

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun –Tiaret-



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Sciences biologiques"

Spécialité: "Microbiologie Appliquée"

Présenté par :

- MOSTEFA MIMOUNA

- OULARBI SARRA

- TAOUCH FATIMA ZOHRA

Thème

**Evaluation de l'effet antifongique par liquides ioniques
et l'huile essentielle comme nouveaux milieux**

Soutenu publiquement le 30 juin 2020 devant le jury composé de :

- | | |
|---------------------------------|---------------|
| - Président : Dr. BENSALIM M. O | Grade « MCA » |
| - Examineur : Dr. BENGUIAR. R | Grade « MCA » |
| - Promoteur : Dr. FETOUHI. B | Grade « MCB » |
| - Co-promoteur : Dr. YEZLI .W | Grade « MCB » |

Année universitaire: 2019 - 2020

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier **DIEU** tout puissant. Louange à **Allah**, le très puissant, clément et miséricordieux de nous avoir accordé la force, le courage, la Volonté, les moyens, la patience nécessaire pour achever ce modeste travail de fin d'études et nous avoir guidées durant ces années.

Nous remercions vivement respectivement tous personnes qui ont contribués de près ou de loin au bon déroulement de notre mémoire de fin d'étude et à l'élaboration de ce modeste travail.

Nos remerciements et gratitude vont en particulier et profondément, à notre promoteur **Dc.FETOUHI B** et co-promoteur **Dc.YEZLI W** pour la qualité de leurs enseignements, pour nous avoir épaulé tout au long de ce travail, ses conseils précieux, ses remarques pertinentes, ses aides généreuses, leurs intérêts ainsi à la correction de notre mémoire.

Nos remerciements et notre profond respect vont également à :

Dr. BENSAID M. O le président de jury et **Dr. BENGUIAR .R** l'examineur, qui nous font l'honneur de juger ce modeste travail. Vos suggestions et remarques sont un apport pour la suite de la carrière du chercheur que nous embrassons avec cette recherche.

Nous adressons encore nos remerciements à :

L'ensemble des enseignants pour la sympathie qu'ils nous ont témoignée pendant toutes les années d'études. Je vous dois une grande considération pour votre franche collaboration et votre esprit de convivialité présent dans nos relations le long de ces études.

L'ensemble des membres du département de biologie

L'ensemble des membres de laboratoire de biologie

L'ensemble des compagnons de spécialité microbiologie appliquée de promotion 2020



Mimouna, Sarra, Fatima

Dédicace

Je dédie ce travail :

Aux deux être le plus chers au monde, qui ont souffrent nuit et jour pour nous couvrir de leur amour, mes parents.

A mon père Mohammed pour ses encouragements incessants et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Qu'il trouve dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.

A mon adorable mère Khaldia qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour être sacrifiée pour que ces enfants grandissant et prospèrent. Que Dieu la protège et lui donne santé et qu'elle trouve ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

A ma sœur Hayet et mes frères Abderrahmane, Abd el-Ali, Abdeljalil pour leur disponibilité, leur soutien moral leur encouragement incessant, d'être coopératif et d'assumer à ma place certaine de mes responsabilités familiales.

A mon fiancé Toufik d'être toujours à mes côtés pour me soutenir pour m'aider dans la mesure du possible mais surtout pour donner du goût à ma vie par son amour et sa tendresse, j'espère qu'il trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

A Docteur FETOUHI. B, je tiens à le remercier d'avoir pris en charge, avec efficacité et ténacité, le suivi de ce travail, je lui exprime ma profonde gratitude pour le soutien scientifique que m'avait accordé, mais surtout pour sa disponibilité toutes les fois que le besoin se faisait sentir, pour l'écoute consentie et la clarté de ces relations humaines. Mes remerciements vont vivement et profondément, à mon co-promoteur, **Docteur YEZLI. W**, pour ses conseils précieux, ses remarques pertinentes et ses aides généreuses tout au cours de la rédaction de ce mémoire. Je remercier tous les enseignants de la faculté.

A ma belle-famille pour le soutien, gentillesse, et sympathie que dieu les protège et leur donne une vie pleine de réussite et de bonheur.

A mes amies Ahlem, Souad, Yousra, Amani, kheira, Sarra et Fatima qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Un grand merci à tous ceux que j'ai côtoyé de près ou de loin et que j'ai involontairement oublié. A tous ceux que la recherche du savoir a conduits loin des leurs... je vous suis infiniment reconnaissante.

Mlle. Mostefa Mimouna



Dédicace

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu faire ce modeste travail que Je dédie :

ma très chère mère AICHA, A mon exemple éternel, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, A celle qui m'a étreint de tendresse et d'affection et qui a constitué la première école de mon existence ma très précieuse, chaleureuse et aimable; maman que j'adore. J'implore Dieu, tout puissant, te donne une meilleure santé, une longue vie, beaucoup de bonheur et te préserve de tout mal.

A mon très cher père RACHID, A mon plus haut exemple, mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir A celui qui a lutté pour m'offrir les conditions propices à ma réussite, A mon père que j'aime énormément. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Que Dieu le tout puissant t'accorde une bonne santé, une longue vie pleine de bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A ma très chère sœur ZAHIRA, Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je porte à toi, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon bien être, et ton mari **MALIK**. Permettez-moi de vous transmettre mes meilleures salutations pour les efforts que vous m'avez donné tout au long de mes études car j'étais très aise chez vous. Sans oublier les deux charmants poussins **ISLAM et ANAS** qui ont été très proche de moi et qui me manquent beaucoup. Puisse Dieu tout puissant vous bénisse vous protéger, vous procurer longue vie, bonne santé, bonheur et prospérité.

A mes chères et adorable frère et sœur ISHAK et MOUNIA ; En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu le tout puissant vous protège et vous garde, et bonne réussite dans ton baccalauréat ishak.

A mon fiancé YACINE: Tu m'as toujours incité à faire de mon mieux, ton soutien morale, ton conseil et pour l'affection et l'amour qui nous unit. Je prie Dieu le tout puissant te combler une longue vie pleine de joie et prospérité, et préserver notre attachement mutuel.

A mes chères amies FATIMA et MIMOUNA: En souvenir des moments heureux passés ensemble, avec mes vœux sincères de réussite et bonheur...

A toute ma famille, à mes proches et mes autres amis.....,

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études et Toute la promotion de Master2 2020.

Mlle. OULARBI Sarra



Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde :

A ma chère mère Ghalia, qui n'a ménagé aucun effort pour m'encourager durant mes longues études. Qui a tout fait avec abnégation pour me voir réussir dans ce modeste travail de recherche. Une mère très adorable, d'un soutien infaillible.

A mon cher père Morslé très compréhensible, qui s'est sacrifié pour nous voir grandir et baigner dans la réussite. Ses conseils, ses encouragements. Espérant ces rêves escomptés.

A mon cher frère **TAKI El dine** pour ces encouragements et son appui multidimensionnel et que ce travail soit pour lui une raison pour être fier de tout ce qu'il a fait pour moi. et aussi mes frères **Aoued, Mohamed Saleh et Mohamed Youcef**, que je les aime tous.

A Mes grands-mères, je prie dieu pour les protégés

A toute ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand, sans exception.

Je tiens aussi à dédier ce travail et remercier du fond du cœur, à **Hadjira, Sarra, Mimouna, Fatima, Dhaouia, Nadjet, Messouda, Ithem, Ghalia, Zoubida, Houda et Nour**.....avec qui j'ai grandi, et que je partage ce moment si précieux. A tous mes collègues de 2ème année Master Microbiologie appliquée.

Tous mes enseignants qui m'ont enseigné durant mes années d'études.

