

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présentée par

Boukhatem Fadhila

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Spécialité: VALORISATION DE SUBSTANCE NATURELLE

ET VÉGÉTALE

THÈME

**Activité antibactérienne de l'huile essentielle de
deux épices : *Syzygium Aromaticum* et *Illicium
Verum*.**

DEVANT LE JURY

Président **Saiah Farida**

MCB U. Mostaganem

Encadreur **Bergheul Saida**

NAA U. Mostaganem

Examineurs **Dib Wafaa**

MCB U. Mostaganem

Année université 2016/2017

REMERCIEMENTS

Nous Remercions Dieu Tout Puissant, Maître Des Cieux Et De Terre, Qui Nous A Permis De Mener A Bien Ce Travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur *M^{me} Beurgoul.S* ; son précieux de votre conseil et son aide durant toute la période du travail. Pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être menée au bon part. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury de soutenance composés de Mme .le présidente *M^{me} Saiah F.* et Examinatrice *M^{me} Dib W.* Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant les années des études.

Enfin Nous Tenons A Remercier Egalement Les Personnes Administratives Et Tous Ceux Qui Contribuer De Près Ou De Loin A L'élaboration De Ce Thème.

Dédicace

A nom de dieu le tout puissant, je dédie ce modeste travail :

- ❖ A mes chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leurs encouragements, par leurs dévouements exemplaires et les énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voire réussir.
- ❖ A mes frères *Youssef, Mahmoud* et *Abo bekr al sadik*.
- ❖ A mes très aimables sœurs: *Siham et Fatima*.
- ❖ A mes tout familles sans exception.
- ❖ mes adorables amis : *Nbia, Nabila, Nadjet, sara, chanaz* et tous mies amis *VSNV*.
- ❖ Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Fadhila

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : les épices

Historique des épices	02
I- <i>Syzygium Aromaticum</i> :.....	02
I-1- Origine :.....	02
I-2- Description botaniques :.....	02
I-3- Systématique :.....	04
I-4-Culture :.....	04
I-5-Effet thérapeutiques :.....	04
I-6- Effet antimicrobien, herbicide et insecticide.....	05
I-7- Toxicologie :	05
II- <i>Illicium verum</i> :	06
II-1-Origine :.....	06
II-2- Description botaniques :.....	06
II-3-Systématique :.....	07
II-4- Culture :.....	07
II-6-Effet thérapeutiques :.....	08
II-7- Toxicologie :.....	08

Chapitre II : Huile essentielles

I- Définition :.....	09
II- Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	09
III-Les compositions chimiques	11
III- 1- Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Syzygium Aromaticum</i>	12
III-2- Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Illicium verum</i>	13
IV - Propriétés physiques des huiles essentielles des deux épices étudiées.....	13
VI- La conservation des huiles essentielles.....	13
VII- Activités biologiques des huiles essentielles de <i>Illicium verum</i> et <i>Syzygium Aromaticum</i>	14

Chapitre III : les bactéries testées

I-1-Définition des bactéries pathogènes :.....	14
I-2- Les types de bactéries :.....	14
I-2-1- Les bactéries à gram positif :.....	14
I-2-2- Les bactéries à Gram Négatif	15
I-3- Techniques d'évaluations de l'activité antibactérienne :.....	15
II- Caractérisation de quelques germes :.....	16
<i>II-1- Escherichia coli</i> :.....	16
II-1-1-Généralité :.....	16
II-1-3-Habitat:.....	17
II-1-4-le pouvoir pathogène :.....	17
II-1-5- Caractères culturaux:.....	18
II-1-6- Résistance aux antibiotiques :.....	18
II-2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	18
II-2-1- Généralité :.....	18

II-2-2- Classification :.....	19
II-2-3- Habitat :.....	29
II-2-4- Caractères bactériologique :.....	20
II- 2-4-1- Morphologie :.....	20
II-2-4-2- Caractères cultureux	21
II-2-5- Le pouvoir pathogène.....	22

Partie Expérimental

Chapitre I : Matériel et Méthode

I-Objectif de travail	24
II-Présentation du lieu de l'étude expérimentale	24
III-Matériel et méthodes	24
III-1 Matériel végétal	24
III-2-Matériel microbien	25
III-3-Milieus de culture	25
V-1- Préparation des extraits	25
V-1-1- Macération	25
V-1-2- Décoction aqueuse	25
V-1-3- Infusion	25
IV-Tests phytochimiques	26
IV-2-1- Détection des saponosids	26
IV-2-2- Détection des polyphenoles	26
IV2-3- Détection alcaloïdes	26
IV-2-4- Détection flavonoïdes	27
IV-2-5- Détection de tanin.....	27

IV-2-6- Détection de terpénoïdes.....	27
V- Etude qualitatifs.....	27
V- Dosage des composés phénoliques totaux	27
V-2- Dosage Flavonoïdes.....	28
VI-Extraction de l'huile essentielle des clous de girofle et anis étoilée	28
VII- Identification des souches bactérienne	29
VII-1-Etude macroscopique	29
VII-2- Etude microscopique	30
VII-3- L'identification biochimique par la galerie biochimique API 20 E	30
VIII- Tests de l'activité antimicrobienne	32
VIII-1- Préparation des dilutions de l'huile.....	32
VIII-2- Activation des souches étudiées	32
VII-2-1- Repiquage des souches bactériennes	32
VIII-3-Préparation de l'inoculum	32
VIII-4- Antibiogramme	32
VIII-4-1-Principe.....	31
VIII-4-2. Etude de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> des huiles essentielles des deux épices.....	33

Chapitre II : résultats et discussion

I-Etude phytochimiques	33
I-1-Tests qualitatifs préliminaires	33
I-2-Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	34
II- Identification des bactéries testées.....	36
II-1-Observation macroscopique des colonies	36
II-2-Observation microscopique des colonies	37

II-3- Identification biochimiques par galerie biochimique API20E.....	37
III-Rendement des huiles essentielles	40
IV- Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Syzygium Aromaticum</i> et <i>Illicium verum</i>.....	43
V- Activité antibactérienne des antibiotiques	46
V-1-<i>Escherichia coli</i>.....	46
IV-2-<i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	46
Conclusion	
Référence	
Annexes	

Liste Des Abréviation

- : négatif.

% : pourcentage.

+ : positif.

°C : degré celcius.

µl : micro litre

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ATCC : American Type coloration culture.

BN : Bouillon nutritif

BN : bouillon nutritif.

DMSO : Dimethyl Sulfoxide Analytical Reagent.

E. coli : *Escherichia coli*.

EAG : extrait acide galliques

EQ : extrait quercétine

Fig : Figure

G : gramme.

GN : Gélose nutritif

HE : huile essentielle.

MH : Muller Hinton.

mm : millimètre.

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°01 : Classification botanique de <i>Syzygium aromaticum</i>	04
Tableau N°02 : Classification botanique de l' <i>Illicium verum</i>	07
Tableau N°03 : La classification d' <i>Escherichia coli</i> est présentée	16
Tableau N°04 : La classification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Tableau N°05 : Résultats du screening photochimique de clous de girofle et anis étoilé.	35
Tableau N°06 : les résultats d'observations macroscopiques sur les souches cliniques.....	36
Tableau N°07 : Odeur, couleur et rendement des huiles essentielles obtenus.....	42
Tableau N°08 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Syzygium Aromaticum</i> et <i>Illicium verum</i> (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).....	43

LISTE DES FIGURES

Figure N°01 : Planche d'herbier figurant cloud de girofle.....	03
Figure N°02 : planche d'herbier figurant l'anis étoilé.....	07
Figure N°03 : Aspects microscopique de d' <i>Escherichia coli</i>	19
Figure N°04 : Aspects microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Figure N°05 : Matériel végétal utilisé lors des expériences : <i>Illicium verum (L.)</i> et <i>Syzygium Aromaticum (L.)</i>	24
Figure N°06 : Dispositif d'extraction de l'huile essentielle « entrainement à la vapeur ».....	29
Figure N°07 : Examen de l'identification biochimique par la galerie biochimique API 20 des souches bactériennes étudiées <i>Pseudomonas aeregénosa et Escherichia coli</i>	31
Figure N°08 : Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne.....	34
Figure N°09 : étoilée résultats de l'acide gallique et la quercétine.....	36
Figure N°10 : Résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits de clous de girofle et anis	37
Figure N°11 : observation macroscopique des souches cliniques sur des milieux.....	39
Figure N°12 : Coloration de Gram de <i>Escherichia coli et Pseudomonas aurogenosa</i>	40
Figure N°13 : Résultats obtenus de l'identification biochimiques par galerie biochimique API20E.....	40
Figure N°14 : les résultats finals d'identification.....	41
Figure N°15 : Huiles essentielles obtenus d'anis étoilée et clous de girofle.....	43

Figure N°16 : Effet antibactérien d’huile essentielle de <i>Syzygium Aromaticum</i> sur les différentes souches bactériennes testées.....	44
Figure N°17 : Effet antibactérien d’huile essentielle de <i>Illicium verum</i> sur les différentes souches bactériennes testées.....	45
Figure N°18 : Effet antibactérien des antibiotiques	46

Résumé

Les huiles essentielles possèdent une importante activité antimicrobienne et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants, ceci nous a conduits à réaliser une analyse chimique et une étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et de *Illicium verum*.

L'analyse chimique des trois extraits : macéré, décoction et infusé des deux épices a révélé la présence de les flavonoïdes, les tanins condensés et polyphénol.

La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 200 µg EAC/mg Ps pour *Syzygium Aromaticum* et 102.939 µg EAC/mg Ps pour celle de *Illicium verum*. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode $AlCl_3$, leurs teneurs est de 25.611 µg EQ/mg Ps dans l'extrait de *Syzygium Aromaticum* et 40.995 µg EQ/mg Ps pour *Illicium verum*. L'extraction de l'huile essentielle par entrainement de la vapeur a révélée un rendement important de 4.58% pour *Illicium verum* (L) et 3.302% pour *Syzygium Aromaticum* (L).

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur deux souches bactériennes pathogènes, selon la méthode de diffusion sur disque. L'huile essentielle du *Syzygium Aromaticum* (clou de girofle) possède une forte activité antibactérienne représentée avec des diamètres d'inhibition variant entre 11 mm à 16 mm contre *Escherichia coli* et 8 mm à 14 mm pour *Pseudomonas auroginosa*.

Les mots clés : *Syzygium Aromaticum*, *Illicium verum*, analyse chimique, activité antibactérienne.

Summary

Essential oils possess significant antimicrobial activity and can substitute.

With success to antibiotics that show their inefficiencies against resistant microorganisms, this led us to carry out a chemical analysis and study of the antimicrobial activity of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Illicium verum*.

The chemical analysis of the three extracts: macerated, decoction and infused of both spices revealed the presence of flavonoids, condensed tannins and polyphenol.

The total content of phenolic compound was determined using the Folin-Ciocalteu reagent,

Is 200 μg EAC / mg Ps for *Syzygium Aromaticum* and 102.939 μg EAC / mg Ps for that of *Illicium verum*. Flavonoids were evaluated using the AlCl_3 method, their contents being 25.611 μg EQ /mg Extract of *Syzygium Aromaticum* and 40.995 μg EQ /mg Ps for *Illicium verum*. Extraction of the essential oil by steam distillation showed a significant yield of 4.58% for *Illicium verum* (L) and 3.302% for *Syzygium Aromaticum* (L).

The antimicrobial activity was determined on two pathogenic bacterial strains, according to the disk diffusion method. The essential oil of *Syzygium Aromaticum* (clove) has a strong antibacterial activity represented with inhibition diameters varying between 11 mm to 16 mm against *Escherichia coli* and 8 mm to 14 mm for *Pseudomonas auroginosa*.

Key Wordes : *Syzygium Aromaticum* , *Illicium verum*, chemical analysis, antibacterial activity.

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés médicinales. Les vertus thérapeutiques des plantes ont été expérimentées de puis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération ou consignés dans les vieux écrits. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicales naturelles (Goeb, 1999).

En effet, le développement de la résistance des micro-organismes aux divers antibiotiques préoccupent les spécialistes en médecine. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes de la résistance bactérienne.

De par leur composition chimique, les plantes médicinales représentent un intérêt économique considérable par leur appartenance aux industries des produits agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Bruneton, 1999). Les épices sont classées parmi les plantes aromatiques qui font partie de plantes médicinales, en effet, elles sont douées non seulement de qualités parfumées et culinaires, mais aussi de vertus médicinales variées grâce aux différents principes actifs qu'elles contiennent, notamment les huiles essentielles (Calvo *et al.*, 2002).

Actuellement les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (Bruneton, 1999; Teuscher *et al.*, 2005). Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et bien que d'autres propriétés biologiques importantes (Dung *et al.*, 2008).

Notre objectif est ainsi réalisé par la détermination de la composition chimique des deux épices puis l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *syzygium aromaticum* et *illicium verum* vis-à-vis de deux bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* Et *Pseudomonas aeruginosa*.

Le présent travail est scindé en deux parties. Le premier est bibliographique, renferme trois chapitres, le premier aborde des généralités sur les deux épices étudiées, le deuxième expose un aperçu sur les huiles essentielles et le troisième expose une généralité sur les bactéries testées. La deuxième partie est expérimentale, qui illustre le matériel et les méthodes utilisés en premier chapitre. Et les résultats obtenus avec leurs discussions dans le deuxième chapitre. Une conclusion achève le travail.

Partie bibliographique

Chapitre I

Les épices

Historique

Les plantes à épices étaient auparavant, utilisées pour leurs vertus thérapeutiques comme l'atteste un traité chinois sous l'Empereur Shen-Nung, en 2700 av. JC.

