation membranaire et de déformation des macromolécules. (Devi et al., 2001). Des changements morphologiques dans les hyphes de *T. mentagrophytes*, tels que des dommages à la paroi cellulaire, des modifications de la structure cellulaire fongique au niveau de la membrane, l'expansion de son réticulum endoplasmique et les membranes mitochondriales internes ont été partiellement détruites (Park et al., 2007).



Conclusion

Conclusion

Les substances naturelles constituent de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit. Le présent travail est porté sur l'étude des principes actifs des boutons floraux de la fameuse épice de *Syzygium aromaticum* L. connue sous le nom de giroflier. Différentes techniques d'extraction comme l'hydro distillation, la macération à chaud et à froid appliquées sur les clous de girofle ont donné naissance à différents extraits : Huileux et aqueux. Le clou de girofle broyé (poudre) a donné le meilleur rendement en huiles essentielles par Hydro-distillation de l'ordre de (5,06%). La mise en évidence de leurs potentiels antibactériens par un test de sensibilité effectué *in vitro* sur de nombreux types de micro-organismes de source alimentaire (tomate) a montré que les huiles de clou de girofle et ses composants volatiles expriment des effets inhibiteurs significatifs et à des concentrations très minimales que ce soit à l'état liquide ou vapeur et avec plus d'efficacité en les comparant avec les autres extraits. Lorsque l'HE extrait des bourgeons de girofle broyés s'est montrée très efficace surtout sur *Penicillium* sp, avec le plus grand diamètre de zone d'inhibition (\pm mm) La technique de micro-atmosphère a révélé que l'effet inhibiteur le plus remarquable est donné par la phase vapeur de l'HE de clou de girofle non broyé.

Donc, à partir de cette étude, on peut conclure que cette huile essentielle avec sa principale composition volatile et efficace, l'eugénol, est le constituant principal responsable des puissantes propriétés antimicrobiennes et qu'elles pourraient avoir une meilleure action *in vivo* sur l'incidence de la détérioration ou pourriture des tomates. Par conséquent, Les perspectives dégagées de cette étude sont multiples. Les études devraient être renforcées pour promouvoir leurs effets antiseptiques et protecteurs, faire un fractionnement de ces huiles pour savoir les molécules responsables de cette activité et leurs mécanismes d'action, élargir la gamme des souches microbiennes et connaître les doses prescrites avec précision car leur application en agriculture est une approche alternative qui permet de réduire l'utilisation des produits synthétiques tout en minimisant le coût de la production et les impacts négatifs sur l'environnement .

Les références :

1. **A J Vlietinck, D A et Vanden Berghe, (1991).** Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs, **10.1016/0378-8741(91)90112-q**
2. **AFNOR** Recueil des normes françaises ;(**1992**) . Huiles Essentielles -Association Française de Normalisation, 4ème édition, Paris.
3. **AG Ponce a, R. Fritz b, C. del Valle b et SI Roura c (2003).** Activité antimicrobienne des huiles essentielles sur la microflore native de la bette à carde bio. *LWT - Science et technologie alimentaires* Tome **36**, N° 7, pages 679-684.
4. **Amiri A., R. Dugas, A.L. Pichot et G. Bompeix, (2008).** *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *Intern. J. Food Microbiol.*, **126**, 13-19. France.
5. **Ben Abdalla. R, Frikha D, Maalej S et Sassi S. (2019).** Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines. *J.I. M. Sfax.*, N°**31**; P 38 – 44. Tunisie.
6. **Bessadat, N., Simoneau, P., Benichou, S., Setti, B., Kihal, M., et Henni, D.E. (2014).** Morphological, physiological and pathogenic variability of small-spore *Alternaria* sp. causing leaf blight of Solanaceous plants in Algeria. *Afr J Microbiol Res*, **8**, 3422-3434 Algeria.
7. **Biyiti, L.F., Meko, D.J.L. et Zollo, P.H.A. (2004).** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaises. *Pharmacologie et Medecine Traditionnelle en Afrique*, **13**, 11-20.
8. **Boukhatem Mohamed Nadjib, Ferhat Amine et Kameli Abdelkrim, (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles. *Revue Agrobiologia* **9** (2): 1653-1659. Algeria.
9. **Bruce A McDonald et Celeste Linde, (2002).** Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* Vol. **40**:349-379 doi:10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443.
10. **Chami F., (2005).** Évaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo*. Application dans la prophylaxie et le traitement de la candidose vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de Doctorat, *Faculté des Sciences Dhar El Mehraz*, Fès.