« La vie a une fin comme une lumière de bougie s'éteint, mais dans le cœur les souvenirs sont à jamais ancrés »

Mlle. TAOUCH Fatima Zohraa



Liste des abréviations

Acet	Acétone
AcOEt	Acétate d'éthyle
AlCl₃	Chlorure d'aluminium
BF₄⁻	Tétrafluoroborate
BtBr	Bromobutane
Br⁻	Bromure
COV	Composés organiques volatils
Cl⁻	Chlorure
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CAS 25417-20-3	Sodium dibutylnaphthalenesulphonate
Dc	Diamètre de la colonie fongique du témoin
D_o	Diamètre de colonies fongique en présence de LIs ou HE
D	Diamètre de la zone de croissance du chaque jour
Et₂O	Ether diéthylique
EtBr	Bromoéthane
HE (s)	Huile(s) essentielle (s)
I⁻	Iodure
LI(s)	Liquide (s) ionique (s)
mh	Masse d'huiles essentielles récupérées en gramme
mv	Masse d'essai du matériel végétal en gramme
NO₃⁻	Nitrate
N(CN)₂⁻	Dicyanoamidure
NTf₂⁻	Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide
P₂O₅	Pentoxyde de phosphore
PDA	Pomme de terre dextrose agar
ppm	Partie par million
PF₆⁻	Hexafluorosulfonate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RTILs	Room temperature ionic liquids
Rdt	Rendement en huile essentielle
TI	Taux d'inhibition

Tf	Trifluoromethanesulfonate ou triflate
TFSI	Bistriflimide
T.a	Température ambiante
Te	Temps d'incubation (jour)
VC	Vitesse de croissance mycélienne
WG	Granulé dispersible dans l'eau
F	<i>Fusarium</i>
h	Heure
J	Jour
g	Gramme
g/cm³	Unité de la masse volumique
g/mol	Unité de la masse molaire
M	Masse molaire
M	<i>Mentha</i>
m	Masse
min	Minute
ml	Millilitre
mol	Unité de n
n	Nombre de mole
T	Température
V	Volume
µg/ml	Unité de CMI
µl	Unité de volume
ρ	Masse volumique
β	Beta
°C	Degré Celsius
%	Pourcentage

Liste des figures

Figure n° 01: Structures de quelques cations des LIs.....	06
Figure n° 02 : Structures de quelques anions des LIs.....	07
Figure n° 03: Principaux domaines d'applications des LIs.....	10
Figure n° 04: Plante de la menthe verte à l'état frais.....	18
Figure n° 05: Schéma résumant la méthodologie de notre travail.....	20
Figure n° 06 : Imidazole.....	21
Figure n° 07: Elimination du solvant par évaporateur rotatif.....	23
Figure n° 08: Les feuilles séchées de <i>M. spicata</i>	25
Figure n° 09: Dispositif de l'extraction d'HE par hydrodistillation.....	26
Figure n° 10: Appareillage d'hydrodistillation au niveau de laboratoire.....	27
Figure n° 11: Coulage des boîtes de Pétri par le milieu de culture PDA.....	29
Figure n° 12: Prélèvement et inoculation des colonies.....	30
Figure n° 13: Schéma général de l'étape de quaternisation.....	35
Figure n° 14: Aspect macroscopique des souches fongiques obtenues après 5J de repiquage.....	36
Figure n°15: L'influence de la chaîne alkyle sur la viscosité de a) $C_n\text{mimTF}_2\text{N}$ et b) $C_n\text{mimPF}_6$ à 35°C.....	38
Figure n°16: Relation entre les activités antifongiques des 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride et la longueur de la chaîne alkyle du cation imidazolium	46
Figure n° 17: Activités antifongiques des composés cationiques BMIM et divers types d'anions déterminés pour <i>C. albicans</i>	46
Figure n° 18: Les valeurs de CMI de champignons.....	47
Figure n°19: Effet de différente concentration d'HE de <i>M. spicata</i> sur la teneur en ergostérol dans membrane plasmique de <i>A. flavus</i>	48

Liste des tableaux

Tableau N° 01 : Taxonomie du genre <i>Fusarium</i>	13
Tableau N° 02 : Souches fongiques utilisées.....	17
Tableau N° 03 : Taxonomie de <i>M. spicata</i>	18
Tableau N° 04 : Récapitulatif de matériel non biologique utilisé.....	19
Tableau N° 05 : Les produits chimiques utilisés et leurs formules brutes.....	21
Tableau N° 06 : Valeurs de dilutions utilisées.....	31
Tableau N° 07 : Caractéristiques des LIs obtenus	35
Tableau N° 08 : Température de fusion de quelques LIs.....	37
Tableau N° 09 : Valeurs de la densité de quelques LIs à T=25°C.....	37
Tableau N° 10 : Les valeurs de la température de décomposition de certains LIs.....	39
Tableau N° 11 : Les valeurs des LIs qui ont une bonne conductivité ionique	40
Tableau N° 12 : Rendements calculés pour l'HE de <i>M. spicata</i>	41
Tableau N° 13 : La composition chimique de l'HE de <i>M. Spicata</i>	42
Tableau N° 14 : La CMI des sels d'imidazolium et de pyrrolidinonium.....	43
Tableau N° 15 : Valeurs de CMI de 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide (C _n mimBr) et 1-alkylpyridinium bromide (C _n PyrBr).....	44
Tableau N° 16 : Abréviation et nom de tous les ions.....	44
Tableau N° 17 : Activités antifongiques des LIs d'imidazolium mesurées en CMI [mM].....	45
Tableau N° 18 : Effet de différentes concentrations d'HE de <i>M. spicata</i> sur la croissance et la production de l'aflatoxine B1 par la souche <i>A. flavus</i> LHP ©-D6.....	48
Tableau N° 19 : Sensibilité et la nature de toxicité de l'HE de <i>M. spicata</i> vis à vis de différentes souches fongiques.....	49

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

CHAPITRE I : DES LIQUIDES IONIQUES

I.1. Généralités	06
I.2. Synthèse.....	07
I.3. Propriétés physicochimiques	08
I.3.1. Stabilité thermique et point de fusion	08
I.3.2. Densité et viscosité	08
I.3.3. Solubilité.....	09
I.3.4. Stabilité chimique	09
I.3.5. Toxicité et biodégradabilité.....	09

CHAPITRE II : LES CHAMPIGNONS

II.1. Généralités sur les champignons	12
II.1.1. Description du genre <i>Fusarium</i>	12
II.1.2. Position taxonomique	12
II.1.3. Potentiel toxigène de <i>Fusarium</i>	13
II.1.4. Pouvoir pathogène de <i>Fusarium</i>	13
II.2. Activité antifongique.....	13
II.2.1. Mécanisme d'action.....	14
II.2.2. Différentes familles d'antifongiques.....	14
II.2.2.1. Antifongiques d'origine naturelle	14
II.2.2.2. Antifongiques de synthèse.....	15
II.2.3. Fongicides.....	15

CHAPITRE III: MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.1. Objectif de travail.....	17
III.2. Date et lieu de travail.....	17
III.3. Matériel	17
III.3.1. Matériel biologique	17
III.3.1.1. Matériel fongique	17
III.3.1.2. Matériel végétal	17
III.3.2. Matériel non biologique.....	18
III.4. Méthodes.....	19
III.4.1. Synthèse chimique des LIs.....	20
III.4.1.1. Choix de produits de base.....	21
III.4.1.2. Purification.....	21
III.4.1.3. Equivalence de produits de départ.....	22
III.4.1.4. Réaction de quaternisation du noyau d'imidazole.....	22
III.4.1.5. Caractérisation et dynamique des LIs.....	24
III.4.2. Technique d'extraction d'HE de <i>M. spicata</i>	25
III.4.2.1. Préparation de l'échantillon de <i>M. spicata</i>	25
III.4.2.2. Détermination de rendement en HEs.....	28
III.4.2.3. Conservation de l'HE.....	28
III.4.3. Evaluation de l'activité antifongique	29
III.4.3.1. Protocole d'évaluation de l'activité antifongique des LIs	30
III.4.3.2. Protocole d'évaluation de l'activité antifongique de l'HE de <i>M. spicata</i>	31
III.4.3.3. Evaluation de la croissance mycélienne	32

CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Synthèse chimiques de nos LIs	35
IV.2. Travaux antérieurs.....	36
IV.2.1. Propriétés physicochimiques des LIs.....	36
IV.2.2. Caractérisation des LIs	40
IV.2.3. Extraction de l'HE de <i>M. spicata</i>	41
IV.2.4. Evaluation de l'activité antifongique des LIs	42
IV.2.5. Evaluation de l'activité antifongique d'HE.....	47
Conclusion générale	
Références Bibliographiques	
Annexes	

Introduction générale

Introduction générale

La protection de l'environnement est devenue une des questions majeures du XXI^{ème} siècle (**Jobine, 2009**). Les origines des pollutions sont très variées, Parmi elles nous pouvons citer l'utilisation dans l'industrie chimique des substances volatiles (**Jacquemin, 2006**). La tension est de plus en plus focalisée sur les composés organiques volatils (COV). Ces composés sont néfastes pour l'homme car ils présentent des risques directs sur la santé et en se dégradant dans l'atmosphère, ils perturbent les équilibres chimiques et constituent ainsi les principaux précurseurs de la pollution photochimique de la troposphère en contribuant également à l'effet de serre (**Bouziane, 2009**).

Dans le contexte de la chimie verte et du développement durable, Les chimistes ont découvert une nouvelle classe de solvants, moins polluants et moins volatils : « les liquides ioniques » (**Moutiers et Billard, 2005 ; Chauvin et Olivier-Bourbugou, 1995**).

Les LIs sont considérés comme des solvants respectueux de l'environnement, du fait qu'ils présentent des propriétés physico-chimiques remarquables, dont une grande stabilité thermique et chimique, une pression de vapeur négligeable, une bonne résistance à la flamme, une polarité élevée, et surtout ils sont recyclables (**Reetz et al, 2002**). Ils permettent également une amélioration de la sécurité puisqu'ils sont pour la plupart, quasiment ininflammables, non-explosifs et non-volatils, selon la paire d'ion sélectionnée (**Chatel, 2012**). Le terme « LIs » est couramment utilisé pour les sels ayant un point de fusion au-dessous de 100 °C (**Boumediene, 2012**).

Les imidazoles représentent la première classe d'agents antifongiques synthétiques, généralement leur noyau peut efficacement empêcher la biosynthèse de l'ergostérol empêchant de ce fait la croissance des mycètes (**Boulebd, 2016**). De même, ils représentent la classe de fongicides la plus utilisée dans le domaine de l'agriculture. Très actif contre les champignons pathogènes et non pathogènes (**Reis et al, 2013**), ils sont utilisés comme ingrédients efficaces pour lutter contre les plantes nuisibles, dans le contrôle des microorganismes responsables de l'altération des plantes ou organismes potentiellement dangereux pour l'homme, dans la protection du bois contre les champignons, et aussi dans le stockage de la nourriture (**Zama, 2015**).

Parmi les champignons phytopathogènes, on trouve des champignons telluriques appartenant au genre *Fusarium* présentant une spécificité parasitaire pour une large gamme de plantes hôtes d'intérêt économique et responsables des maladies connues sous le nom de fusarioses (**Ozenda, 1990**). Il existe de nombreuses espèces de *Fusarium*, dont certaines seulement sont pathogènes et/ou sont susceptibles d'émettre des mycotoxines, posant

Introduction générale

problèmes en agriculture ou en médecine humaine et pour l'industrie agroalimentaire. De ce fait, la lutte biologique contre ces moisissures s'avère très importante (**Ghorri, 2015**).

Certains produits naturels d'origine végétale sont devenus des alternatives efficaces aux composés chimiques qui ont plusieurs effets indésirables sur la santé (**Fernnell et al, 2004**). Les plantes aromatiques représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique possédant un très large éventail d'activités biologiques (**Zeghad, 2009**). Parmi ces métabolites secondaires, on retrouve dans une grande mesure les huiles essentielles (**Ferkous, 2016**).

L'une des plantes médicinales et aromatiques les plus utilisées en phytothérapie est *Mentha spicata* « Menthe verte », son HE est caractérisé par une forte activité antifongique contre différents champignons pathogènes (**Mohammed, 2017**). Cette activité est liée par des composants chimiques de *Mentha* qui causent la rupture des membranes fongiques et inhibent le développement des champignons. Les HEs permettent également la protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (**Zambonelli et al, 2004**).

Dans ce contexte s'inscrit l'objectif principal de notre travail qui se focalise à « tester l'effet antifongique d'un nouveau liquide ionique synthétisé sur des champignons pathogènes ».

- Nous nous sommes intéressées à la synthèse chimique de deux LIs à base d'imidazole; en jouant sur la longueur de la chaîne alkyle «1-ethyl imidazolium bromide et 1-butylimidazolium bromide »; afin de mieux comparer leurs influences vis-à-vis les *Fusarium*.
- Outre cela, nous avons ajouté à notre travail l'extraction d'huile essentielle de *M. spicata* pour comparer et enrichir les résultats obtenus.

Le travail présenté dans ce manuscrit est initié par une introduction générale, et il se divise en trois parties :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui comporte deux chapitres principaux:
 - Le premier chapitre ; nous avons commencé par des généralités sur les liquides ioniques, leurs synthèses, leurs propriétés et leurs applications.
 - Le deuxième chapitre ; nous avons rapporté des généralités sur les champignons et évoqué l'étude du genre étudié « *Fusarium* », et une étude bibliographique sur l'activité antifongique.
- La deuxième partie comporte deux chapitres :

Introduction générale

- Chapitre matériels et méthodes ou nous présentons les protocoles expérimentaux avec les différentes étapes de synthèse et de réactions par l'utilisation des réactifs et le matériel nécessaire pour mener bien ce travail.
- Le chapitre des Résultats et discussion est consacré à la présentation des résultats obtenus et donner toute explication par une discussion scientifique qui prouve le travail réalisé et s'impose l'objectif étudié.
- En fin, une conclusion qui clôture ce travail donne une description des résultats trouvés et valide les différentes perspectives à l'utilisation des liquides ioniques comme nouveau milieu en domaine biologiques.

Chapitre –I–

Les liquides ioniques

I.1. Généralités

En 1914, Walden a rapporté la synthèse et la caractérisation du premier LI, le nitrate d'éthylammonium, un sel dont le point de fusion est de 12°C (**Walden, 1914**).

Les LIs sont une nouvelle classe de solvants, uniquement composés d'ions, et faisant partie de la famille des sels fondus. Ces composés se différencient des sels fondus classiques (**Lantelme et Groult, 2013**) par leur température de fusion qui a été définie comme inférieure à 100 °C, La grande majorité est liquide à température ambiante (RTILs) « Room Temperature Ionic Liquids ». Ils sont constitués d'un cation le plus souvent organique, associé à un anion organique ou inorganique (**Wasserscheid et Welton, 2008**).