Dans l'antiquité, on utilisait le clou de girofle pour combattre le mal de dents, fléau de l'époque, pour limiter l'infection des plaies ouvertes et conserver aussi bien les viandes crues que cuites.

Si certaines épices ont des vertus médicinales, d'autres ont été utilisées pour leurs vertus tonifiantes comme le gingembre qui aiguïssait, paraît-il, l'appétit sexuel. Et que dire de l'utilisation d'épices pour la conservation des cadavres dans l'Egypte antique.

I- *Syzygium Aromaticum*

I-1- Origine

Les clous de girofle sont les boutons floraux séchés de l'arbre tropical *Eugenia caryophyllata* (ou giroflier), originaire d'Indonésie orientale. Il produit des fleurs à partir de six ans et peut vivre jusqu'à 150 ans.

I-2- Description botaniques

C'est un grand arbre originaire des îles des Moluques, élancé, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 m, qui peut atteindre jusqu'à 20 m de haut, à port pyramidal et au tronc gris clair ridé. Ses feuilles, de 8 à 10 cm de long, sont coriaces, persistantes, opposées, pétiolées, ovales, aux limbes lancéolés, à la face supérieure vert rougeâtre et à la face inférieure vert sombre, légèrement ponctuée. Elles sont aromatiques et dégagent une forte odeur de clou de girofle au froissement. L'inflorescence comprend de petites cymes (4–5 cm) compactes et ramifiées, regroupées en panicules de trois à cinq petites fleurs parfumées, au calice tubulaire blanc cassé, puis rouge (quatre sépales rouges charnus et persistants) et à la corolle blanc rosé (quatre dialypétales blancs) (Ghedira et al., 2010).

L'arbre donne en Janvier/Février des boutons floraux, ou clous de girofle, pourpres cramoisis, groupés en cimes terminales. Ils sont cueillis en Juillet avant l'épanouissement de la corolle, quand ils commencent à prendre une teinte rosée, puis de nouvelles inflorescences apparaissent dès le mois d'Août et seront récoltées vers le début de l'année suivante. Les clous de girofle sont mis ensuite à sécher sur des claies au soleil ou à feu doux, pendant trois jours, avant de procéder à l'égriffage pour éliminer les pédicelles ou griffes. Au cours du séchage, clous et griffes perdent entre 67 et 72 % d'eau (**Richard, 1974; Richard et Loo, 1992**).

Comme le nom de clou l'indique, le bouton floral comporte une partie quadrangulaire, l'hypanthe, longue de 10 à 12 mm pour un diamètre de 2 à 3 mm et une tête globuleuse d'un diamètre de 4 à 6 mm, entourée par les quatre lobes divergents des sépales et constituée des quatre pétales imbriqués qui enferment de très nombreuses étamines recourbées. La poudre des clous de girofle peut être caractérisée par des fragments de parenchyme renfermant de grandes poches sécrétrices, de nombreux grains de pollen triangulaires à 3 pores dans les angles (**Bruneton, 1999**).

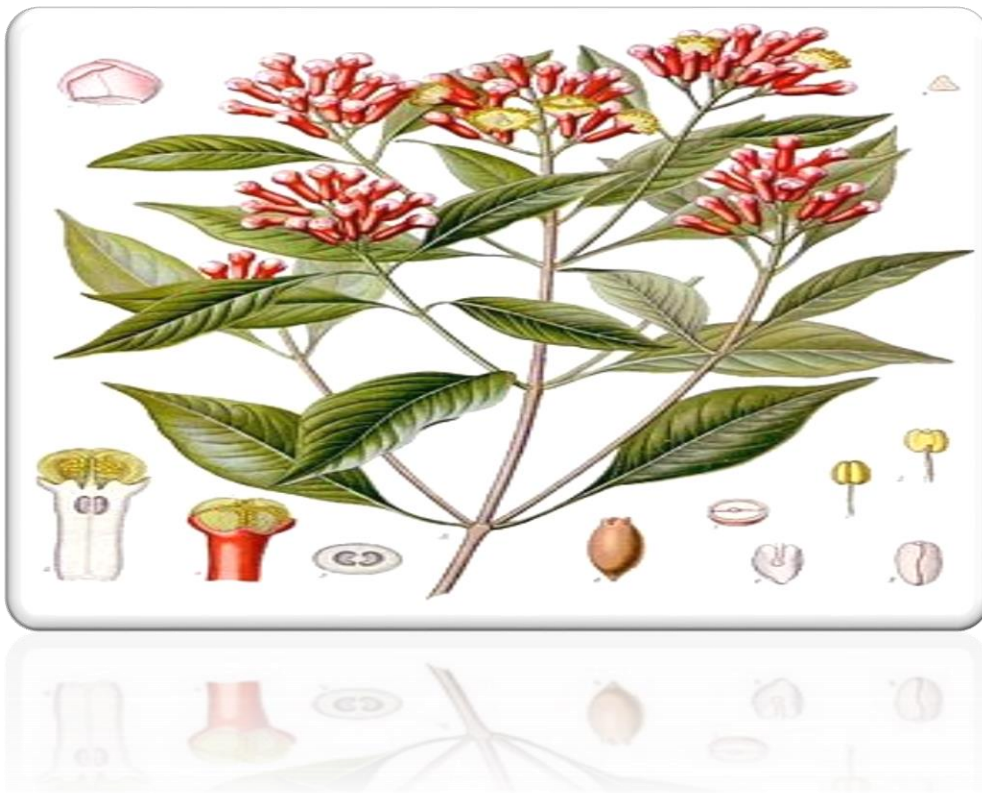


Fig N°01 : Planche d'herbier figurant cloud de girofle.

I-3- Systématique

Table 01 : Classification botanique de *Syzygium Aromaticum*

Classification	
Famille	Myrtacées
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.)
Nom commun	Giroflier
Nom Anglais	Clouve buds
Nom Arabe	Kourounfol القرنفل
Synonymes	<i>Eugenia</i> <i>caryophyllus</i> E. <i>Cryophylla</i> Thumb.

I-4-Culture

C'est une plante de croissance lente et difficile de culture. Sa Multiplication est essentiellement par graines, elle possède une faculté germinative très faible, mais germent très facilement si la graine est fraîche.

I-5-Effet thérapeutiques

Traditionnellement, les clous de girofle étaient utilisés pour le traitement des maux de dents, de la bouche, de la gorge, de l'inflammation de la muqueuse buccale et de la mauvaise haleine. En usage externe contre le rhumatisme, les myalgies (douleurs musculaires), la sciatique et anesthésiant local dans les soins des plaies. Par voie orale, les clous de girofle sont utilisés dans le traitement des troubles digestifs, ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations et flatulences (Van Wyk et Wink, 2004 ; Ghedira et al., 2010).

I-6- Effet antimicrobien, herbicide et insecticide

Dans les études scientifiques modernes les clous de girofle extraits avec différentes méthodes sont étudiés pour leurs vertus médicinales (Ivanovic et al., 2013). l'extrait obtenu par ultrasons possède un effet antioxydant important et une grande quantité de composés phénoliques par rapport à l'extraction hydro-éthanolique classique (Alexandru et al. ;2013); l'huile essentielle obtenue par hydro-distillation classique et les polyphénols présentent un bon effet antioxydant par rapport aux témoins (Gulcin et., 2012 ; Lui et al., 2008) ; l'extrait aqueux possède un effet antibactérien important en le comparant avec celui de la cannelle (Al-dhaher, 2008) , mais inférieur à celui de la cannelle en phase vapeur (Kloucek et al., 2012) .Il présente également des effets :antifongiques (Guynot et al., 2005) ; anti-aspergilloses et anti-dermatophytoses par l'inhibition de la kératinase et de l'élastase des champignons (Khan et Ahmed, 2011) ; effets larvicides de l'huile sur les moustique *Aedes aegypti* et *Cluex quinquefasciatus*, vecteurs principales de la dengue, de la fièvre jaune, fièvre du Nil (virus du Nil occidental) et le paludisme aviaire (Fayemiwo et al., 2014), effet hypoglycémiant de l'huile avec réduction des dommages du cristallin, du muscle cardiaque et du foie (Shukri et al., 2005); l'infusion administrée par voie orale inhibe significativement la progression du cancer de poumon chez l'animal (Banerjee et al., 2006).

Le composant majeur « L'eugénol » est doué d'une activité antiviral anti- herpès (Khan et al., 2005) ; Anti-inflammatoire, analgésique, antioxydant et anticancéreux (Kamatou et al., 2012). En agriculture, l'huile essentielle possède un effet herbicide et protecteur des cultures contre les insectes et les insectes et les champignons (Tworkoski, 2002 ; Dayan et al., 2009), effet insecticide sur les charançons nuisibles des graines en stocks (Viteri Jumbo et al., 2014).

I-7- Toxicologie

L'usage abusif du clou de girofle peut devenir toxique. De grandes quantités doivent être évitées pendant la grossesse. Le clou de girofle peut être irritant pour les voies gastro-intestinales et devrait être évité chez des personnes ayant des ulcères gastriques, des colites ou le syndrome du colon irritable. Dans les surdoses, les clous de girofle peuvent causer des nausées, des vomissements, des diarrhées et de fortes hémorragies digestives.

La sur-utilisation peut conduire à une insuffisance rénale, des modifications de la fonction hépatique, une dyspnée, une perte de conscience, des hallucinations et même la mort. L'huile de clou de girofle, riche en eugénol qui peut irriter la peau et les muqueuses. En usage externe elle est potentiellement dermo-caustique. Par voie interne, est un toxique neurologique à très forte dose.

Cette huile est contre-indiquée chez les femmes enceintes, qui allaitent, les enfants, en cas d'eczémas et de fragilité cutanée. Son emploi dépend de la dose; 100g de clous de girofle en une fois est mentionné toxique.

II- *Illicium verum*

II-1- Origine

L'anis étoilé, ou badiane, provient de la badiane de Chine qui, comme son nom l'indique, provient de Chine et du Vietnam. L'épice provient des fruits séchés, le plus aromatique étant l'enveloppe et non la graine contenue dans chaque branche. L'arbre ne produit pas de fruits pendant six ans puis est capable d'en produire pendant cent ans.

Botaniquement, l'anis étoilé n'a aucun lien de parenté avec l'anis vert originaire du Moyen-Orient.

II-2- Description botaniques

La badiane, fruit de cet arbre à feuilles persistantes, est un polyfollicule en forme d'étoile, d'un diamètre de 1 à 2 cm, à huit branches (les carpelles). La récolte se fait habituellement deux fois par an, au printemps et en automne. C'est ce fruit, cueilli vert, qui est séché après maturation pour être utilisé moulu, broyé ou en huiles essentielles, selon l'usage. En outre, la badiane exhale une odeur poivrée et possède une puissante saveur anisée. A noter qu'il existe une variété japonaise interdite à la consommation (**Carole M.2013**).



Fig N°2 : planche d'herbier figurant l'anis étoilé

II-3- Systématique

Table 02 : Classification botanique de l'*Illicium verum*

Classification	
Famille	<i>Illiciaceae.</i>
Genre	<i>Illicium</i>
Espèce	<i>Illicium verum</i> (L)
Nom commun	Anis étoilé, Badiane de chine
Nom Anglais	Star Anise
Nom Arabe	نجمة الارض
Synonymes	<i>I.Stellatum</i> (L), <i>I.anisatum</i> (L)

II-4- Culture

L'arbre prolifère sur sols argileux et schisteux, dans des pays vallonné (il est souvent planté au niveau des pentes des coteaux), pourvus d'un climat chaud et humide et épargnés des gels durant le moi d'hiver. Sa multiplication se fait par semis en pépinière, mais les graines perdent très vite leur faculté germinative. Au bout d'une ou deux années, les plants sont transplantés en pleine terre. L'arbre fleurit au bout de sa 7^e ou 8^e année et peut être exploité durant une centaine d'années (Schroder, 1991).

II-5-Effet thérapeutiques

La badiane appartient à la pharmacopée ancestrale de la médecine traditionnelle asiatique. Très présente dans le sud de la Chine et dans le nord du Viêt Nam, elle fut utilisée en décoction ou en huiles essentielles et son usage fut préconisé pour les troubles intestinaux et respiratoires. Ce fut à partir du XVII^e siècle que le badiane fut introduite en Europe et utilisé par les praticiens de l'époque. Dès lors, son utilisation se généralisa en phytothérapie.

II-6- Toxicologie

La contamination de la badiane, à l'origine de cas de convulsions dans certains pays a conduit à déclencher une alerte. Des contrôles et des études faites montrent que la variété de badiane chinoise est indemne de toxicité.

Les composés convulsivants toxiques des espèces autres qu'*Illicium verum* sont des lactones sesquiterpéniques (anisatine, néoanisatine, pseudoanisatine) dont les structures et la quantification de routine de ces composés. La recherche de la contamination de la badiane de Chine ne peut donc actuellement pas se faire de manière directe par dosage.

Chapitre II

Huiles essentielles

I- Définition

Les huiles essentielles sont des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Selon plusieurs auteurs, les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveurs généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes. (**Belaiche, 1979 ; Valnet, 1984 ; Wichtel et Anthon, 1999**).

II- Procédés d'extraction des huiles essentielles

Différents méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature de la matière végétal à traiter (graines, feuilles), le rendement en huile et la fragilité de certains constituants des huiles essentielles aux températures élevés.

❖ La distillation

Selon **Benjilali (2004)** la distillation peut être définie comme étant la séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux (ébullition ou sublimation).

Bruneton (1999) signale que le principe de la distillation repose sur la propriété qu'ont les huiles essentielles d'être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation. La production des huiles essentielles se ferait donc en deux étapes : la diffusion de l'huile essentielle de l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal, et l'évaporation et entraînement à la vapeur d'eau.