11. **D. Ben Hassine, H. Ben Ismail, C. Jribi, M. L. Khouja, et M. Abderrabba, (2010).**Chemical composition of some Tunisian Eucalyptus essential oils as obtained by hydrodistillation using Clevenger type apparatus,” *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, vol. **7**, no. **2**, pp. 647–656.
12. **Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R et Pandian SK.(2010).** Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J Ethnopharmacol*; **130**(1):107–115.
13. **Dominique Blancard, Henri Laterrot, Georges Marchoux et Thierry Candresse (2009)** . Les maladies de la tomate. Identifier, connaître, maîtriser. Maison d'édition : *Quæ Versailles* France P : 409 -415.
14. **Dorsaf Ben Hassine , Salma Kammoun El Euch, Rami Rahmani, Nessrine Ghazouani, Rouguiata Kane, Manef Abderrabba et Jalloul Bouajila, (2021).** Clove Buds Essential Oil: The Impact of Grinding on the Chemical Composition and Its Biological Activities Involved in Consumer’s Health Security, *BioMed Research International Hindawi Tunisia* .Volume **2021**, Article ID 9940591, 11 pages.
15. **Dr. Rui Tomé et Dr. Gilberto (2015).** Atlas micologia, Marques Centro Hospitalare Universitário de Coimbra Patologia clinica - *chuc* .portugal.
16. **Eugenia Pinto, Lui’s Vale-Silva, Carlos Cavaleiro et Li’gia Salgueiro, (2009).** Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, **58**, 1454–1462 Portugal.
17. **FAO, (2021).** L'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).
18. **Feyza Oke, Belma Aslim, Sahlan Ozturk et Senol Altundag, (2009).** Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry* **112**(4):874-879, DOI:10.1016/j.foodchem.2008.06.061
19. **Hakima Bouzidi, Zina Lakhlef, Zohra Hellal, et jamel Djenane. (2019).** Le conditionnement des fraises fraîches sous "micro-atmosphère" à base d’huiles essentielles combinées : Effet durant le stockage . *Revue Nature et Technologie*, **11** (2) (2019) : 35-50.
20. **Hamidou Compaore, Hagrétou Sawadogo-lingani, Aly Savadogo, Dayéri Dianou et Alfred S. Traore ,(2016).** Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substances antibactériennes à partir d’aliments locaux au Burkina Faso *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **10**(1): p 198-210, Burkina Faso.

21. **Hanen Falleh, Mariem Ben Jemaa, Marcos A. Neves, Hiroko Isoda, Mitsutoshi Nakajima, Riadh Ksouri (2021)**. Formulation, physicochemical characterization, and anti- *E. coli* activity of food-grade nanoemulsions incorporating clove, cinnamon, and lavender essential oils 129963.
22. **Hee Youn Chee¹, Min Hee Lee, (2007)**. Antifungal activity of clove essential oil and its volatile vapour against dermatophytic fungi **10.4489/MYCO.2007.35.4.241**.
23. **Hu Q, Zhou M et Wei S (2018)**. Progress on the antimicrobial activity research of clove oil and eugenol in the food antiseptics field. *J Food Sci.* **83**(6): 1476–83.
24. **Hussien, J., Teshale, C. et Mohammed, J. (2011)**. Assessment of the Antimicrobial Effects of Some Ethiopian Aromatic Spice and Herb Hydrosols. *Int. J. Pharmacol.* **7**, 635–640. doi : 10.3923/ijp.2011.635.640.
25. **Ignacio Gutiérrez-Del-Río, Javier Fernández, Felipe Lombó, (2018)**. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols 10.1016/j.ijantimicag.**04.024**.
26. **Inder Singh Rana, Aarti Singh Rana et Ram Charan Rajak. (2011)**. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *syzygium aromaticum* (L) by extraction, purification and analyses of its main component eugenol. *Brazilian Journal of Microbiology* **42**: 1269-1277 India.
27. **Inouye S, Takahasi M et Abe S ,(2008)**. Une étude comparative sur la composition de quarante quatre hydrolats et leurs huiles essentielles. *Int J Essent Oil Ther* **2** : 89-104.
28. **J. C. F. Johner, T. Hatami, P. I. N. Carvalho, et M. A. A. Meireles,(2018)**. Impact of grinding procedure on the yield and quality of the extract from clove buds using supercritical fluid extraction, *Open Food Science Journal*, vol. **10**, no. 1, pp. 1–7.
29. **Jacques Kaloustian et Francis Hadji-Minaglou, (2012)**. La connaissance des huiles essentielles qualilogie et aromathérapie Entre science et tradition pour une application médicale. *raisonnée* © Springer-Verlag France.
30. **Jean-Fabrice Yala, Véronique Ntsameso-mve-mba, Yves Azzizet Issembe ; Nicaise Alexis Lepengue ; Alain Souza. (2016)**. Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'Eryngium foetidum récolté dans la ville de Franceville. *Journal of Applied Biosciences* **103**:9886 – 9893.
31. **Jian-Guo Xu, Ting Liu, Qing-Ping Hu et Xin-Ming Cao (2016)**. Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil

- against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Molecules*, **21**(9), 1194
doi.org/10.3390/molecules21091194.
32. **Kacániová, M; Galovicová, L; Borotová, P; Valková, V; Dúranová, H; Kowalczewski, P.L. Said-Al Ahl, H.A.H; Hikal, W.M; Vukic, M et Savitskaya, T.(2021)**. Chemical Composition, *In Vitro* and *In Situ* Antimicrobial and Antibiofilm Activities of *Syzygium aromaticum* (Clove) Essential Oil. *Plants Academic Editor: Petko Denev*, **10**, 2185. .doi.org/10.3390/plants10102185.
33. **Kamatou GP, Vermaak I et Viljoen AM, (2012)** .Eugenol from the remote maluku islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*. **17**:6953–81. 10.3390/molecules17066953.
34. **Kapadiya .S et M. A. Desai, (2017)**. Isolation of essential oil from buds of *Syzygium aromaticum* using hydro-distillation : multiresponse optimization and predictive modelling, *International Journal of Advanced Science and Technology*, vol. **6**, n°. 1, pp. 405–418. India.
35. **Kim, Y. G., Lee, J. H., Kim, S. I., Baek, K. H., et Lee, J. (2015)**. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *International Journal of Food Microbiology*, **195**, 30 –39. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.028.
36. **M.-J. Park, K.-S. Gwak, I. Yang, W.-S. Choi, H.-J. Jo, J.-W. Chang, E.-B. Jeung et I.-G. Choi. (2007)**. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. *The Journal of Microbiology*. **45**(5): 460-465.
37. **Mathieu Deshaies, et Jean-Philippe Gamache., (2013)**. Le clou de girofle à la rescousse.
38. **McDonald BA, et Linde C. (2022)**. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 349-379.
39. **Mustapha El Ajjouri, Fatiha Amarti, Badr Satrani, Mohamed Ghanmi, Abdellah Farah, Abderrahman Aafi, Lotfi Aarab, , Abdelaziz Chaouch. (2009)**. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc.* **14**(1), 141-148.
40. **Neri F., M. Mari et S. Brigati, (2006)**. Control of *Penicillium expansum* by volatile compounds. *Plant Pathol.*, **55**, 100-105.