Les cations rencontrés sont généralement volumineux et dissymétriques. Ils font partie le plus souvent de la famille des ammoniums, imidazolium, pyridinium, pyrrolidinium, sulphonium et phosphonium (Figure n° 01), Les plus étudiés sont les sels d'imidazoliums. Les chaînes R₁, R₂ et R₃ sont le plus souvent des chaînes alkyles. On parle de LI à tâche spécifique ou LI fonctionnalisé. Ce concept a été initialement décrit par Davis et al en 2000 qui les définit comme des LIs possédant un groupe fonctionnel attaché de manière covalente soit à l'anion, soit au cation. On peut trouver des groupements amines, alcools ou éthers, acides carboxyliques ou esters, thiols et allyl, alcynes ou encore nitriles. Des cations chiraux ont également été synthétisés (**Revelli, 2010**).

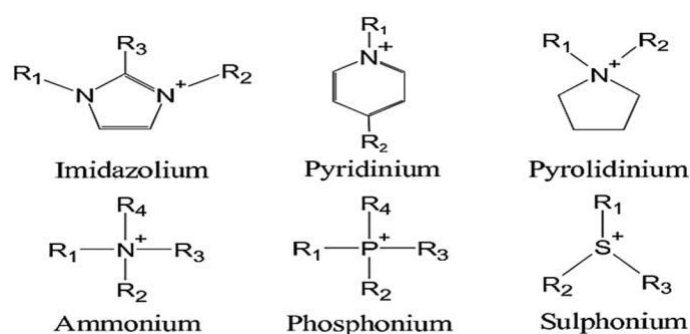


Figure n° 01 : Structures de quelques Cations des LIs

La nature des anions qui composent les LIs (Figure n° 02) peut être divisée en trois groupes:

– Les anions polynucléaires (le plus souvent Cl⁻ /AlCl₃) qui constituent la classe de « première génération ».

- Les anions mononucléaires inorganiques comme les anions halogénures (Cl^- , Br^- ..), l'anion nitrate (NO_3^-), l'anion hexafluorophosphate (PF_6^-) et l'anion tétrafluoroborate (BF_4^-), très utilisés en chimie organique ou organométallique.
- Enfin, plus récemment, les anions mononucléaires organiques tels que l'anion dicyanamide ($\text{N}(\text{CN})_2^-$), les dérivés sulfoniques : trifluoromethanesulfonate (OTf^-) (ou triflate), l'anion bis(trifluorométhylsulfonyl)imide (NTf_2^-) (**Boumediene, 2012**).

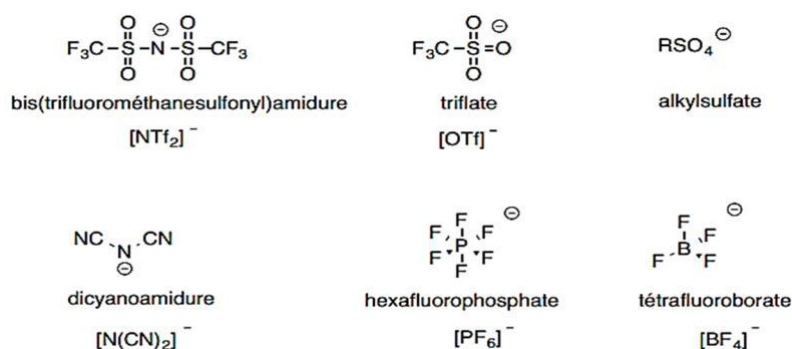


Figure n°2: Structures de quelques anions des LI.

I.2. Synthèse

La première étape (réaction de Menshutkin) est une réaction de quaternisation de l'atome d'azote (de phosphore ou de soufre) par un halogénure d'alkyle. Typiquement cette réaction se fait au reflux de l'agent alkylant pendant plusieurs heures ou plusieurs jours. Cette étape permet d'accéder aux LI de première génération. Le temps et la température de réaction dépend principalement de l'halogénure d'alcane utilisé. La réactivité des halogénures d'alcanes dépend de l'halogène, de la longueur de la chaîne alkyle (généralement la réactivité décroît avec la longueur de la chaîne carbonée) et de l'encombrement stérique de l'hétéroatome à substituer (**Chatel, 2012**). L'utilisation des micro-ondes, permettent de diminuer considérablement ce temps de réaction. Cette quaternisation peut aussi se faire grâce aux ultrasons sans solvant.

Les halogénures sont peu utilisés en tant que tel en chimie organique car LI sont très hygroscopiques. L'halogène a un caractère très coordonnant, et peut induire des réactions parasites. Pour cela, ces sels sont ensuite modifiés lors de la deuxième étape par la métathèse anionique (ou l'échange d'anions) (**Fraga-Dubreuil et al, 2002**).

I.3. Propriétés physicochimiques

Les LIs présentent des propriétés physico-chimiques intéressantes qui font d'eux une classe de solvants très convoitée pour de nombreuses applications. De plus, la possibilité d'ajuster leurs caractéristiques physico-chimiques par variation de la nature de l'anion ou du cation est un atout majeur.

De nombreuses propriétés très intéressantes ont été attribuées aux LIs :

- Une pression de vapeur négligeable, une excellente stabilité chimique et thermique, une conductivité ionique élevée, un pouvoir de solvation élevé: Les LIs utilisent une large gamme d'interactions de solvation telles que les ponts hydrogènes, les interactions π , les interactions dipôle-dipôle, les forces de dispersion de London, Une excellente solubilité dans de nombreuses substances (**Vidal, 2013**).
- A l'exception de toute une famille de LI inflammable appelée énergétique et composée d'ions de nitrate et de picrate, les LIs sont en général non-inflammables.
- Ce sont de bons solvants vis-à-vis d'un grand nombre de composés organiques et inorganiques, permettant d'effectuer des réactions catalytiques en milieu homogène.
- Leur synthèse est généralement peu coûteuse et facile à mettre en œuvre.
- Un simple changement de leur structure, de l'association anion-cation permet de moduler toutes ces propriétés (**Chaker, 2016**).

I.3.1. Stabilité thermique et point de fusion

Le point de fusion est un paramètre essentiel, sa valeur dépendrait à la fois du cation et de l'anion. Les LIs caractérisés par des températures de fusion relativement basses et des températures de décomposition élevées (350 – 400°C), possèdent un très large domaine de température dans lequel ils sont à l'état liquide (de l'ordre de 200 – 300°C) et un domaine de stabilité thermique très grand (**Guezen, 2014**).

I.3.2. Densité et viscosité

Les LIs sont en général denses et visqueux. Ils ont une viscosité qui peut atteindre dix fois celle des solvants organiques ordinaires. La viscosité peut également changer avec la composition moléculaire de l'anion, ainsi elle augmente quasi-linéairement avec la longueur de la chaîne alkyle du cation. La densité est aussi fonction de la nature de l'anion, une fonction décroissante de la longueur de la chaîne alkyle portée par le cation comme par exemple pour l'imidazole est une fonction décroissante de la température (**Aoun, 2010**).

I.3.3. Solubilité

Elle dépende de la nature du solvant (eau ou les solvants organiques). La solubilité des LIs dans l'eau est gouvernée par la nature de l'anion et la longueur de chaîne alkyle fixée sur le cation. Les chaînes alkyles sont hydrophobes, donc une augmentation de celles-ci diminue la solubilité de LIs à anion identique, alors que les anions sont en principe hydrophiles et peuvent former des liaisons hydrogène avec l'eau (**Zhang et al. 2007**). Les solvants organiques polaires comme les alcools à courte chaîne, le dichlorométhane ou l'acétonitrile dissolvent bien les LIs. Cette miscibilité dépend également de la nature du cation et de l'anion formant le LI (**Sajjadi, 2013**).

I.3.4. Stabilité chimique

La plupart sont stables vis à vis des substances organiques et inorganiques. Les LIs de deuxième génération aussi appelés LIs « stables à l'air et à l'eau », sont beaucoup plus faciles à utiliser et à stocker. Néanmoins, certains de ces LIs, notamment ceux associés à des anions de types PF_6^- et BF_4^- , s'hydrolysent partiellement pour former de l'acide fluorhydrique (HF), composé très corrosif et toxique (**Jobin., 2009**). Aggarwal et coll. ont aussi souligné que les LIs de type imidazolium qui portent un proton en position β (entre les deux azotes) se déprotonent en milieu basique pour donner un carbène instable (**Guezen, 2014**).