A- L'hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Les inconvénients de cette méthode sont :

La calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle (Abou Zeid, 2000).

Cette méthode est généralement utilisée en cas des huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Elle est aussi utilisée dans l'extraction des huiles à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées. (Haekel et Omar, 1993).

B- L'entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal, dans ce cas, n'est en contact avec l'eau, il se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (Anes et al., 1968 in Benjilali, 2004; Belaiche, 1979).

C- Autres méthodes d'extraction

On peut également extraire les principes aromatiques grâce à des solvants ou plus récemment avec du dioxyde de carbone supercritique (qui est dans un état intermédiaire entre un gaz et un liquide) mais les produits obtenus ne peuvent normalement pas s'appeler huiles essentielles (Philippe, 2009).

- ✓ **Extraction par solvant** : l'extraction par solvant consiste à faire tremper les plantes dans le solvant volatil, tel que l'hexane ou le propylène glycol. Ce mode d'extraction est souvent utilisé quand la distillation à la vapeur d'eau est difficile on peut citer en exemple les absolues de jasmin ou de vanille.
- ✓ **L'enfleurage** : est une technique qui date de l'antique égyptienne. elle consiste à déposer des plantes sur une couche de graisse qui absorbe les parfumes. La graisse est ensuite mélangée à l'alcool qui récupère les senteurs.

✓ Extraction par micro-ondes

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelé hydro-distillation par micro-onde sous vide. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-onde dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classique de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-onde de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir un rendement similaire à partir de le même masse de plante (**Mengli et al., 1993**). La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur observée dans les huiles essentielles extraites par micro-onde. Ceci est du à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus se chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (**Benhabou et al., 2007 ; Lucchesi et al., 2007**). Cette technique présente donc beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (**Mengal et al., 1993 ; Lucchesi et al., 2004**). L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée (**Chemat et al., 2006 ; Flamini et al., 2007 ; Lucchesi et al., 2007**).

III- Compositions chimiques

Les huiles essentielles ont une composition assez complexe (**Azevedo et al., 2001**). On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques en(C5) et comprennent les monoterpènes en (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les triterpènes en (C30). Ils ont la même origine métabolique. Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. En général, une huile essentiellement est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygènes dérivés de ces hydrocarbures.

Parmi ces composés oxygénés, on peut noter la présence d'alcools, d'esters, d'aldéhydes, de cétones, d'éther-oxydes et de carbures.

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (Cosentio et al., 1999), et parmi les nombreux constituants d'unes huiles essentielles, l'un domine généralement ; on l'appelle composition majoritaire.

La composition chimique des huiles essentielles varie encore de façon appréciable avec le milieu et la période de la végétation. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation (Mundina et al., 1999).

III- 1- Composition chimique de l'huile essentielle de *Syzygium Aromaticum*

Les clous de girofle contiennent entre 15 à 18 % d'huile volatile (pas moins de 15 % v/w d'huile (British., 1993), les tiges entre 4 à 6 % et les feuilles ont un rendement de 2 à 3 % (Leung Albert Y., 1980). Ils renferment des hétérosides de chromones (Bruneton J., 1999), glucosides des stérols (sitostérol, stigmastérol et campestérol), acide oléanolique, camphérol, 6 % protéines, 20 % lipides, 61 % carbohydrates, vitamines et autres (Leung Albert Y., 1980). L'huile essentielle des clous de girofle est obtenue par hydrodistillation, rarement par distillation à la vapeur (Burdock GA., 1995). Sa teneur est exceptionnelle: 150 à 180 ml / kg parfois 200ml / kg (Bruneton J., 1999). La distillation des griffes donne une huile avec un rendement de 4 à 6 %, et celle des feuilles entre 1 à 3 % .Sa composition est caractérisée par la présence d'un propénylphénol largement prépondérant, "l'Eugénol". Majoritairement libre (pas moins de 85 % et pas plus de 95 % w/w) (British, 1993), et en partie sous forme d'acétate d'eugényle. L'eugénol est accompagné de plusieurs dizaines de composés terpéniques, aliphatiques, aromatiques et hétérocycliques. Particulièrement le β -caryophyllène jusqu'à 10 % (Bruneton J, 1999).

D'après la pharmacopée européenne 3e édition, l'huile essentielle des clous de girofle contient de 75 à 88 % d'eugénol, de 5 à 14 % de β -caryophyllène, et de 4 à 15 % d'acétate d'eugényle.

III-2- Composition chimique de l'huile essentielle d'*Illicium verum*

Huile essentielle de l'anis étoilé riche en anéthol, estrago, linalol, terpinéol, polysaccharides lipides - flavonoïdes. Elle est composée de près de 95 % de trans anéthole et de 5 % de limonène.

- L'anéthol pur a été obtenu pour la première fois par le chimiste Cahours par distillation de l'essence d'anis. Il donne son goût à l'anis, au fenouil et à l'anis étoilé. L'anéthol a un goût clairement sucré et est treize fois plus sucré que le sucre. Il est légèrement toxique et peut-être irritant en grande quantité.
- Le limonène C₁₀H₁₆ est un hydrocarbure terpénique présent dans de nombreuses huiles essentielles à partir desquelles il peut être obtenu par distillation. À température ambiante, c'est un liquide incolore à odeur brillante, fraîche et propre d'orange, caractéristique des agrumes. Le limonène est notamment utilisé en parfumerie. Le limonène est une molécule chirale et, comme pour beaucoup de molécules chirales, les sources biologiques produisent un énantiomère spécifique.

IV - Propriétés physiques des huiles essentielles des deux épices étudiées :

L'huile essentielle de clou de girofle se présente sous la forme d'un liquide huileux, de couleur jaune fonçant au brun à la lumière (Clotilde M, 2008).

L'huile essentielle de badiane de Chine encore appelée anis étoilé est dominée par le trans-anéthole. Forte, chaude, sucrée et douce, ses caractéristiques olfactives rappellent beaucoup celle de l'anis vert. À l'état liquide, l'anéthol est incolore et hydrophobe. Il cristallise vers 20 °C en donnant des paillettes nacrées.

VI- La conservation des huiles essentielles

A cause de leurs évaporations rapide, leurs sensibilités à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement (Valnet, 1984 ; Salle et Pelletier, 1991).

VII- Activités biologiques des huiles essentielles de *Illicium verum* et *Syzygium Aromaticum*

Les plantes aromatiques et épices sont utilisés depuis des siècles dans la préparation alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais également pour leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques. Thym, sauge, romarin, clou de girofle sont autant de plantes aromatiques fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaire. Les huiles essentielles de ces plantes ont toute une particularité commune : elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antimicrobienne (**Kim et al., 1999**) . Le carvacrol est le plus actif de tout (**Proust, 2006**). Reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons friandises et autres préparation. Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques, alimentaires et dentaires. Ces deux composés ont un effet antimicrobienne contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Bcillus cereus*, *listeria monocytogenes*, *Salmanella entrria*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter Pyroli*. (**Pauli, 2001 ; fabian et al., 2006**). D'autre familles des composés présentent aussi des propriétés antimicrobiennes intéressantes : certain alcools, aldéhydes et cétones monoterpéniques (géraniole, linalol, menthol, terpinol, thujanol, myrcénol, citronellal, camphre, carvone, ect), des phenylopropanes (cinnamaldehyde) et des monoterpènes (terpinene, p-cymène). Les industries alimentaires, cosmétique et pharmaceutique sont très intéressées par les propriétés de ces composés d'autant plus qu'il s'agit d'aromatisants naturels. De ce fait, beaucoup de chercheurs à travers le monde étudient leur potentiel en tant qu'agent de conservation (**Burt, 2004**).

La plus part de ces composés sont également de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol et l'eugénol sont encore ici les composés les plus actifs. Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : *condida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A niger*, *A flavus*, *A fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* et bien d'autres (**Kalamba et al, 2003**).

Chapitre III

Les bactéries testées

I-Définition

Les bactéries désignent des organismes cellulaires simples, dépourvus de chlorophylle, et visibles uniquement au microscope. Elles sont des éléments, qui n'appartiennent ni au règne végétal, ni au règne animal et qui d'habitude trouvées en très grand nombre parce qu'ils peuvent se multiplier rapidement (**Bruyère F, et al.2008**).Ce sont des procaryotes : leur ADN est contenu dans un seul chromosome qui n'est pas contenu dans un noyau.les trois formes basiques, toutes présentes dans le sol, sont les coques(sphériques ou de forme ovale),les bacilles (en forme de bâtonnet) et les bactérie de forme spiralée. Pour l'essentiel, la bactérie se reproduit par division cellulaire, c'est-à-dire qu'une cellule se sépare en deux et donne deux cellules qui elles-mêmes se diviseront et ainsi de suite. (**Jeff L, Wayne L, 2008**). Les bactéries pathogènes spécifiques désignent des germes qui déclenchent une infection caractéristique chez un sujet sain (**Bruyère F, et al. 2008**).

II- Les différents types de bactéries

II-1-Les bactéries à gram positif

Les bactéries à Gram + ont une structure unimembranée qui est organisée en trois grandes parties : (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- La couche de peptidoglycane composant la paroi cellulaire.
- L'espace périplasmique.
- La membrane plasmique.

La couche de peptidoglycane est très épaisse. L'espace périplasmique est beaucoup plus étroit que chez les Gram- et c'est un espace de stockage d'enzymes, de nutriments, de protéines, d'ions...

Cette espace a beaucoup d'autres fonctions, notamment dans certaines étapes de la synthèse de protéine et dans le métabolisme. Cette espace se situe entre la couche de peptidoglycane et la membrane plasmique (**Le minor .L, veron .M ,1989**).

Les bactéries à Gram positif se cultivent, pour la plupart, facilement dans les milieux de base ; on dit que ce sont des germes non exigeants. La plupart des coques, les bactéries de formes rondes, sont des Gram+, et de nombreux bacilles, bactéries de formes allongées en batonnets, sont aussi des Gram positif (Le minor. L, veron .M ,1989).

I-2-Les bactéries à Gram Négatif

Les bacilles à Gram négatif ont manifesté vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui a abouti à des problèmes thérapeutiques encore aigus.

Les bactéries à Gram négatif ont une structure biomembrane qui est organisée en trois grandes parties :

- La membrane externe
- L'espace périplasmique (comportant notamment la paroi avec le peptidoglycane)
- La membrane plasmique qui est presque pareil que la membrane externe (Prescott .LM el al, 1995)

Les bacilles à Gram négatif hôtes naturels de l'intestin et de l'environnement sont responsables d'infections urinaires.

I-3-Techniques d'évaluations de l'activité antibactérienne

▪ Méthode de l'aromatogramme

En plus de l'appellation méthode de l'aromatogramme (Abdesselam, 2006), elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme (Jacob, 1979), méthode de VINCENT (Pibiri, 2006), méthode de diffusion dans la gélose (agar) (Razakarivony et al., 2009). Elle est particulièrement adaptée à l'étude de l'action antibactérienne. Elle permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis à vis de l'huile essentielle donnée. Elle peut être aussi adaptée pour tester d'autres agents antimicrobiens (Wilkinson, 2006).

▪ Méthode de dilution

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice (CMI). Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Oussou et al., 2008; Derwich et al., 2010).

II-Caractérisation de germes étudiés

II-1- *Escherichia coli*

II-1-1-Généralité

Le genre *Escherichia* comprend plusieurs espèces, dont seul *E. coli* (colibacille) est potentiellement pathogène pour l'homme. *E. coli* est une entérobactérie mobile, commensale du tube digestif, capable de fermenter le glucose et le lactose. Il représente l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie, ou il participe à la « barrière » intestinale. La colonisation du tube digestif commence des les premières heures après la naissance et le rythme de division d'*E. Coli* lui permet de garder pendant toute la vie de l'individu sa place dominante dans la présence de cette bactérie dans le sol, l'eau est les aliments témoigne d'une contamination fécale et suggère la possibilité que d'autres bactéries ou virus d'origine digestive s'y trouvent. On considère que leur présence rend l'eau ou les aliments impropres à l'utilisation ou à la consommation. (cristan Carip et al., 2008).

II-1-2-Classification

La classification d'*Escherichia coli* est présentée dans le Tableau N° 03 :

<i>Escherichia Coli</i>	
Règne	<i>Bactéria</i>
Division:	<i>Proteobacteria</i>
Classe:	<i>Gamma proteobacteria</i>
Ordre:	<i>Enterobacteriaceae.</i>
Famille:	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre:	<i>Escherichia</i>
Espèce :	<i>E. Coli</i>

II-1-3- Habitat

Les *E. coli* ou colibacilles sont hôtes normaux de l'intestin : ils représentent près de 80 % de la flore intestinale aérobie de l'adulte (flore sous dominante, car la flore dominante est à 99 % anaérobie). On peut les retrouver également au niveau de diverses muqueuses chez l'homme et chez les animaux. (Frankel et al., 1995).

- **Chez l'homme :** cette bactérie se retrouve surtout dans les infections génitourinaires et aussi dans les syndromes digestifs (appendicite, lithiase, biliaires infectée), circulatoires (endocardites), de plus *E. coli* apparaît comme un des agents des infections néonatales (septicémie méningite).
- **Chez les animaux :** *E. coli* intervient très fréquemment chez diverses espèces (les bovins les volailles...).

La présence des *E. coli* dans le milieu environnant ou des aliments est signe d'une contamination fécale, mais pas obligatoirement une contamination humaine : tout les animaux à sang chaud abrite *E. coli*. (Frankel et al., 2005).

II-1-4- Le pouvoir pathogène

En médecine humaine ces germes sont qualifiés à la fois de banaux commensaux et d'indiscutables agents pathogènes. Ils peuvent donner lieu à deux types d'infections.