41. **Narcisa Mandras, Antonia Nostro , Janira Roana, Daniela Scalas, Giuliana Banche, Valeria Ghisetti, Simonetta Del Re, Giacomo Fucale, Anna Maria Cuffini et Vivian Tullio (2016).** Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans Candida* . *BMC Complementary and Alternative Medicine* **16**:330. doi 10.1186/s12906-016-1316-5.
42. **Nathaniel Hiwandika, Susana Elya Sudrajat ,Ika Rahayu (2021).** Antibacterial and Antifungal Activity of Clove Extract (*Syzygium aromaticum*) *Journal Homepage Eureka Herba Indonesia* Vol **2** Issue 2.
43. **OMS , (2015).** L'Organisation mondiale de la Santé.
44. **P. Goñi , P. López , C. Sánchez , R. Gómez-Lus , R. Becerril et C. Nerín, (2009).** Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils 10.1016/J.Foodchem.**03**.058.
45. **Qing Xue, Zedong Xiang, Shengguang Wang et Zhufeng Cong,(2022).** Recent advances in nutritional composition, phytochemistry, bioactive, and potential applications of *Syzygium aromaticum* L. (*Myrtaceae*). doi.10.3389/fnut.1002147.
46. **Razzouk, S.; Mazri, M.A.; Jeldi, L.; Mnasri, B.; Ouahmane, L.; et Alfeddy, M.N.(2022).**Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Three Mediterranean Plants against Eighteen Pathogenic Bacteria and Fungi. *journal Pharmaceutics*, **14**, 1608. Maroc. doi.org/10.3390/ pharmaceutics14081608.
47. **S. G. Deans, R. C. Noble, R. Hiltunen, W. Wuryani, et L. G. Pénzés .(1995).** Propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry : Impact sur les niveaux de bactéries, de champignons et d'acides gras chez les souris vieillissantes. doi.org/10.1002/ffj.2730100507.
48. **Shama Hmiri, Mohamed Rahouti, Zakaria Habib, Badr Satrani, Mohamed Ghanmi et Mustapha El Ajjouri, (2011).** Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de mentha pulegium et d'eucalyptus camaldulensis dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. **80**, 2011, p.824 – 836. Maroc.
49. **Shama Hmiri, Nabila Amrani et Mohamed Rahouti (2011).** Détermination *in vitro* de l'activité antifongique des vapeurs d'eugénol et d'huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Tanacetum annuum* L. vis-à-vis de trois champignons responsables

- de la pourriture des pommes en post-récolte. *Acta Botanica Gallica*. **158**: 4, 609-616, doi:10.1080/12538078.2011.10516298.
50. **Stéphane Fontanay, Marie-Eugénie Mougenot et Raphaël E. Duval,(2015)**. Evaluation of antibacterial properties of essential oils and/ or of their major components doi:10.4267/2042/56635.
51. **Sukhdev Swami Handa, Suman Preet Singh Khanuja, Gennaro Longo et Dev Dutt Rakesh,(2008)**.Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. *International centre for science and high technology*. Trieste Italy, p 68.
52. **Sundaresan Bhavaniramy , Selvaraju Vishnupriya , Mohammad Saleh Al-Aboudy , Rajendran Vijayakumar et Dharmar Baskaran. (2019)**. Rôle des huiles essentielles dans la sécurité alimentaire : applications antimicrobiennes et antioxydantes. *Science et technologie des céréales et de l'huile* Volume **2**, p: 49-55.
53. **Rohit Prakash, Yu Zhang, Weiran Feng et Maria Jasin, (2015)**. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins **10.1101/cshperspect.a016600**.
54. **Suzanne Catty .(2001)**. Hydrolats : la prochaine aromathérapie *Healing Arts Press P* : 352 USA.
55. **Teresa Goszczynska, (2000)**. Introduction to Practical Phytobacteriology; A manual for phytobacteriology *Agricultural Research Council*, South Africa p 05.
56. **Uwineza M. S, El Yousfi B et Lamiri A, (2018)**. Activités antifongiques *in vitro* des huiles essentielles de *Mentha pulegium*, *Eugenia aromatica* et *Cedrus atlantica* sur *Fusarium culmorum* et *Bipolaris sorokiniana*. *Revue Marocaine de Protection des Plantes, n° 12*: 19-32.
57. **Yage Xing, Qingliian Xu, Xihong Li, Zhenmin Che et Juan Yun (2011)**. Activites antifongiques del'huile de girpfle contre *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* et *Penicillium citrunum*, *in vitro* et sur des fruits blesses . doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00347.x.
58. **Yuri ,(2017)**. fun with microbiology. Short descriptions and photographs of some photogenic microorganisms.
59. **Zhang Y, Wang Y, Zhu X, Cao P et Wei S (2017)**. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf.
60. **Zsuzsanna Schelz a, Joseph Molnar a et Judit Hohmann b, (2006)**. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils *Fitoterapia* **77** 279–285.