I.3.5. Toxicité et biodégradabilité

Les LIs sont souvent présentés comme des solvants de la chimie verte. Jusqu'à aujourd'hui la toxicité est mal connue. Des études systématiques, s'intéressant principalement aux LIs à base d'imidazolium, ou ammonium quaternaire ont été entreprises assez récemment (**Ranke et al, 2004**). Ranke et coll démontrent que plus la chaîne alkyle latérale du cation est longue, plus la toxicité du LI est grande. L'introduction d'une chaîne polaire réduit leur toxicité et augmente leur biodégradabilité. En revanche, aucune tendance n'a pu être dégagée quant à l'influence de la nature du cation: imidazolium, pyridinium, ou ammonium quaternaire, même si les cations non-aromatiques paraissent moins toxiques que les cations aromatiques (**Jobin, 2009**).

I.4. Applications

Les LIs étant des solvants organiques non polluants leurs utilisations ont été étendues à un nombre croissant d'applications dans divers domaines (Figure n° 03).

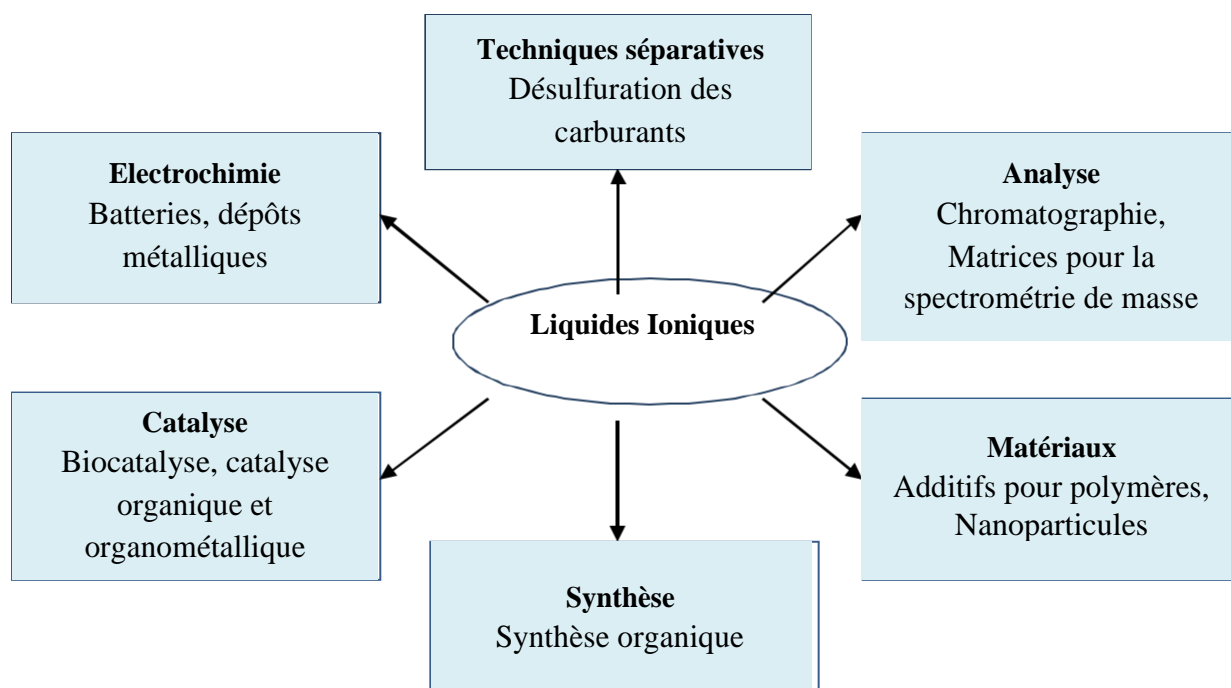


Figure n° 03 : Principaux domaines d'application des LI (Boumediene, 2012).

Chapitre –II–

Les Champignons

II.1. Généralités sur les champignons

Les champignons ou mycètes constituent un règne très important, dont seul un petit nombre de représentants sont pathogènes pour l'Homme. Ce sont des organismes immobiles, ne possédant ni feuilles, ni tiges, ni racines, dépourvus de chlorophylle et hétérotrophes pour le carbone. C'est à dire, qu'ils doivent se nourrir de constituants organiques prélevés sur d'autres organismes par absorption, et non par phagocytose à la différence du règne animal (Brans, 2015).

II.1.1. Description du genre *Fusarium*

Selon Link en 1809 et Booth, 1984, le genre *Fusarium* tire son nom du latin *fuscus* car ses macroconidies sont en forme de fuseau. Il est bien connu pour son rôle important en phytopathologie, présentant une spécificité parasitaire pour une large gamme de plantes hôtes et responsables des maladies connues sous le terme de fusarioses (Messiaen, 1981; Lepoivre, 2003).

Les *Fusarium* sont des moisissures largement répandus sur les végétaux et dans les sols. Ils se trouvent dans la mycoflore normale des produits de base, comme le riz, le haricot, le soja et d'autres cultures (Pitt et al, 1994). Ces genres sont un thalle à croissance généralement rapide. Les conidiophores parfois très ramifiés forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores d'aspects graisseux. Les phialides sont plus ou moins allongées et peuvent produire deux types de conidies:

- Des macroconidies fusiformes, souvent courbées, pluriseptées, avec une cellule basale pédicellée, portant une sorte de talon;
- Des microconidies petites, généralement septées, piriformes, fusiformes ou ovoïdes.

Certaines espèces produisent les deux types de spores, d'autres ne forment que des macroconidies. Les chlamydospores sont présentes ou absentes, terminales ou intercalaires, différenciées par le mycélium ou par les conidies (Botton et al, 1985).

II.2.2. Position taxonomique

La taxinomie ou taxonomie a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons afin de les identifier, les nommer et enfin les classer.

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Ascomycota, à la classe des Sordariomycetes. Il s'agit d'un genre polyphylétique à la taxinomie complexe (Debourgogne, 2013).

Tableau N° 01 : Taxonomie du genre *Fusarium*.

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Sordariomycetes
Sous-classe	Hypocreomycetidae
Ordre	Hypocreales
Famille	Nectriaceae
Genre	<i>Fusarium</i>

II.1.3. Potentiel toxigène de *Fusarium*

Les moisissures du genre *Fusarium* produisent plusieurs types de mycotoxines regroupées sous le terme de fusariotoxines: la zéaralénone, les fumonisines, les trichothécènes, la moniliformine, la beauvéricine, la fusarine C et l'acide fusarique. Les trois premières sont les ; plus étudiées actuellement. Ces toxines contaminent surtout les céréales (Jeunot, 2005).

Les mycotoxines synthétisées par les espèces du genre *Fusarium* leur confèrent un pouvoir pathogène important vis-à-vis des végétaux ou des mammifères dont l'Homme (Ghorri, 2015).

II.1.4. Pouvoir pathogène de *Fusarium*

Les *Fusarium* sont, principalement, des phytopathogènes. Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. Ils sont généralement impliqués dans la pourriture des racines, tiges et fruits ; dans la dégradation du système vasculaire. Le pouvoir pathogène chez L'homme et les animaux sont varié. Certaines espèces sont à l'origine des kératites et endophtalmies. D'autres espèces (*F. solani*, *F. moniliforme*) sont impliquées dans des infections systémiques (Ghorri, 2015).