- Infections extra intestinales.
- Infections intestinales.

Ce germe peut être véhiculé dans des sites intestinaux, appareils génitaux urinaires, cystites, infection hépatique biliaires ou digestives, nerveuses (méningite à *E. coli*) et de septicémie. *Escherichia coli* en cause ont le même pouvoir invasif que les schigelles, ou ils se multiplient à l'intérieur des cellules ou causent des inflammations.

Les toxines responsables sont : la toxine LT et ST qui stimulent l'adényl cyclase intracellulaire et augmente l'AMP cyclique qui donne une fuite d'eau.

II-1-5- Caractéristiques morphologiques et culturelles

Escherichia coli ou colibacille fait partie des Entérobactéries, c'est une bactérie fine et allongée à extrémités arrondies, bacille à Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, asporulée, mesurant 2 à 4 μ de long sur 0,4 à 0,6 μ de large, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe non exigeant se développe facilement sur milieux ordinaires (GN). (Clave, 2012 ; Oulymata, 2007).



Fig 03 : Aspects microscopique de d'*Escherichia coli*

I-1-6-Résistance aux antibiotiques

Les souches d'*Escherichia coli* sont généralement sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles Gram négatif : amino-pénicillines, céphalosporines, quinolones, aminosides, triméthoprime-sulfaméthoxazole. Néanmoins cette sensibilité doit toujours être vérifiée par un antibiogramme (Avril et al, 1992).

II-2- *Pseudomonas aeruginosa*

II-2-1- Généralité

Pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique est une bactérie saprophyte de l'air, l'eau et du sol, commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, elle possède un pouvoir pathogène étendu (BedouiH et al ., 2005).

Le bacille pyocyanique est essentiellement une bactérie pyogène qui provoque chez l'homme et chez l'animal des suppurations superficielles et profondes à partir de ces suppurations on peut l'isoler (BedouiH et al ., 2005).

Pseudomonas aeruginosa est présente fréquemment dans le milieu hospitalier elle atteint essentiellement les sujets débilisés : cancéreux brûlés, insuffisant respiratoires. Sa présence dans certains prélèvements par exemple : les urines-témoigne de manœuvres instrumentales et du caractère iatrogène de l'infection. Il est également possible se l'isoler de coprocultures sans qu'un rôle pathogène précis puisse lui être attribué (Ben messaoud K., 2005).

En revanche, les sujets atteints de mucoviscidose sont très souvent infectés au niveau pulmonaire par un type particulier de souches ; les pyocyaniques muqueux (Ben messaoud K., 2005).

II-2-2- Classification de *Pseudomonas aeruginosa*

La classification de *Pseudomonas aeruginosa* est présentée dans le Tableau N°4 :

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Règne	<i>Bactéria</i>
Division:	<i>Proteobacteria</i>
Classe:	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre:	<i>Pseudomonadales</i>
Famille:	<i>pseudomonadaceae</i>
Genre:	<i>pseudomonas</i>
Espèce :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

II-2-3-Habitat

Suite à leurs exigences nutritives modestes les bactéries du genre *Pseudomonas* peuvent survivre et se multiplier sur les surfaces humides. De ce fait, elles seront fréquemment rencontrées dans l'environnement comme l'eau douce, eau de mer, sol, végétaux, lait...ect. Les *Pseudomonas* sont caractérisés par une importante dominance au niveau de la rhizosphère traduit par une sécrétion importante des exsudats racinaires et une grande variété de substance utile aux plantes

Les souches sont rencontrées aussi en milieu hospitalier aussi bien dans l'environnement proche du malade que dans de nombreux produits liquides tels que les solutions d'antiseptiques. *Pseudomonas aeruginosa* représente 80% des souches isolées en clinique. Elle peut vivre en commensale de l'homme au niveau du tube digestif et elle peut provoquer plusieurs infections telles que : les infections pulmonaires, cutanées, oculaires et urinaires... (**Flandrois, 1997**).

Certaines espèces sont des agents pathogènes des végétaux, comme *pseudomonas syringae* dont sa virulence est due à sa capacité à former des cristaux de glace qui endommagent les tissus des plantes (**Perry, 2004**).

II-2-4- Caractères bactériologiques

II- 2-4-1- Morphologie

Pseudomonas aeruginosa se présente comme un fin bacille (0.5x3µm) asporulé et acapsulé, son extrême mobilité est due à une ciliature polaire en général monotriche, gram négative, il possède souvent des granulations plus fortement colorées (**C. Lilet et al., 1983**).

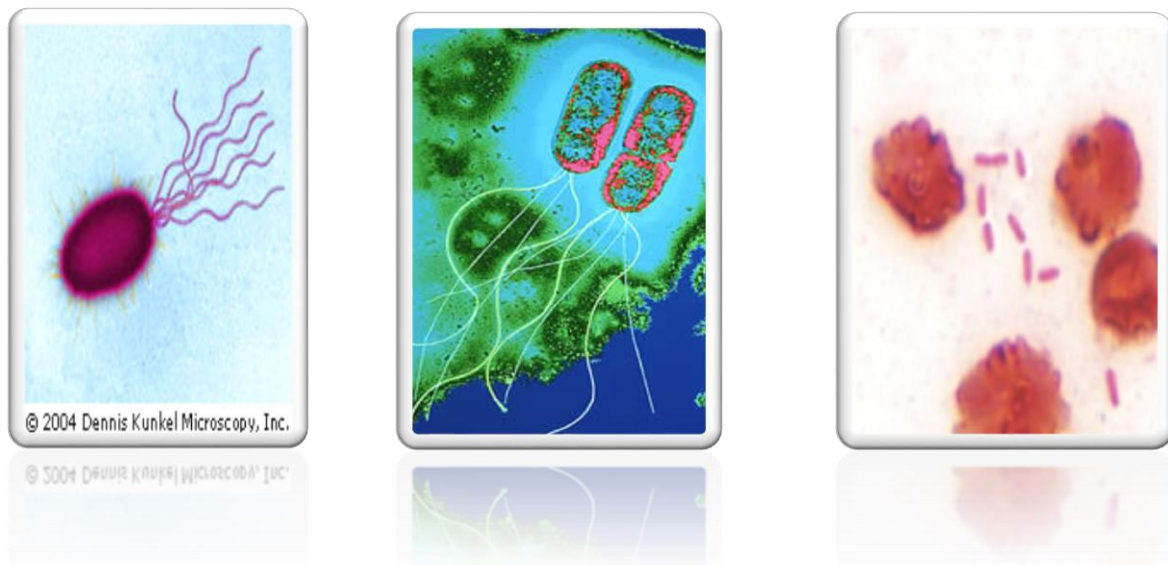


Fig 04 : Aspects microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* (354×300)

(Philippon et Lalande, 2005)

II-2-4-2- Caractères cultureux

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie très peu exigeante se multipliant sur des milieux synthétiques simple (C. Lilet et al., 1983).

Elle pousse facilement en 2 heures à une température de 37° C et peut se développer à des températures variables (5 – 42 °C, l'optimum étant 30 °C) mais supporte de moindres variations de pH (6.5 - 7.5, l'optimum étant 7.2).

Aérobies strictes, les bactéries de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* pouvant utiliser pour respiration les nitrates comme accepteurs d'hydrogène, en conséquence dans les milieux anaérobies contenant des nitrates, elle cultive dans toute la hauteur de tube (C. Lilet et al., 1983).

Le bouillon est troublé avec développement d'un voile en surface, parfois limité à un simple anneau adhérent aux parois du tube. La culture, très alcaline, répand une odeur aromatique. Après quelques jours, un sédiment visqueux s'accumule en profondeurs (C. Lilet et al., 1983).

En deux à quatre jours, on assiste souvent à un bleuissement ou verdissement des milieux de culture dû aux pigments diffusibles élaborés par la bactérie (Lilet et *al.*, 1983).

II-2-6-Pouvoirs pathogènes

La bactérie n'est pas pathogène pour le sujet normal, mais elle peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries. Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques (en particulier chez atteints de mucoviscidose), pulmonaire, oculaires (kératite ou enophtalmie), ostéo-articulaires.

Elle peut aussi infecter des lésions cutanées (brulures), des traumatiques ou postopératoires, provoquer des otites externes (pouvant évoluer d'une manière invasive chez les sujets âgés et diabétiques), des septicémies, des endocardites (Nauciel et Vildé, 2005).

Partie Expérimental

Chapitre I

Matériel et méthode

I-Objectif de travail

Cette présente étude vise particulièrement à :

- Procéder à l'extraction de l'extrait de : *Syzygium Aromaticum* (clous de girofle) et *Illicium verum* (anis étoilé) par l'utilisation de trois méthodes d'extractions différentes : macération par solvant, décoction et infusion aqueuse.
- Effectuer une étude qualitative par un screening phytochimiques en vue de caractériser les différents métabolites secondaires qui constituent les deux épices.
- Réaliser une étude quantitative par un dosage des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes.
- Calculer le rendement de l'huile essentielle de *Syzygium Aromaticum L.* et *Illicium verum L.*
- Etudier l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des deux épices à différentes concentrations sur deux germes pathogènes ubiquitaires *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

II-Présentation du lieu de l'étude expérimentale

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie et de microbiologie à l'Université Abd-El-Hamid Ibn-Badiss, Mostaganem.

III-Matériel et méthodes

III-1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de deux épices *Illicium verum L.*, et *Syzygium Aromaticum L.*, achetées au marchés de Mostaganem (Algérie).

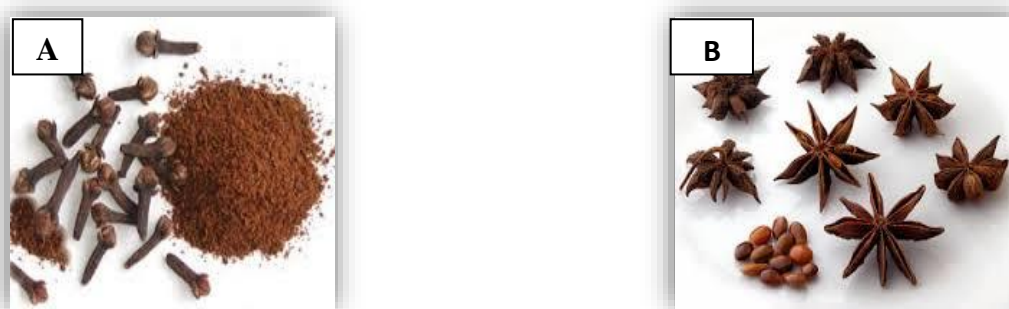


Fig. 05: Matériel végétal utilisé lors des expériences A : *Syzygium Aromaticum (L.)* et B : *Illicium verum (L.)*.

III-2-Matériel microbien

Les deux souches bactériennes choisies au cours de cette étude sont à l'origine de plusieurs infections. Ces souches ont été fournies de l'hôpital Chiguivara. (Mostaganem, Algérie). Elles comprennent de souches bactériennes cliniques, il s'agit de : *Escherichia Coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Le choix des souches à tester s'est basé sur le caractère pathogénique, sur les études déjà réalisées et sur leur disponibilité au laboratoire.

III-3-Milieus de culture

La culture des bactéries a nécessité l'utilisation des milieux suivants : la gélose Mueller Hinton (MH), les bouillons nutritifs. La composition chimique de ces différents milieux de culture se trouve en annexe II.

V-1- Préparation des extraits

V-1-1- Macération

10 g de poudre d'épice est macérée dans 100 ml de méthanol pendant 24 heures à une température ambiante, l'extrait est filtré pour nos futures investigations phytochimiques.

V-1-2- Décoction aqueuse

100 g de poudres d'épices (clous de giroflée et anis étoilée) est mis dans 1000 ml d'eau distillé. Le mélange est agité grâce à un agitateur à une température de 100 °C pendant une heure. L'extrait obtenu est mis dans un bain marie 90 °C pendant une heure puis filtrer et évaporer sous rota-vapeur à 40°C.

V-1-3- Infusion

10 g de poudres de chaque épice est infusé dans 100 ml d'eau distillé pendant 30 minutes à une température ambiante puis filtrer par un papier filtre.

IV-Tests phytochimiques

Un screening chimique ayant pour but la mise en évidence des différents métabolites secondaires : saponines, tanins, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes et polyphénols a été réalisé selon des méthodes standardisées par **Solfo (1973) et Bouquet (1972)**.

IV-2-1- Détection des saponosids

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse (**Bruneton, 1999**). Leur détection est réalisée en ajoutant 1ml d'eau à 2 ml de l'extrait, après agitation, le mélange est abandonné pendant 15 minutes et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse = test négatif (-)

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif(+)

Mousse de 1-2cm = test positif (++)

Mousse plus de 2cm = test très positif (+++).

IV-2-2- Détection des polyphénoles

Huit gouttes d'une solution diluée de chlorure ferrique (FeCl_3) à 2% sont ajoutées à 1 ml de l'extrait. Après quelques minutes d'incubation à température ambiante, le chlorure ferrique développe une coloration bleu-noir ou verte plus au mois foncé fut le signe de présence des polyphénols.

IV2-3- Détection alcaloïdes

Deux millilitres d'acide chlorhydrique à 1% sont ajoutés à 1 ml d'extrait, le tout est chauffé au ban-marine. L'extrait est divisé en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc jaunâtre par le réactif de Mayer ou rouge, orange à brun pour le réactif de wagner confirme la présence des alcaloïdes.

IV-2-4- Détection flavonoïdes

Dix gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium sont ajoutés à 0.5 ml de l'extrait.

La coloration rose-rouge ou jaune, après trois minutes d'incubation à température ambiante indique la présence des flavonoïdes.