Annexe de materiel

Matérielles de laboratoire utilisé	
Béchers (250ml, 500ml, 1000ml).	Disque en papier filtre.
Erlenmeyers (250 ml, 500 ml, 1000ml).	Elastique.
Éprouvette graduée (100ml).	Embouts stériles.
Entonnoir en verre.	Gant médical.
Flacons en verre (10ml, 200ml, 100ml).	Marqueur permanant.
Pipettes pasteur.	Micropipette (de 100µl à 1000µl).
Tubes à culture.	Papier aluminium.
Anse de platine..	Papier film.
Barreau magnétique.	Papier filtre.
Boites de Pétri.	Papier pH.
Ciseau.	Pince métallique.
Couteau.	Règle en millimètre.
Coton tige	Para-filme
Cuillère.	pinces
Disque d'antibiotique	

Autre matériaux utilisés

Matérielles lourds			
			
Balance	Rebo « Rhinos »	Spectrophotomètre	Vortexe de la marque Fisher Scientific F3 15024
			
Bain marie de la marque Memmert (Germany).	Agitateur magnétique avec plaque chauffante de la marqu DIAB (MS-H-S).	Autoclave de la marque SANOC LAV La M-3-20-ECZ-J.	Etuve réglable à température différente de la marque Mettmert (Germany).

Les milieux de culture utilisés



Gélose Sabouraud
Dextrose (SDA)



PCA Plate count
agar



MH : Mueller-
Hinton



D- Glucose

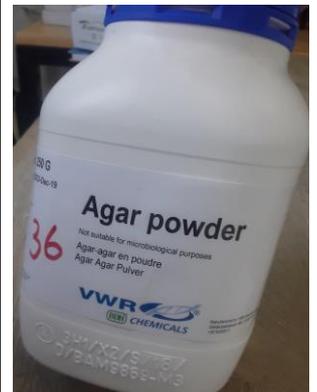
Eau Physiologique
Constituants Quantité
en 9 g de NaCl 9.
dans 1 litre d'eau
distillée.

Autoclaver à 121°C
pendant 15 minutes

PDA : La gélose dextrose
à la pomme de terre
- 200g de pomme de
terre
- 1 L eau distillée
- 20 g Glucose
- 15 g Agar
- pH = 5,1±0,2
Autoclaver à 121°C
pendant 15 minutes



ATB Gentamicine



Agar poudre

Annexe des tableaux

Tableau 01 : Résultat d'activité antibactérienne des extraits

Extrait (20µl/disque)	HE		MC		MF		Dis		Tm (+)	Tm-
	HE p	HE nb	MC p	MC nb	MF p	MF nb	DIS p	DIS nb		
Zone d'inhibition (mm)	20	20	10	8	9	0	0	0	20	00

HEp : huile essentiel poudre, HEnb : huile essentiel non broyé, Mchp : macérât a chaud poudre, Mchnb : macérât a chaud non broyé, Mfrp : macérât a froid poudre, Mfrnb : macérât a froid non broyé , Disp : distillat poudre, Disnb : distillat non broyé et Tm+ : antibiotique Gentamicine.

Tableau 02 : Résultat de CMI F d'huile essentielle poudre

Concentration HEp	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Geotrichum</i> sp	<i>Aureobasidium</i> sp	<i>Arthrographis</i> sp	<i>Penicillium</i> sp
15µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
10 µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
7.5 µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
05 µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
2.5 µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
TM	00%	00%	00%	00%	00%

Tableau 03 : Résultat de CMI F d'huile essentielle non broyé

Concentration HEnb	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Geotrichum</i> sp	<i>Aureobasidium</i> sp	<i>Arthrographis</i> sp	<i>Penicillium</i> sp
15µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
10 µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
7.5 µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
05 µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
2.5 µl/ml	100%	100%	100%	100%	100%
TM	00%	00%	00%	00%	00%

Tableau 04 : Résultat de CMI Bdes huiles essentielles : diamètre de zone d'inhibition (mm)

Concentration	2.5 µl/ml	05 µl/ml	07 µl/ml	10 µl/ml	15 µl/ml
Ø de zone d'inhibition HEp (mm)	00	00	00	00	10
Ø de zone d'inhibition HEnb (mm)	00	00	00	00	08

Tableau 05 : Résultat de test micro-atmosphère d'huile essentielle poudre

Concentration HEp	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Geotrichum</i> sp	<i>Aureobasidium</i> sp	<i>Arthrographis</i> sp	<i>Penicillium</i> sp
2.5 µl/ml	6,25%	23,07%	30,76%	23,07%	7,14%
05 µl/ml	12,50%	35,38%	30,76%	30,76%	7,14%
10 µl/ml	25%	38,46%	38,46%	53,84%	14,28%
7.5 µl/ml	12,50%	35,38%	33,84%	30,76%	14,28%
15µl/ml	52,50%	43,07%	50,76%	61,53%	28,57%
Tm	0%	0%	0%	0%	0%