II.2. Activité antifongique

Un antifongique est une substance capable d'inhiber spécifiquement les différents champignons isolés en mycologie et responsables de mycoses. On distingue les molécules fongicides qui vont détruire le champignon pathogène et les molécules fongistatiques qui vont limiter le développement du mycète, qui sera ensuite éliminé lors du renouvellement

tissulaire. La majorité des antifongiques utilisés sont des fongostatiques (**Chabasse et al, 1999**).

II.2.1. Mécanisme d'action

La membrane fongique est constituée de protéines, de phospholipides et de stérols, dont l'ergostérol est le principal. Certains antifongiques auront pour cible cette membrane (polyènes) ou bien ses constituants (azolés, allylamines). L'ergostérol est important pour la fluidité et l'intégrité membranaire, mais aussi pour les fonctions d'enzyme liées à la membrane, jouant un rôle dans la croissance et la division cellulaire. La chitine synthétase fait partie de ces enzymes (**Granier, 2003**).

Pour qu'un antifongique puisse agir sur la cellule fongique, il doit traverser la paroi du champignon. La plupart des antifongiques agissent sur les stérols de la membrane cytoplasmique du champignon et principalement sur l'ergostérol, qui en est le constituant essentiel, par inhibition des enzymes participant à la synthèse de ce dernier ou par la formation avec l'ergostérol de complexes insolubles, altérant ainsi la perméabilité membranaire. Le réticulum endoplasmique est le siège des inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol. Certains antifongiques vont inhiber la croissance du champignon en agissant sur le métabolisme intracellulaire en bloquant la division cellulaire en métaphase ou en inhibant la chaîne respiratoire dans les mitochondries grâce à des propriétés chélatrices. Des résistances aux antifongiques peuvent survenir. Elles proviennent souvent d'une modification du champignon: existence de biotypes différents; modification de la perméabilité membranaire par un changement de la composition en phospholipides et en stérols ce qui induit une diminution de la pénétration de l'antifongique; modification de la cible par une mutation sur une enzyme du cytochrome P 450 entraînant une diminution de son affinité pour les azolés (**Viguié -Vallante, 2001**).

II.2.2. Différentes familles d'antifongiques

Parmi les antifongiques actuellement utilisés, on dispose de molécules soit d'origine naturelle soit de synthèse.

II.2.2.1. Antifongiques d'origine naturelle

On distingue la griséofulvine qui interfère avec la synthèse des acides nucléiques et également avec la formation des parois des hyphes et les polyènes, qui sont des molécules d'origine naturelle extraites à partir de cultures d'actinomycètes du genre *Streptomyces*. (**Viguié-Vallante, 2001**).

II.2.2.2. Antifongiques de synthèse

Parmi les plus importantes sont les dérivés azolés, qui ont l'avantage d'avoir un large spectre d'activité et sont utilisés dans le traitement des infections locales et systémiques. Ils sont actifs sur l'ensemble des champignons impliqués dans les mycoses superficielles: dermatophytes, levures (genre *Candida* et *Malassezia*) et moisissures. De plus, cette classe pharmacologique renferme de nombreux composés utilisés soit en topique soit par voie générale (**Sibrac-pelayo, 2013**).

II.2.3. Fongicides

Pour limité les pertes dues aux affections parasitaires des végétaux causé les champignons, les traitements chimiques demeurent et nécessaires, à côté des méthodes de lutte génétiques culturales ou biologiques (**Semale, 1989**).

La lutte chimique contre les champignons phytopatogènes consiste à appliquer des biocides appelés fongicides, classiquement définis comme étant des substances chimiques ou biologiques qui tuent ou neutralisent les champignons pathogènes.

Chapitre –III–

Matériel et méthodes

III.1. Objectif de travail

L'objectif de notre travail porte sur deux axes importants :

- La synthèse chimique de deux LIs à base d'imidazole; en jouant sur la longueur de la chaîne alkyle « éthyl et butyl » afin de mieux comparer leurs effets antifongiques vis-à-vis les *Fusarium*.
- Outre cela, nous avons ajouté à notre travail l'extraction d'HE du *M. spicata* pour comparer et enrichir nos résultats obtenus.

III.2. Date et lieu de travail

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau des Laboratoires de recherches « Microbiologie N°01 et Technologie Agro-alimentaire » de Département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun-Tiaret, dans la période s'étalant du 25 février 2020 au 15 mars 2020.

III.3. Matériel

Il comporte tout ce que nous avons utilisé comme matériel soit biologique ou non biologique.

III.3.1. Matériel biologique

Il contient le matériel fongique et végétal.

III.3.1.1. Matériel fongique

Les souches fongiques appartiennent à la collection de Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Université Ahmed Ben Bella, Oran 1. Les informations nécessaires sont indiquées sur le tableau N° 02.

Tableau N° 02 : Souches fongiques utilisées.

Code	Espèce	GenBank Accession n°
WY2	<i>Fusarium solani</i>	MG973089
WY6	<i>Fusarium redolens</i>	MG973092
WY18	<i>Fusarium oxysporum</i>	MG973096
WY19	<i>Fusarium equiseti</i>	MG017437

III.3.1.2. Matériel végétal

La plante choisie dans cette étude ; c'est une plante aromatique vivace, herbacée, indigène et très odorante qui est *Mentha spicata*. Son nom vernaculaire arabe « Naànaa », en français « menthe verte » et en anglais « spearmint ».



Figure n° 04 : Plante de la menthe verte à l'état frais.

A. Classification

La classification botanique établie par (**Cronquist, 1981**) pour cette espèce est la suivante.

Tableau N° 03 : Taxonomie de *M. spicata*.

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Sous famille	Nepetoideae
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha spicata</i>

B. Origine et période de récolte

La plante a été achetée au marché local de Tiaret qu'elle été introduit à l'état frais au mois de février. Parmi les critères de choix de cette espèce : la disponibilité, son importance majeure en médecine et dans l'usage quotidien en cuisine Algérienne d'une part, et le manque de travaux de recherche sur les propriétés biologiques, en particulier le pouvoir antifongique de leur HE d'autre part.

III.3.2. Matériel non biologique

L'ensemble de verrerie, produits et appareils utilisés au cours de cette étude est récapitulé dans le tableau suivant :

Tableau N° 04 : Récapitulatif du matériel utilisé.

Verrerie et instruments	Appareillage dispositif	Produits et milieu de culture
– Bécher	– Balance électronique	– L'eau distillée
– Eprouvette graduée	– Agitateur	– Imidazole
– Entonnoir	– La hotte	– Bromoéthane
– Boîte de Pétri	– Bain marie	– Bromobuthane
– Tube à essai	– Etuve	– Ether diéthylique
– Ampoule à décanter	– Four pasteur	– Acétate d'éthyle
– Flacon stérile	– Bec bunsen	– Acétone
– Ballon à fond rond	– Autoclave	– Milieu PDA
– Spatule	– Evaporateur rotatif	– Le fongicide Flint
– Papier filtre	– Montage d'hydrodistillation de type Clevenger	
– Verre de montre		
– Pipette pasteur		
– Pince stérile		
– Anse de platine		
– Micropipette		
– Embouts		
– Barreau aimanté		

III.4. Méthode

Afin de réaliser cette étude, nous avons utilisé trois méthodes :

1. Synthèse chimique des LIs ;
2. Extraction d'HE de *M. spicata* ;
3. Evaluation de l'effet antifongique.

Les différentes étapes de ce travail sont résumées dans la figure n° 05.