IV-2-5- Détection de tanin

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait aqueux, 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée 10 fois. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins

IV-2-6- Détection de terpénoïdes

0.5 ml de chloroforme et 0.7 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés à 1 ml de l'extrait. La couleur vert-bleu révèle la présence des hétérosides stéroïdiens alors que la couleur vert-violet révèle la présence des hétérosides terpéniques.

V-Etude qualitatifs

V-1- Dosage des composés phénoliques totaux

Dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrit par (**Dewanto et al., 2002**). Le principe de la méthode est fondé sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif « Folin-Ciocalteu », qui est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique de couleur jaune. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 750nm. Une prise de 100 μl de l'extrait est mélangée avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex, Après cinq minutes, 100 μl du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) sont ajouté au mélange, le tout est laissé pendant 30 minutes à la température ambiante, et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm.

Une gamme étalon à base de l'acide gallique est également préparée à des concentrations allant de 0 à 500 ug /ml. Les teneurs en polyphénols totaux de l'extrait sont alors exprimés un milligramme équivalent acide gallique.

V-2- Dosage Flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes est faite selon une méthode colorimétrique décrite par (**Dewanto et al., 2002**). Le principe de la méthode est fondé sur l'oxydation des flavonoïdes par deux réactifs incolores, le nitrite de sodium et le chlorure d'aluminium. Elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 51nm.

Une prise de 250 ul de l'extrait diluée est additionnée de 75 ul d'une solution de nitrite de sodium à 5 %. Après six minutes d'incubation à température ambiante, 150 ul d'une solution fraîchement préparation de chlorure d'aluminium (10%) sont ajoutés au mélange. Après Cinq minutes de repos à température ambiante, 500ul d'hydroxyde de sodium (1M) sont apportés au mélange, le volume final est porté à 2.5 ml avec de l'eau distillé. L'absorbance de cette préparation est mesure contre un blanc à 510nm. Une gamme étalon à base de catechine est également préparée à des concentrations allant de 0 à 500ug/ml.

VI-Extraction de l'huile essentielle des clous de girofle et anis étoilé

Le matériel végétal est soumis à un entrainement à la vapeur au moyen d'un dispositif.(**Figure N°06**). Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. Ce dernier se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement.

L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition. Elle consiste à introduire 500 g de masse végétale (l'épice un peut de broyage) dans un plaque perforée, à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli 1/3 d'eau distiller. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentín de refroidissement où aura lieu la condensation Les gouttelettes ainsi produites s'accumule dans le tube rempli auparavant d'eau distillée.

L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est conservée dans des tubes à essais bien scellés à température basse.



Fig N °06 : Dispositif d'extraction de l'huile essentielle « entrainement à la vapeur ».

➤ **Calcul du rendement :**

Le rendement en huile est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile obtenue et la masse du matériel végétal à traiter.

$$\mathbf{Rd\% = m_1 / m_0 \times 100\%}$$

Rd : rendement de l'huile en pourcentage ;

m₁ : masse de l'huile en g ;

m₀ : masse de la matière végétale en g.

VII- Identification des souches bactérienne

VII-1-Etude macroscopique

Une observer de la forme des colonies, la couleur et texture a été réalisée.

VII-2-Etude microscopique

VII-2-1- Coloration de Gram

❖ Principe :

C'est la coloration de base en bactériologie, elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'une des caractères essentiels de la classification des bactéries. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration

- la différence de composition chimique de bactéries.
- La différence de perméabilité de la paroi bactérienne.

❖ Technique :

La coloration de Gram déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consistent à :

- Fixer le frottis à la flamme d'un bec bunsen.
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet puis laissé agir une minute (violet de gentiane)
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau.
- Recouvrir la préparation de Lugol, laisser agir une minute.
- Rejeter le Lugol puis laver à l'eau.
- Décolorer à l'alcool.
- Rincer à l'eau courante à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laissé agir une minute.
- Rejeter la fuchsine, lavée abondamment, égoutté, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres, puis à la chaleur (*Gueye, 2007*).

VII-3- L'identification biochimique par la galerie biochimique API 20 E

❖ Le test de système API20E

API20E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autre bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Les caractéristiques physiologiques et métaboliques de la souche bactérienne sont évaluées par des tests biochimiques miniaturisés standardisés en utilisant la

galerie API20E permettant une identification rapide. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Figure N°07**)

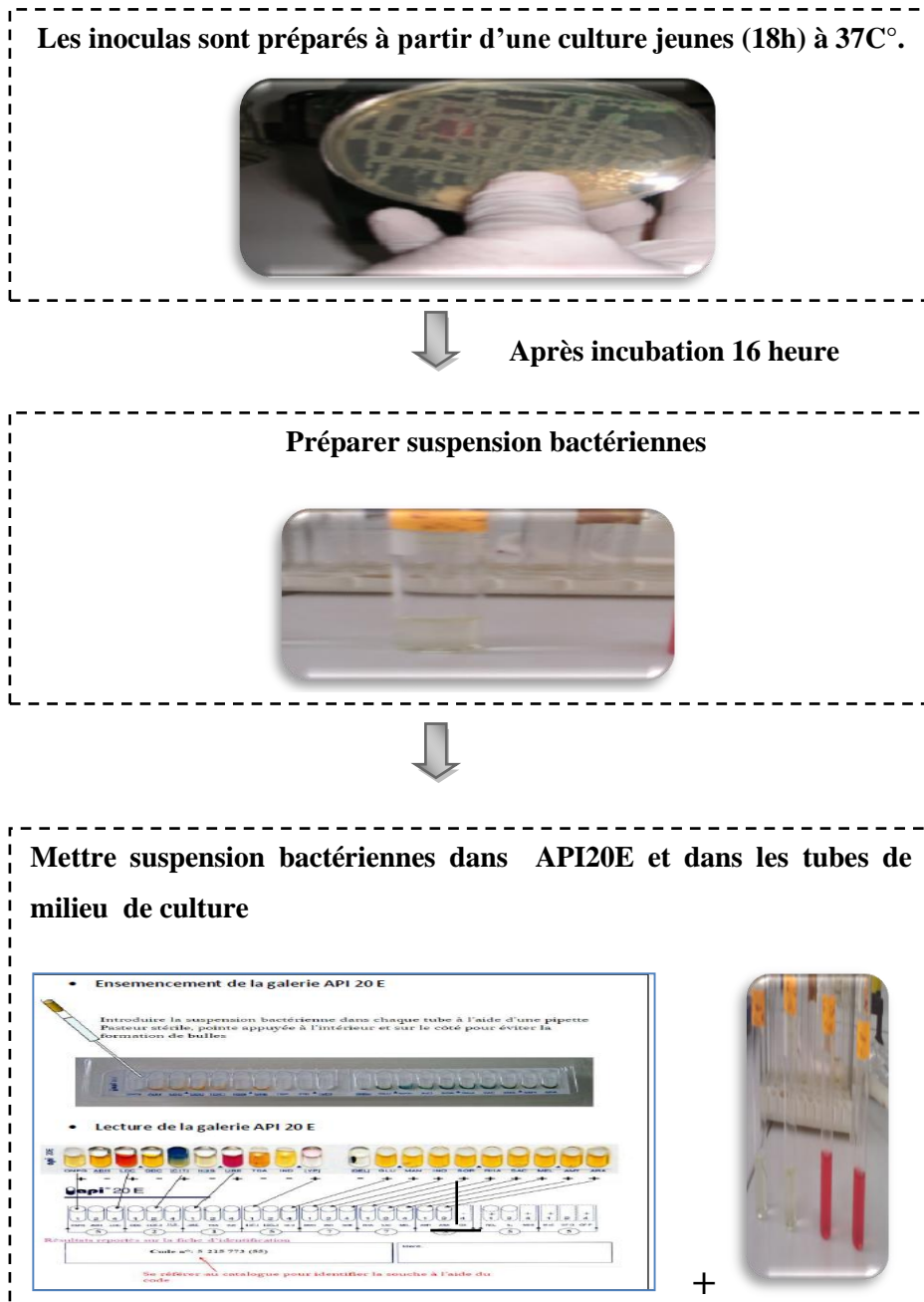


Fig N°0 7: Examen de l'identification biochimique par la galerie biochimique API 20 des souches bactériennes étudiées *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

VIII- Tests de l'activité antimicrobienne

VIII-1- Préparation des dilutions de l'huile

Les différentes dilutions des huiles ont été préparées dans le DMSO. Les concentrations des huiles des différentes dilutions sont les suivantes 0 ; 6.25% ; 12.5% ; 25%, 50% et 100%.

VIII-2- Activation des souches étudiées

A partir d'un milieu de conservation on effectue un prélèvement de 1ml qui va être introduit dans 9ml de bouillon nutritif, qu'on incube à 37°C durant 3 heures. 0,1 ml de cette dernière solution estensemencée en surface dans une boîte de pétri renfermant le milieu solide (MH), et qui va être incubé à 37°C durant 24 heures (Moroh *et al*, 2008).

VII-2-1- Repiquage des souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Les colonies isolées ont servi à préparer l'inoculum (Moroh *et al*, 2008).

VIII-3-Préparation de l'inoculum

Après 24 heures d'incubation à 37°C, trois à quatre colonies bien isolées sont prélevées et émulsionnées dans 5 ml de bouillon nutritif. Des dilutions de suspension bactérienne sont effectuées afin de standardiser l'inoculum. La concentration finale des bactéries.

VIII-4- Antibiogramme

VIII-4-1-Principe

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. (Broadsky *et al.*, 1976).

VIII-4-2. Etude de l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles des deux épices

Une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Farland est préparée à partir d'une culture pure et jeune âgée de 18 heures. Cette opacité, équivalente à une densité optique de 0.08 – 0.1 à 625 nm, peut être diminuée (ou augmentée) en ajoutant plus de culture afin d'ajuster la densité optique (DO).

Il est à signaler d'une part que la suspension ajustée devra contenir 10^7 UFC/ml (units forming colony /ml) et d'autre part que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au delà de 15 minutes faute de quoi la concentration et donc l'opacité risque d'augmenter à cause de la croissance bactérienne.

Cet inoculum sert à ensemercer des géloses de Mueller Hinton coulées dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm (qui correspond à 20 ml pour les boîtes de 90 mm de diamètre) puis séchées à l'étuve à 37°C avant emploi.

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Pour chaque souche testée, trois boîtes de Pétri sont écouvillonnées par le même écouvillon à la condition d'être recharger pour chacune d'elles.

Des disques de papiers wattmen de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés sont déposés à la surface de gélose ensemencée après avoir été chargé de 15 µl d'huile essentielle diluée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde). D'autres disques, imbibé de DMSO sont utilisés comme témoins. Des antibiotiques sont effectués en parallèle avec les aromatoigrammes. Afin de garantir des conditions expérimentales comparables, chaque trois dépôt d'huile essentielle de concentration similaire ont été placés dans la même boîte. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré.

- La sensibilité de la souche est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm.
- La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm.
- Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm.
- Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm la bactérie est très sensible (**Duraffourd et al., 1990**).

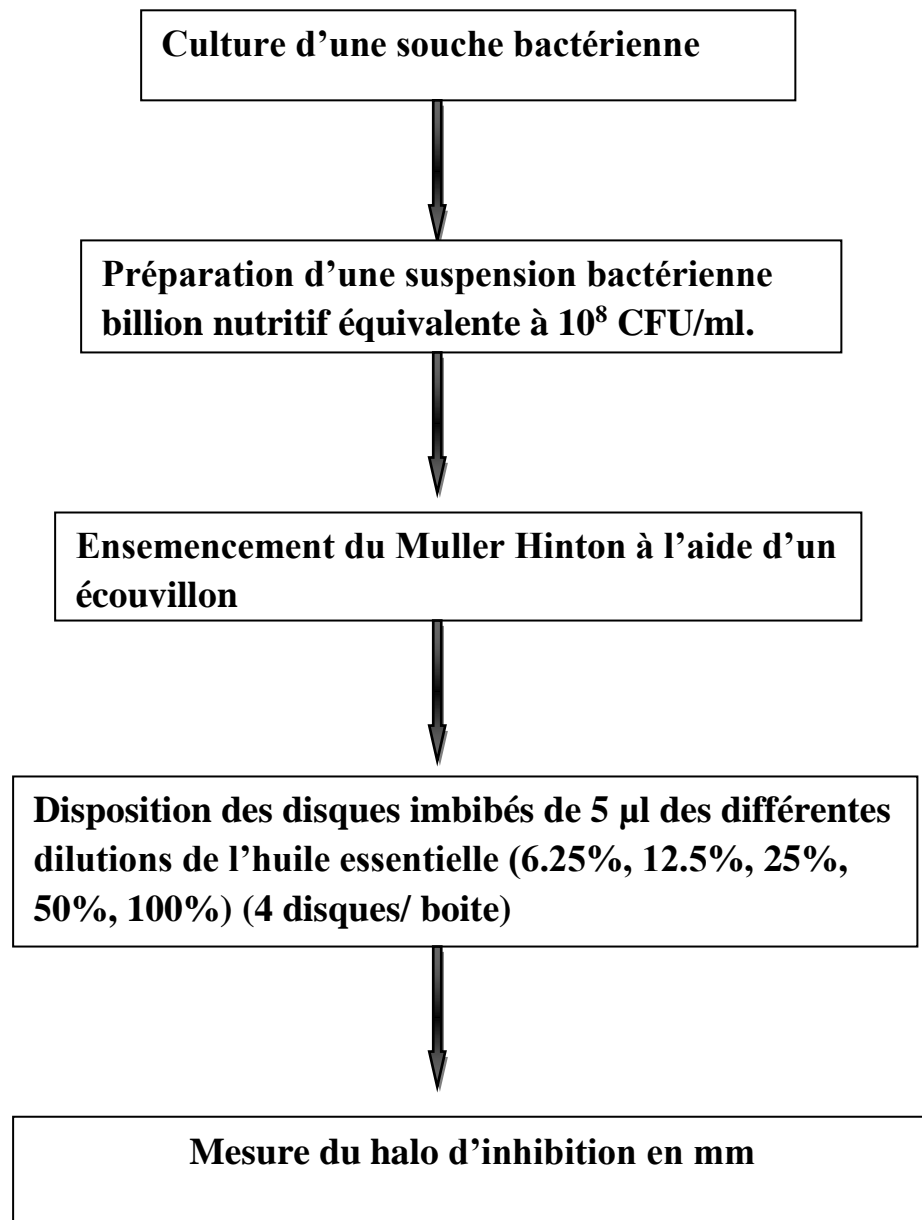


Fig. 08 : Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne

Chapitre II

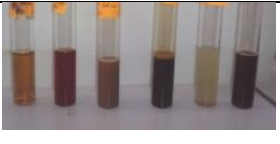

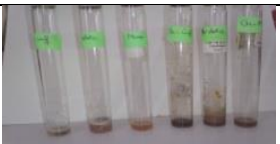

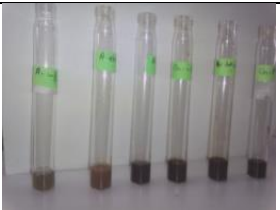

Résultats et discussion

I-Etude phytochimiques

I-1-Tests qualitatifs préliminaires

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur les trois extraits aqueux, macéré et infusé sont présentés dans le tableau n °5 .