Tableau 06 : Résultat de test micro-atmosphère d'huile essentielle non broyé

Concentration HEnb	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Geotrichum</i> sp	<i>aureobasidiuim</i> sp	<i>Arthrographis</i> sp	<i>Penicillium</i> sp
2.5 µl/ml	18,75%	23,07%	30,76%	23,07%	0%
05 µl/ml	31,25%	30,76%	35,38%	27,69%	0%
7.5 µl/ml	37,50%	38,46%	43,07%	30,76%	0%
10 µl/ml	37,50%	38,46%	46,15%	38,46%	14,28%
15µl/ml	50%	38,46%	56,92%	46,15%	21,42%
Tm	0%	0%	0%	0%	0%

المخلص

في إطار تبيين مستخلصات براعم القرنفل و استعمالها كبديل حيوي مطهر و حافظ في الصناعة الغذائية بفضل تتمتعها بمزايا مفيدة في مكافحة العديد من الكائنات الحية الدقيقة ذات المصدر الغذائي. أين تركّز عملنا على الدراسة المخبرية للمركبات المختلفة المستخلصة من هذه التوابل المسماة *Syzygium aromaticum* L. مسحوقة وغيرمسحوقة بهدف إثبات نشاطها المثبط ضد مسببات الأمراض النباتية المعزولة من عينة طماطم متعفنة. تم الحصول على عدة مستخلصات من هذه البراعم عن طريق: التقطير المائي، النقع الساخن والنقع البارد. ومن ثم تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات الذي تبديه هذه المستخلصات المختلفة ضد ثمانية عزلات المأخوذة من العينة السابقة و قد تم ذلك بقياس درجة حساسيتها بواسطة تقنية الانتشار في أوساط هلامية (PDA و MH). بعدها تم تحديد تراكيز المستخلصات الدنيا والمثبطة للفطريات والبكتيريا في الأوساط الصلبة MH و SDA. في البداية تم الحصول على ثمانية مستخلصات «HEp, HEnp, Mchp, Mchnb, Mfrp, Mfrnb, Disp, Disnb». وأظهرت التحاليل الفيزيائية والكيميائية المطبقة عليها أن الأس الهيدروجيني للزيوت المستخرجة حامضي و الذي كانت قيمته محصورة بين 5 و 6 ، و قد تم الحصول على مردود مرضي نسبيا قدره 5.06 و 4.76% من زيوت HEp و HEnb على التوالي. بعد عمليتي العزل والتنقية للبكتيريا والفطريات، سمح الفحص العيني والمجهري بتحديد صفاتها ومن ثم التعرف على الأنواع التالية: سلالة بكتيرية واحدة سلبية الغرام و عدة عزلات فطرية: *Penicillium* sp:2, *Arthrographis* sp, *aureobasidium* sp, *Geotricum* sp, *Aspergillus* sp:2. أبدى اختبار الحساسية تباين في التأثير للمستخلصات النقية على العزلات المدروسة وذلك حسب حجم قطر التثبيط لكل عينة، حيث لوحظ أن الزيوت HE النقية أظهرت فعالية كبيرة على الفطريات بطول قطري من 27.33 ± 2.30 إلى 50 ± 10 مم و 20 مم على البكتيريا. و قد تم تسجيل قيمة التركيز الأدنى المثبط للفطريات CMIF أقل من 2.5 ميكرو لتر / مل لجميع العزلات الفطرية. بينما كان التركيز 15 ميكرو لتر / مل مثبطاً للعزلة البكتيرية وبتراكيز أكبر من ذلك على مستوى إختبار الغلاف الجوي المصغر. النتائج التي تم الحصول عليها تؤكد أفضلية استخدام زيت القرنفل الأساسي كبديل واعد للمضادات الحيوية ومضادات الفطريات الاصطناعية.

الكلمات الأساسية: *Syzygium aromaticum* (L)، زيت عطري، نشاط مضاد للجراثيم، نشاط مضاد للفطريات، اختبار CMIF-CMIB و اختبار الغلاف الجوي المصغر.