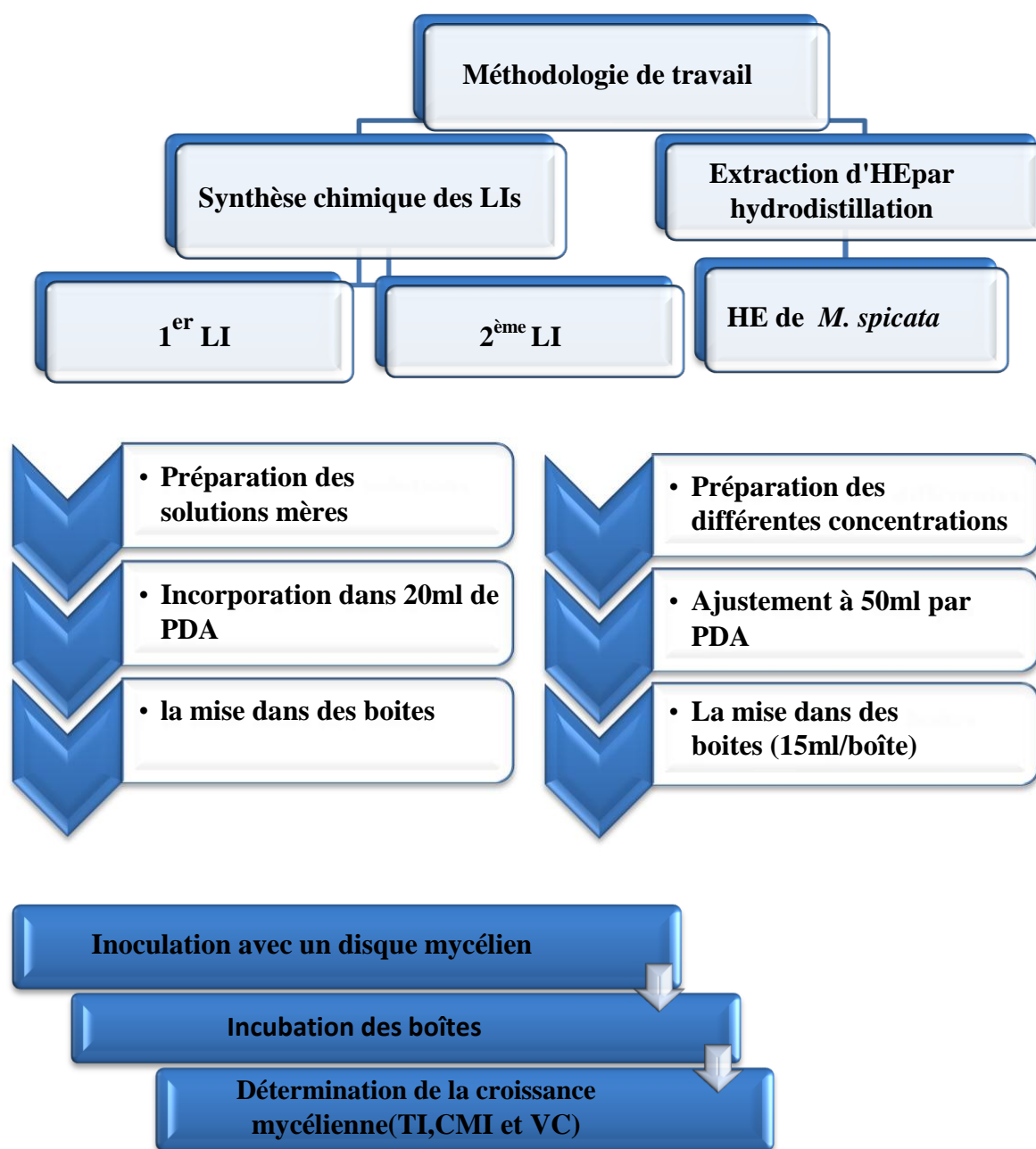


Figure n° 05 : Schéma résumant la méthodologie de notre travail (originale).

III.4.1. Synthèse chimique des LI

Notre stratégie de synthèse a permis d'accéder à des LI de première génération contenant l'anion halogénure (Br^-) en jouant sur la longueur de la chaîne alkyle portée par le cation (imidazolium).

III.4.1.1. Choix de produits de base

Le choix d'un solvant approprié est important pour la réussite d'une synthèse. Au cours de notre expérience, nous avons utilisé l'imidazole comme composé de départ (Figure n° 06) et d'autres produits chimiques (Tableau N° 06).

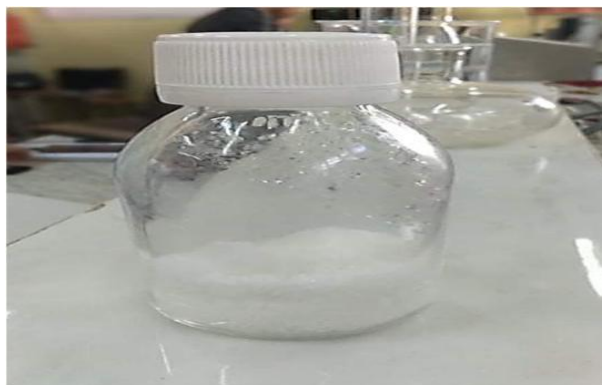


Figure n° 06 : Imidazole.

Tableau N°05 : Les produits chimiques utilisés et leurs formules brutes.

Produit chimique	Formule brute
Imidazole (1,3-diazole), (1,3-diaza-2,4 cyclopentadiène)	$C_3H_4N_2$
Bromoéthane (bromure d'éthyle)	C_2H_5Br
Bromobutane (bromure de butyle)	C_4H_9Br
Ether diéthylique (éther éthylique)	$C_4H_{10}O$
Acétate d'éthyle (éthanoate d'éthyle)	$C_4H_8O_2$
Acétone	C_3H_6O

III.4.1.2. Purification

C'est l'étape la plus importante avant toute synthèse. La présence des impuretés dans un LI va affecter ses performances et ses propriétés physicochimiques. Il faut veiller à

éliminer toutes traces de produits de départ, de solvant, de sous-produits utilisés ou obtenus lors de la synthèse.

Les produits chimiques sont complètement purifiés avant leur synthèse.

- Les BtBr et EtBr sont d'abord lavés avec des portions de H_2SO_4 (acide sulfurique) concentré jusqu'à ce qu'il ne modifie plus la couleur dans la couche acide, puis neutralisés avec une solution de Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et de l'eau, enfin ils sont distillés avant leur utilisation.
- L'imidazole est mis dans une quantité de soude (NaOH).
- Tous les solvants sont distillés avant leur utilisation comme l'AcOEt et l' Et_2O ou chacun est mis avec une quantité de P_2O_5 et distillé.

III.4.1.3. Equivalence de produits de départ

Il est nécessaire de déterminer les volumes d'EtBr et de BtBr avant la synthèse à partir de d'imidazole (Tableau n° 06) pour atteindre aux deux mélanges équimolaires (imidazole « 5g/0.044mol »/EtBr « 3ml/0.44mol » et imidazole « 5g/0.044mol »/BtBr « 5ml/0.44mol ») (Annexe n°03)

III.4.1.4. Réaction de quaternisation du noyau d'imidazole

Nos LIs sont préparés par une réaction de Menshutkin, qui est la quaternisation d'un noyau de l'imidazole afin d'obtenir le cation souhaité par substitution nucléophile de type 2 (SN_2) sur un halogénure d'alcane (BtBr ; EtBr).