Tableau N °05 : Résultats du screening phytochimique de clous de girofle et anis étoilé.

Extrait Métabolite Secondaire	Méthode Infusion		Méthode décoction		Méthode Macération		
	Clous de Girofle	Anis Etoilée	Clous de Girofle	Anis Etoilée	Clous de Girofle	Anis Etoilée	
Saponosides	+	+	+	+	-	-	
Polyphénols	+++	+++	+++	-	+++	+++	
Flavonoïdes	++	-	++	+	+++	+++	
Alcaloïdes	+	-	+	-	+	-	
Tanin catéchine	-	+++	-	-	-	+++	
Tanin gallique	+++	-	+++	-	+++	-	
Tétrapaonidés héterosides	++	-	-	-	+++	-	
Tétrapanoides stéroïdiens	-	-	+	+++	-	+++	

(+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

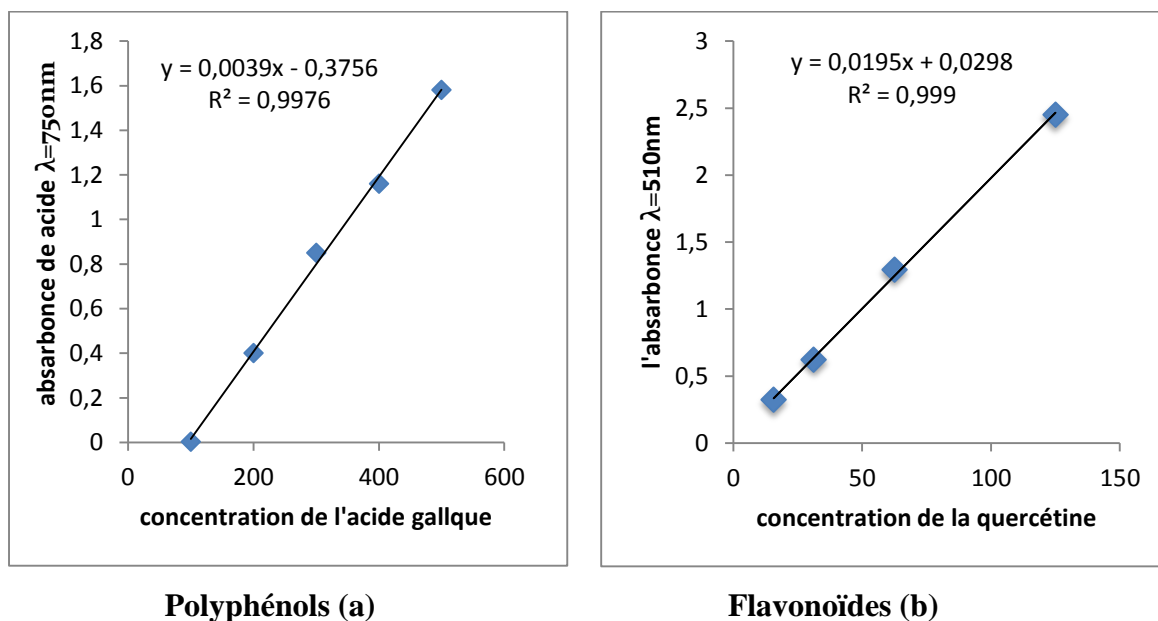
Les résultats obtenus indiquent la présence des polyphénol, des flavonoïdes, des tanins et des stérols et triterpènes en quantités importantes pour les trois extraits, et la présence modérée des : terpénoïdes, saponosides et des composés réducteurs et enfin en plus faible quantité, les alcaloïdes.

Le solvant méthanol par « macération » a extrait une quantité meilleure en familles chimiques comparativement à d'extraction par décoction et infusion.

I-2-Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été réalisée en utilisant la méthode de Folin- Ciocalteu (Li et al., 2007), l'acide gallique a été utilisé comme standard.

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996), la quercétine a été utilisée comme standard. Les résultats du dosage sont représentés dans le tableau n °, et les gammes d'étalonnages dans les figure 09.



(a) μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait).

(b) μg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait)

Fig09 : Résultats du dosage acide gallique et quercétine.

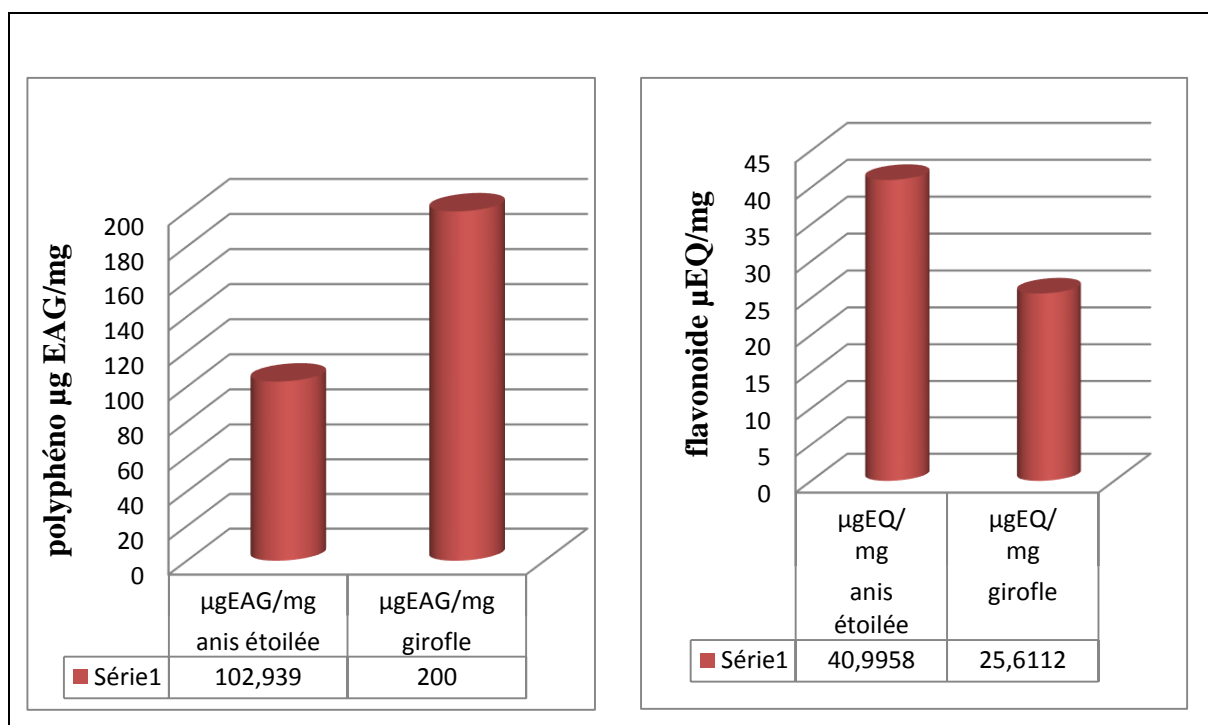


Fig10 : Résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits de clous de girofle et anis étoilée.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que l'extrait clous de girofle est le plus riche en composés phénoliques avec une quantité de 200 µg EAG/mg, suivi par l'extrait anis étoilée de 102.939 µg EAG/mg d'extrait). L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'aluminium montre que l'extrait anis étoilée d'extrait est le plus riches en flavonoïdes (40.995 µg EQ/mg), suivi par l'extrait de clous de girofle 25.611 µg EQ/mg d'extrait.

Si on compare les résultats du dosage avec ceux de la bibliographie, on constate que la teneur en polyphénols de clous de girofle 200 µg EAG/mg est presque le même de **Beamed (2014)**, soit 230 µg EAG/mg, tandis que les teneurs en flavonoïdes se rapprochent 25.611EQ µl/mg versus 17 EQµl/mg pour l'extrait méthanoïque brute de clous de girofle.

Nos résultats se ressemblent avec ce de **Jssas. J (2014)** ou le taux des polyphenols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait aqueux d'anis étoilé est de est de 112,4 µg EQ/ mg et 102.939 µg EQ/ mg respectivement. L'étude effectuée par **Beamed (2014)** affirme la richesse d'anis étoilé en flavonoïde soit 46.8 µl EQ/mg.

Toute fois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études. Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques, des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que des facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation d'épice et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga, 2001 ; Pedneault et *al.*, 2001 ; Fiorucci, 2006).

II- Identification des bactéries testées

II-1-Observation macroscopique des colonies

Les observations macroscopiques sont résumées dans le (**Tableau N°12**)

Tableau N°06 : Résultat d'observations macroscopiques sur les souches cliniques étudiées

Isolats	Milieu d'isolement	Température d'incubation	Forme macroscopique
<i>Escherichia coli</i>	Gélose hectoen	37°C	Colonies arrondies smooths, bombées.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose hecton	37°C	bâtonnets, mobiles par cils polaires,

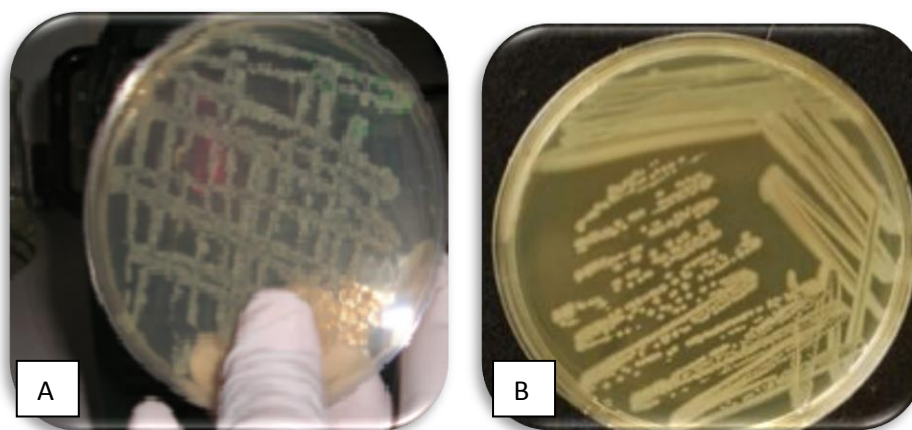


Fig N°11: observation macroscopique des souches cliniques sur des milieux sélectifs : **A** : *Escherichia Coli*, **B** : *Pseudomonas aeruginosa*

II-2-Observation microscopique des colonies

Après la réalisation de coloration de gram pour les germes isolés, on a obtenu des cellules colorées avec le rose ce qui confirme qu'il sagit de bactérie à Grams négatif(**Fig N°13**).