Résumé

En tant qu'antiseptique potentiel et précieux dans l'industrie alimentaire, le clou de girofle présente des avantages bénéfiques dans la lutte contre de nombreux microorganismes de source alimentaire. Notre travail porte sur l'étude *in vitro* des différents extraits de cette épice nommée *Syzygium aromaticum* L. broyé et non broyé pour la mise en évidence de leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis des agents phytopathogènes isolés à partir des tomates infectées. Les extraits de ces boutons floraux ont été obtenus par plusieurs méthodes : hydro-distillation, macération à chaud et macération à froid. L'activité antimicrobienne, exercée par ces différents extraits à l'égard de huit souches microbiennes isolées à partir de tomates infectées, a été évaluée en mesurant leurs degrés de sensibilité par la technique de diffusion en milieu gélosés (PDA et MH). Aussi, les concentrations minimales fongicides et bactéricides ont été déterminées sur les milieux solides MH et SDA.

Huit extraits ont été obtenus, HEp, HEnp, Mchp, Mchnb, Mfrp, Mfrnb, Disp, Disnb. L'analyse physicochimique a montré que le pH des huiles extraites est acide situé entre 5 et 6, avec un rendement satisfaisant de 5,06 et 4,76 % des huiles HEp et HEnb respectivement. Après l'isolement et la purification. L'examen macroscopique et microscopique a permis l'identification des espèces : *2Aspergillus*.sp, *Geotricum*.sp, *Aureobasidium*. sp, *Arthrographis*.sp, *2Penicillium*.sp, et une souche bactérienne à G-. Le test de sensibilité a montré que les extraits purs ont exercé des activités antimicrobiennes variables traduites par des zones d'inhibition à l'égard des souches testées. Le plus grand potentiel exprimé était celui de l'HE de $27,33 \pm 2,30$ à 50 ± 10 mm sur les champignons et de 20 mm sur la bactérie. La CMIF enregistrée était inférieure à 2,5 µl/ml pour toutes les souches fongiques. Alors que, la concentration 15 µl/ml a été inhibitrice pour la souche bactérienne et d'une concentration plus ou moins grande au niveau du test micro-atmosphère. Les résultats obtenus confirment l'intérêt d'utiliser l'huile essentielle de clous de girofle comme alternative aux antibiotiques et antifongiques synthétique.

Mots clés: *Syzygium aromaticum* (L)., huile essentielle, activité antibactérienne, activité antifongique, CMIF, CMIB test micro-atmosphère.

Summary

As a potential and valuable antiseptic in the food industry, clove has beneficial advantages in combating many food-source microorganisms. Our work focuses on the *in vitro* study of the different extracts of this spice named *Syzygium aromaticum* L. ground and unground for the demonstration of their antimicrobial activities against plant pathogens isolated from infected tomatoes. The extracts of these flower buds were obtained by several methods: hydro-distillation, hot maceration and cold maceration. The antimicrobial activity, exerted by these different extracts against eight microbial strains isolated from infected tomatoes, was evaluated by measuring their degrees of sensitivity by the technique of diffusion in agar media (PDA and MH). Also, the minimal fungicidal and bactericidal concentrations were determined by Macrodilution on the solid media MH and SDA. Eight extracts were obtained, HEp, HEnp, Mchp, Mchnb, Mfrp, Mfrnb, Disp, Disnb. The physicochemical analysis showed that the pH of the extracted oils is acidic between 5 and 6, with a satisfactory yield of 5.06 and 4.76% for the HEp and HEnb oils respectively. The microscopic examination allowed the identification of the species: *2Aspergillus*.sp, *Geotricum*. sp, *Aureobasidium*. sp, *Arthrographis*.sp, *2 Penicillium*. sp, and a bacterial strain with G-. The sensitivity test showed that the pure extracts exerted a variable antimicrobial activity against the tested strains translated by zones of inhibition. After isolation and purification. The macroscopic and microscopic examination allowed the identification of the species:

The sensitivity test showed that the pure extracts exerted variable antimicrobial activities reflected by zones of inhibition against the strains tested. The greatest potential expressed was that of EO from 27.33 ± 2.30 to 50 ± 10 mm on fungi and 20 mm on bacteria. The FICM recorded was less than 2.5 µl/ml for all fungal strains. Whereas, the 15 µl/ml concentration was inhibitory for the bacterial strain and more than this for the micro-atmosphere test. The results obtained confirm the interest of using clove essential oil as an alternative to synthetic antibiotics and antifungals.

Key words: *Syzygium aromaticum* (L)., essential oil, antibacterial activity, antifungal activity, FICM, BICM, micro-atmosphere test.