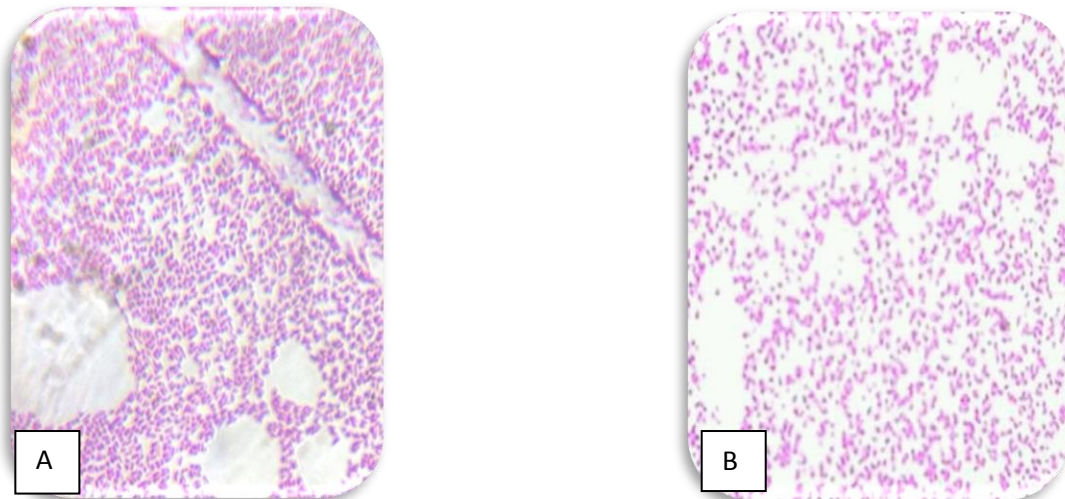


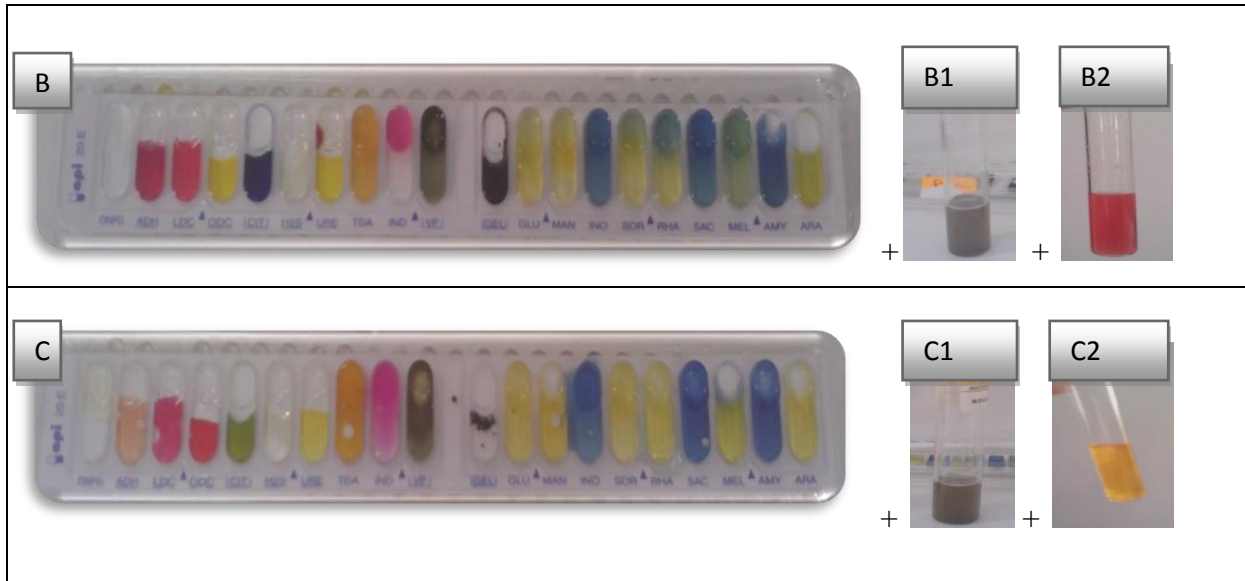
Fig N°12 :Coloration de Gram de *Escherichia coli* et *Pseudomanas aurogenosa* (X 100).

A : *Escherichia Coli*, **B** : *Pseudomanas aeruginosa*.

II-3- Identification biochimiques par galerie biochimique API20E

Les caractéristiques physiologiques et métaboliques des souches bactériennes sont évaluées par des tests biochimiques miniaturisés standardisés en utilisant la galerie API20E (Figure 13) permettant une identification rapide.

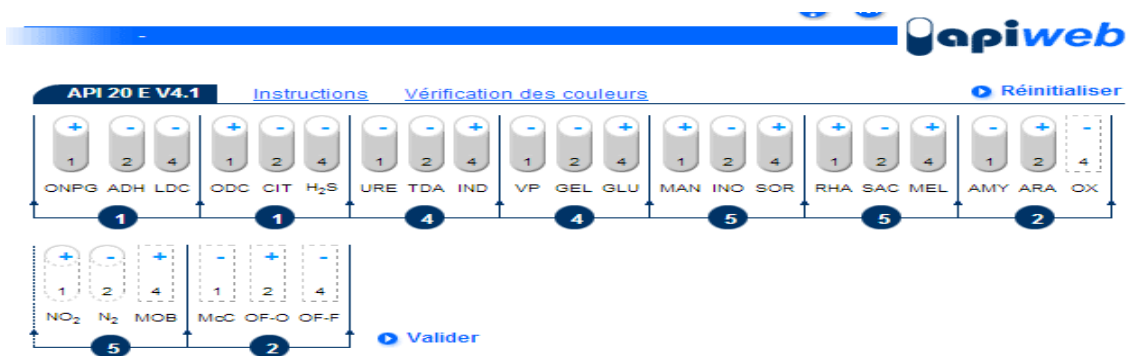




A : API 20 E. Témoin ; B : API 20 E. *p. auroginosa* ; C : API 20 E. *E. coli*
 A1 : Bouillon nitrate Témoin; B1 : Bouillon nitrate *ps.* ; C1 : Bouillon nitrate *Es.*
 A2 : mannitol mobilité Témoin; B2 : mannitol mobilité *Ps.* C2 : mannitol mobilité *Es.*

Fig13 : Résultats obtenus de l'identification biochimiques par galerie biochimique API20E

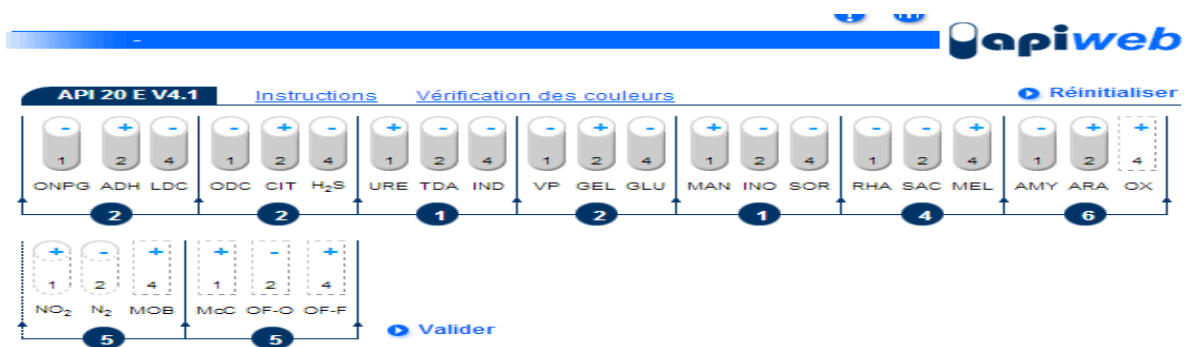
Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les résultats obtenus sont représentés dans le figure n °14.



Profil biochimiques de la souche *Escherichia coli* sur le site web d'internet API 20E V4.1.

PROFIL DOUTEUX							
Galerie	API 20 E V4.1						
Profil	1 1 4 4 5 5 2 5 2						
Note(s)							
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre				
<i>Escherichia coli</i> 1	99.2	0.26	McC 100%	OF/F 100%			
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre				
<i>Citrobacter koseri</i> /farmeri	0.4	0.0	SAC 99%	AMY 99%	McC 100%	OF/F 100%	

Le résultat final de la souche *Escherichia coli* par le site web d'internet API 20E V4.1.



Profil biochimiques de la souche *Pseudomonas aeruginosa* sur le site web d'internet API 20E V4.1.

PROFIL INACCEPTABLE							
Galerie	API 20 E V4.1						
Profil	2 2 1 2 1 4 6 5 5						
Note(s)							
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			URE 25%	MAN 0%	MEL 10%	ARA 25%	
			NO ₂ 12%	OF/O 98%	OF/F 0%		

Le résultat final de la souche *Pseudomonas aeruginosa* par le site web d'internet API 20E V4.1.

Fig N°14 : Résultats finals de l'identification biochimique.

Les résultats d'identification ont confirmé les souches étudiées sélectionnées dans le test d'activité antibactérienne de l'huile essentielle. *Escherichia coli* ATCC 25921 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

III-Rendement des huiles essentielles

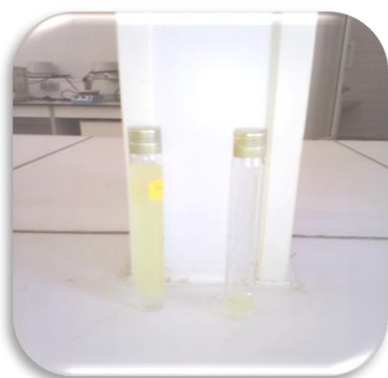
L'huile essentielle de chaque épice a été caractérisée par sa couleur, son odeur et son rendement, ces éléments sont présentés dans le tableau N°08.

huile essentielle de	Caractéristiques organoleptiques				
	Aspect	Couleur	Odeur	Gout	Rendement
<i>Illicium verum</i>	Liquide mobile	Jaune claire	Forte	sucré	4.58%
<i>Syzygium Aromaticum</i>	Liquide mobile	Jaune claire	Forte	amère	3.302%

Tableau 07 : Odeur, couleur et rendement des huiles essentielles obtenus.

Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec rendu en poudre, les résultats ont été exprimés en pourcentage par 100g de matière sèche (P/P).

D'après nos résultats, Le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'huile essentielle d'anis étoilé soit 4.58% suivie de clous de girofle de l'huile essentielle de 3.209%, soit 0.18%. Toutefois, il est difficile de comparer les résultats du rendement avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, ainsi qu'à l'origine géographique de l'épice.



H.E. Anis étoilée



H.E. Clous de girofle

Fig N°15 : Huiles essentielles obtenus d'anis étoilée et clous de girofle.

IV- Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium Aromaticum* et *Illicium verum*

En milieu solide l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile de *Syzygium Aromaticum* est déterminée par les mesures des diamètres d'inhibition de la croissance en millimètre autour des disques. Les résultats des différents germes sont présentés dans la (figure). Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne augmentent avec l'augmentation des doses des huiles. Cette activité inhibitrice des huiles sur les deux souches bactériennes est très faible que celle due aux antibiotiques de références.

Tableau °08. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzygium Aromaticum* et *Illicium verum* (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).

La déférente concentration			Témoin	6.25	12.5	25	50	100
Diamètre Zone inhibition mm	Clous de girofle	<i>Escherichia coli</i>	6	11	11	13	14	16
		<i>Pseudomanas aeruginosa</i>	6	8	10	12	13	14
	Anis étoilée	<i>Escherichia coli</i>	6	9	10	11	13	15
		<i>Pseudomanas aeruginosa</i>	6	9	9	10	10	12

Pour l'huile essentielle de clous de girofle, la plus grande zone d'inhibition a été observée chez *E. coli* avec une zone d'inhibition de 16 mm de diamètre. La zone la plus faible a été observée chez *P. auroginosa* avec un diamètre de 8 mm (**Figure 15**)

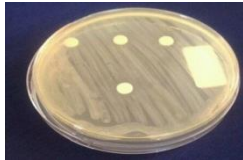
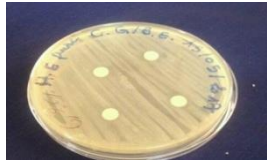

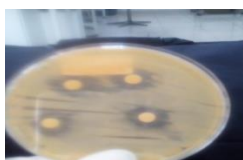

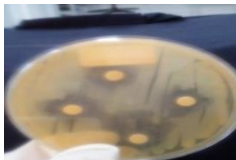


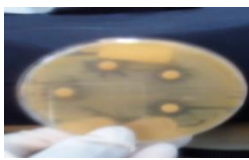
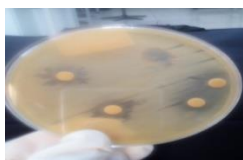



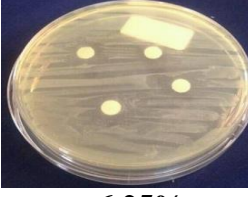

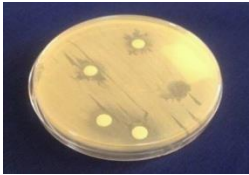
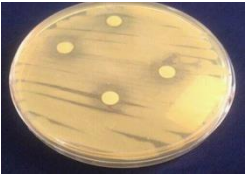
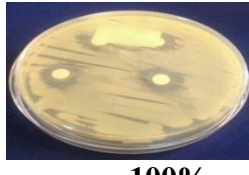



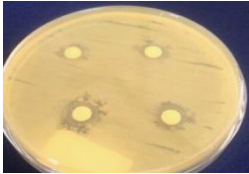
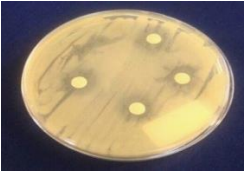
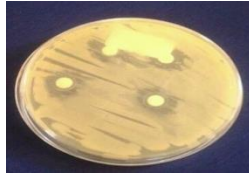
<i>E. coli</i>	 Témoin	 6.5%	 12.5%
	 25%	 50%	 100%
<i>P. auroginosa</i>	 Témoin	 6.25%	 12.5%
	 25%	 50%	 100%

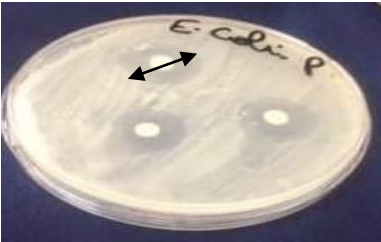
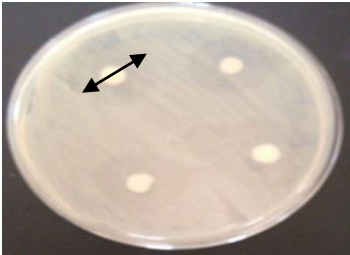
Fig 16 : Effet antibactérien d'huile essentielle de *Syzygium Aromaticum* sur les différentes souches bactériennes testées.

Pour huile essentielles d'anis étoilée, la plus grande zone d'inhibition a été observée chez *E. coli* avec une zone de 15 mm de diamètre. La zone la plus faible a été observée chez *P. auroginosa* avec un diamètre de 08 mm (**Figure 16**)

<i>E. coli</i>	 Témoin	 6.25%	 12.5%
	 25%	 50%	 100%
<i>p. auroginosa</i>	 Témoin	 6.25%	 12.5%
	 25%	 50%	 100%

V- Activité antibactérienne des antibiotiques

V-1-*Escherichia coli*

Antibiotiques	Pénicilline	Cefalexine
Diamètre de zone d'inhibition mm	23 	2.56 

V-2-*Pseudomonas aeruginosa*

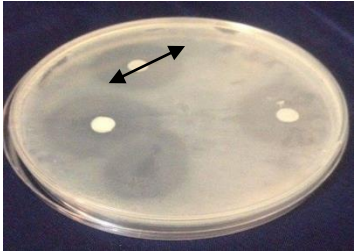
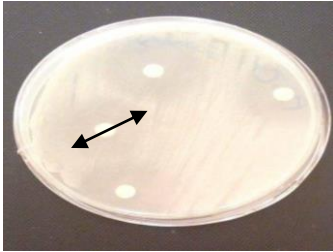
Antibiotiques	Pénicilline	Grentanyn
Diamètre de zone d'inhibition mm	28 	28 

Fig 18 : Effet antibactérien des antibiotiques

Les résultats du test d'antibiogramme montrent une variation dans l'efficacité d'inhibition de l'huile essentielle d'*Illicium verum* et *Syzygium Aromaticum* vis-à-vis des souches bactériennes testées : *Pseudomonas auroginosa* et *Escherichia coli*. Un effet antibactérien considérable a été observé par rapport à celui de l'antibiotique «Cefalexine» contre *E.coli* ou une zone seulement de 2,56 mm a été observée alors qu'une zone de 16mm et 15 a été remarquée avec l'huile essentielle de Clou de girofle et Anis étoilée respectivement.

D'après nos résultats, il semblerait que les moyennes obtenues avec les deux bactéries sont estimés à 28 mm pour *Pseudomonas auroginosa*, et 25.6, 23 mm pour *Escherichia coli*.

L'huile essentielle du *Syzygium Aromaticum* (clou de girofle) présente un effet positif (sensible) sur les souches bactériennes soit 16 mm pour *Escherichia coli* et 14 mm pour *Pseudomonas auroginosa*.

Rhayour et al (2002) ont démontré que l'huile essentielle de Clou de Girofle est fortement antibactérienne. Cette activité pourrait être attribuée à son composé majoritaire qui est "l'eugénol". Les travaux de Valero et Giner en 2006, ont prouvé que l'eugénol parmi d'autres composés a provoqué l'inhibition de la croissance des bactéries *Escherichia coli* et *Pseudomonas auroginosa*

Selon l'étude de **Rhayour (2002)** qui a montré que l'huile essentielle de girofle exerce une activité bactéricide principalement grâce à son constituant majoritaire qui est l'eugenol ce dernier appartient à la famille des phénols.

Il semble donc que l'activité bactéricide d'huile essentielle débiterait par une fixation de ces molécules sur les membranes bactériennes provoquant des altérations de structure et de perméabilité, conduisant à la perte de constituants cellulaires due à une lyse importante des cellules bactériennes.

L'Huile essentielle de *Illicium verum* (anis étoilée) présente un effet positif (sensible) sur les souches bactériennes qui est de 15 mm pour *Escherichia coli* et 12 mm pour celui de *Pseudomonas auroginosa*.

Floris I et al (1996) ont démontré que l'huile essentielle d'anis étoilée sont fortement antibactérienne. Cette activité pourrait être attribuée au "anéthol" composé majoritaire de cette épice. Les travaux de **Floris I et al (1996)**, ont prouvé que l'anéthol provoque l'inhibition de la croissance des bactéries *Escherichia coli* et *Pseudomonas auroginosa*

L'activité antibactérienne sur *Syzygium Aromaticum* et de *Illicium verum* pourrait s'expliquer également par la présence de différents constituants, notamment les égoles et anéthol les composés phénoliques Scalbert, 1991 ; Bruneton, 1993 ; Elegami et al., 2002 ; Hatano et al., 2005 ; Sanogo, 2006 ; Surveswaran et al., 2007).

Conclusion

CONCLUSION

Les substances naturelles constituent de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit.

Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique et antibactérienne de l'huile essentielle de deux épices : *Illicium verum* et *Syzygium aromaticum*.

Pour l'obtention de différents extraits, trois extractions ont été réalisées par une macération au méthanol, infusion et décoction aqueuse

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins condensés et polyphénol ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.

L'analyse quantitative par dosage spectrophotométrique a révélé la richesse de *Syzygium Aromaticum* en polyphénols avec un taux de 200µl EAG/ mg et *illicium verum* en flavonoïdes avec une concentration estimée à 40.995 µl EG/ mg.

L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits de *Syzygium Aromaticum* et *Illicium Verum* par la méthode des disques a révélé que l'huile essentielle des deux épices possèdent une sensibilité moyenne sur les deux souches : *E.coli* et *P. aeruginosa* avec zone d'inhibition comprise entre 12-16mm. La plus forte activité a été obtenue avec l'huile essentielle de Clous de girofle avec une zone d'inhibition de croissance de 16mm contre *E.col* à la concentration de 100%.

Ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur ce fruit en se focalisant sur d'autres extraits voir même isolement de substances qui sous tendent les diverses activités détectées. De plus, des études approfondies concernant l'identification des composés par des méthodes plus performantes (CPG, CPG/SM) seront nécessaires. Pour mieux évaluer l'activité Antibactérienne, d'autres études *in Vitro* et *in Vivo* seraient intéressantes, et il serait Souhaitable de faire d'autres poursuites afin de dévoiler les autres activités biologiques de *Syzygium aromaticum* et *Illicium verum*.

Références bibliographiques

A

1. **Abdesselam Z., 2006.** Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News.*, pp.6-16
2. **Azevedo N.R.,** Campos I.F.P., Ferreira H.D., Portes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C. Paula J.R. and Ferri

B

3. **Belaiche P. (1979)** - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 :l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
4. **Ben messaoud Kawthar Oumel kheir (2004-2005),** l'otite moyenne chronique ;
5. **Benjilali B. (2004)** – Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59
6. **British Pharmacopoeia(1993) Volumes I, II**
7. **Bruneton J (1999)** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations Lavoisie
8. **Bruneton J. (1999)** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations Lavoisier.
9. **Burdock GA (Ed) (1995)** Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. Volume I, 3e Edition CRC Press.

C

10. **C. Lilet ; J Bourdon ; B Toma ; N Marchal et C. Balbastre (1983) ; Bactériologie**
11. **Carole M.2013,** Badiane (Anis étoilé).
12. **cristan Carip et al., 2008.**Taxonomie et pathogénie bactérienne. Ed lavoisier Tec and Doc : Paris ; 110-122p.

D

13. **Dewanto VX, Wuk, Adon K et al (2002) Thermal processing enhances the nutrition value of tomatoes by increasing total antioxydant activity. I agric food chen 50 : 3010-4.**
14. **Diplôme supérieur en Microbiologie université de Kasdi Merbah Ouargla PP 18-32.**

F

- 15. Flandrios J.P. (1997) :** Bacteriologie Médicale collection AZAYPP : 2007.

G

- 16. Ghedira K., Goetz P., Le Jeune R. (2010) Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier, Phytothérapie, 8, 37-43.**

H

- 17. Hoehn K, Marieb E.** Anatomie et physiologie humaines adaptation de la 8e édition américaine. Pearson, Paris, **2010**, pp. 1116-1148.

J

- 18. Jacob M., Pellecuer J. & Tomei R., 1979.** Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 11: pp. 26-30.
- 19. Jaff L, Wayne L.** Collaboré avec les bactéries et autre micro-organisme ; ouvrage réalisé par le studio graphique des éditions du rouergue Achévé d'imprimer en mars **2008** sur les presses de Tipostampa. AS 5778, chapitre 3, p 44.

K

- 20. Kumar C, Karthik I, Kokah vs.** Antimicrobiol activity of la tex of colotropis gigantea against pathogenic microorganisme Invitro Study. *Pharmacologonline* 2010 3 : 155-163.

L

- 21. Le minor. L et Veron. M, 1982-** bactériologie médicale. Médecine-science Flammario, p : 10-51
- 22. Leung Albert Y (1980) Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics. Wiley-Interscience Publication New York.**

M

23. **Moroh J, Bahi C,Dje K, Loukou Y, Gued-Guina F, 2008.** Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétique de morinda morindoides sur la croissance in vitro des souches d'Escherichia coli. Bulletin de la société royale des sciences de liège : pp44-66
24. **médicale et vétérinaire- systématique bactérienne ; Edition DOIN. PP 150-190.**

N

25. **Nauciel et validé, 2005 - bactériologie médicale, 2ème édition**

O

26. **Oulymata G. (2007).** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification.
27. **Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennnd K.N., Kanko C., Ahibo C. & Casanovad J., 2008.** Etude chimique et activite antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopee ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. Vol. 24, №1, pp. 94-103.

P

28. **P.H. (2001) - Chemical variability in the essential oil of Hyptis suaveolens. Phytochemistry, 57:733-736.**
- **Cosentino S., Tuberoso C. L., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F. (1999) – In vitro antimicrobial activity and chemical composition Sardinian Thymus essential oils. Lett. Appl. Microbiol., 29(2) : 130-135.**
29. **Perry J. , Jans T.S., Stephen L. (2004) :** Microbiologie cours et question de revision Ed, DUNOD. PP ; 431-432.
30. **Pibiri M.C., 2006.** Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de doctorat*. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, pp. 28-52.

R

31. **Razakarivony A.A., Andriamihaja B. & Razanamahefa B., 2009.** Etude chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Callistemon rigidium*. *Actes du symposium biomad*. Université d'Antananarivo. 28p.

- 32. Richard H., Loo A. (1992) Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts.**
In Richard H (Coordonnateur) Epice et Aromates. Tec et Doc - Lavoisier, Apria.

S

- 33. Salle J.L. et Pelletier J. (1991) - Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie.** Ed. Frison-Roche, pp.19-45
- 34. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry**

V

- 35. Valnet J. (1984) - Aromathérapie.** Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris p 544

W

- 36. Wilkinson J.M., 2006.** Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII,pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.

Annexe

Annexe I

➤ *Composition des milieux de cultures*

Muller Hinton agar :

- Infusion de viande de boeuf déshydratée.....300 g
- Hydrolysate de caséine.....17.5g
- Amidon de maïs.....5g
- Agar Agar.....13g
- Eau distillée1000 ml

Bouillon nutritif

- Peptone.....5 g
- Extrait de viande.....1 g
- Extrait de levure.....2 g
- Chlorure de Sodium.....5 g
- Eau distillée.....1000 ml

Gélose nutritif

- Extrait de viande.....1g/l
- Extrait de levure.....2,5g/l
- Peptone.....5g/l
- Chlorure de sodium.....5g/l
- Agar.....15g/l
- PH.....7

Résumé

Les huiles essentielles possèdent une importante activité antimicrobienne et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants, ceci nous a conduits à réaliser une analyse chimique et une étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et de *illicium verum*.

L'analyse chimique des trois extraits : macéré, décoction et infusé des deux épices a révélé la présence de les flavonoïdes, les tanins condensés et polyphénol.

La teneur totale en composés phénolique a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de 200 µg EAC/g Ps pour *Syzygium Aromaticum* et 102.939 µg EAC/mg Ps pour celle de *d'Illicium verum*. Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode AlCl₃, leurs teneurs est de 25.611 µg EQ/mg Ps dans l'extrait de *Syzygium Aromaticum* et 40.995 µg EQ/mg Ps pour *d'Illicium verum*. L'extraction de l'huile essentielle par entraînement de la vapeur a révélée un rendement important de 4.58% pour *Illicium verum (L)* et 3.302% pour *Syzygium Aromaticum (L)*.

L'activité antibactérienne e a été déterminée sur deux souches bactériennes pathogènes, selon la méthode de diffusion sur disque. L'huile essentielle du *Syzygium Aromaticum* (clou de girofle) possède une forte activité antibactérienne représentée avec des diamètres d'inhibition variant entre 11 mm à 16 mm contre *Escherichia coli* et 8 mm à 14 mm pour *Pseudomonas auroginosa*.

Les mots clés : *Syzygium Aromaticum*, *Illicium verum*, analyse chimique, activité antibactérienne.

summary

Essential oils possess significant antimicrobial activity and can substitute.

With success to antibiotics that show their inefficiencies against resistant microorganisms, this led us to carry out a chemical analysis and study of the antibacterial activity of essential oils of *syzygium aromaticum* and *illicium verum*.

The chemical analysis of the three extracts: macerated, decoction and infused of both spices revealed the presence of flavonoids, condensed tannins and polyphenol.

The total content of phenolic compound was determined using the Folin-Ciocalteu reagent,

Is 200 µl EAC / mg Ps for *Syzygium Aromaticum* and 102.939 µl EAC / mg Ps for that of *Illicium verum*. Flavonoids were evaluated using the AlCl₃ method, their contents being 25.611 µl EQ /mg Extract of *Syzygium Aromaticum* and 40.995 µl EQ /mg Ps for *Illicium verum*. Extraction of the essential oil by steam distillation showed a significant yield of 4.58% for *Illicium verum (L)* and 3.302% for *Syzygium Aromaticum (L)*.

The antibacterial activity was determined on two pathogenic bacterial strains, according to the disk diffusion method. The essential oil of *Syzygium Aromaticum* (clove) has a strong antibacterial activity represented with inhibition diameters varying between 11 mm to 16 mm against *Escherichia coli* and 8 mm to 14 mm for *Pseudomonas auroginosa*.

Key Wordes : *Syzygium Aromaticum* , *Illicium verum*, chemical analysis, antibacterial activity.