Procédé de synthèse

Nous avons procédé à la préparation des LIs selon le mode opératoire suivant :

- 1– La verrerie ordinaire et de mesure utilisée est séchée rapidement avec l'Acet, après lavage à l'eau distillée et étuvée en quelques minutes ;
- 2 –A l'aide d'une balance électronique, peser une quantité d'imidazole de 5g dans un verre de montre (cette opération est répétée deux fois);
- 3–Introduire les quantités pesées dans deux erlenmeyers à l'aide d'une spatule;
- 4–Verser dans le 1er erlenmeyer un volume d'EtBr de 3ml et 5ml de BtBr dans le 2ème erlenmeyer
- 5 – Ajouter 100 ml d'AcOEt pour les deux mélanges et soumettre sous agitation magnétique avec une température ambiante pendant 24h ;
- 6 – Filtrer les produits obtenus « cristallins à température ambiante » avec un papier filtre pour éliminer l'AcOEt et laver avec 60 ml d'Et₂O;
- 7 – Agiter les deux solutions à T.a /1h ;
- 8– Récupérer les produits dans deux ballons de 500 ml et les traces du solvant sont éliminées par évaporateur rotatif pendant 1h à 40°C (Figure n°7)



Figure n° 07 : Elimination du solvant par évaporateur rotatif.

Le temps d'agitation dans chaque étape est nécessaire pour atteindre l'équilibre de mélange.

III.4.1.5. Caractérisation et dynamique des LIs

L'étude de la dynamique et la caractérisation des mouvements moléculaires des ions d'un LI est aussi importante que la structure. Une des difficultés inhérentes à l'étude de la dynamique des LIs est l'existence d'une grande gamme de mouvements moléculaires avec des temps caractéristiques qui s'étendent de la femto-seconde jusqu'à la nanoseconde (**Weingartner, 2008**).

De nombreuses techniques expérimentales ont été utilisées pour étudier la dynamique des LIs, telles que la relaxation diélectrique, la RMN, la résonance de spin électronique, la fluorescence résolue dans le temps (**Weingartner, 2008 ; Kobrak, 2008**).

III.4.2. Technique d'extraction des HEs par hydrodistillation

L'extraction a été effectuée au niveau du laboratoire de protection des végétaux (PV) du « Département de Biologie-Université Ibn Khaldoun », par hydrodistillation (water distillation) dans un appareil de type Clevenger. C'est l'une des plus anciennes méthodes et techniques pour produire des HEs, elle est très facile à mettre en œuvre.

III.4.2.1. Préparation de l'échantillon de *M. spicata*

L'appareil sécréteur des HEs des feuilles de *M. spicata* est externe, comme dans le cas de la majorité des Lamiaceae. Il est localisé sur l'épiderme de la feuille. Il s'agit de trichomes glandulaires capités spécialisés qui accumulent les HEs dans des compartiments de stockage intracellulaire et rejettent à l'extérieur de la surface du végétal au niveau de la cavité subcuticulaire des cellules sécrétrices (Talab-toudent K, 2015).

Après la récolte, les échantillons ont été nettoyés et égouttés puis étalés sur le papier. Le séchage des feuilles est effectué à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Ils sont étendus sans superposition, et retournés de temps en temps afin d'éviter tout risque de fermentation, sous la température ambiante, pendant 10J. Ils ont été mis dans des sacs propres jusqu'au jour de l'extraction (Figure n° 08).



Figure n° 08 : Les feuilles séchées de *M. spicata*.

Principe de la méthode

La méthode consiste à immerger la plante dont on souhaite extraire l'essence végétale directement dans un récipient rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Une fois l'ébullition s'effectue, les cellules éclatent et se libèrent les molécules odorantes. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant par un condenseur froid qui les transforme en liquide. Ce qui résulte l'apparition de deux phases non miscibles : l'une est organique (HE) en surface et l'autre est aqueuse en dessous. L'HE étant plus légère que l'eau, surnage à la surface, elle est récupérée, mesurée et pesée pour déterminer le rendement en fonction de la matière sèche (Bruneton J, 1999 ; Scimeca D, 2007).

Le montage de l'hydrodistillation comprend essentiellement les parties suivantes :

- Chauffe ballon « permet la distribution homogène de la chaleur » ;
- Un ballon en verre de 500 ml : il sert à contenir la matière végétale immergée dans l'eau distillée ;
- Une colonne de condensation de la vapeur « réfrigérant : l'entrée d'eau froide (dans ce cas, on a utilisé un seau d'eau avec la glace) et sortie d'eau chaude » ;
- Un collecteur « béccher ».

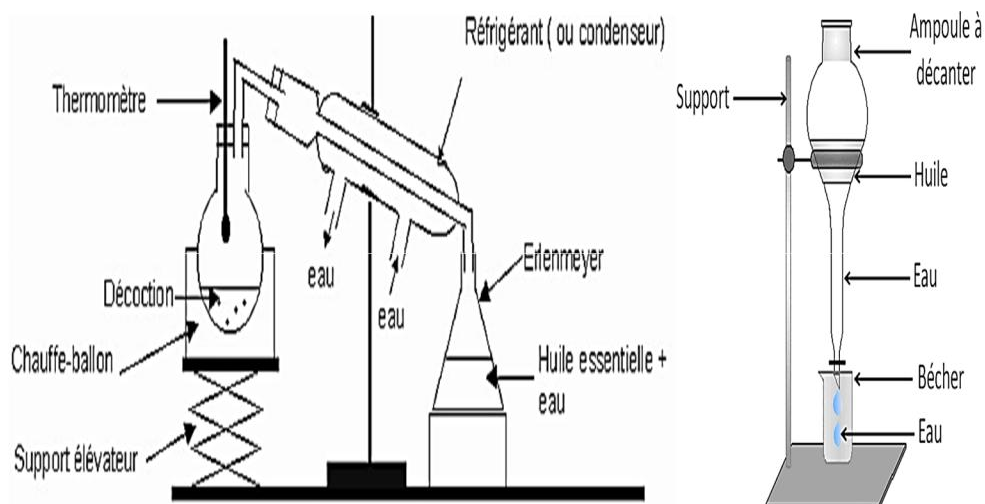


Figure n° 09 : Dispositif de l'extraction d'HE par hydrodistillation.

Mode opératoire

Dans notre travail, l'extraction se fait sans prétraitement de l'hydrodistillation (ni broyage, ni laminage du matériel végétal), l'opération dure trois heures à partir du début d'ébullition.

- a. Chaque échantillon de 40g de feuilles de *M. spicata* séchées a été introduit dans un ballon en verre à fond rond d'une capacité de 500 ml puis submergé avec 250 ml de l'eau distillée ;
- b. À l'aide d'un Chauffe-ballon (source de chaleur), le mélange est porté à une température de 100°C;
- c. Les vapeurs transformées en liquides sont récupérées dans une ampoule à décanter ;
- d. Le distillat obtenu est laissé au repos en quelques min.



Figure n° 10 : Appareillage d'hydrodistillation au niveau de laboratoire.

III.4.2.2. Détermination de rendement en HEs

Le Rdt est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal sèche utilisé en pourcentage (**Afnor, 2000**).Après récupération des huiles essentielles, le Rdt est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = \frac{\text{mh}}{\text{mv}} \times 100$$

Rdt : rendement en huile essentielle en %.

mh : masse d'huiles essentielles récupérées en gramme (g).

mv : masse d'essai du matériel végétal sèche en gramme (g) (**Selvakumar et al, 2012**).

III.4.2.3. Conservation de l'HE

La conservation de l'HE exige certaines précautions indispensables (**Burt, 2004**). C'est pour cela nous avons conservé l'HE du *M. spicata* à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre stérile fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière (en utilisant le papier aluminium).

Caractéristiques organoleptiques d'HE de *M. spicata*

Chaque HE est caractérisée par ces caractères organoleptiques telles que : l'odeur, l'aspect physique et la couleur (**Hameurlaine, 2009**).

A. L'odeur

L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habilité des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parvient à doser les produits naturels et perception peut aller jusqu'à dix millièmes de grammes par litre d'air.

B. La couleur

La couleur de l'huile essentielle peut être déterminée à l'œil nu.

C. L'aspect physique

L'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent ; cette essence peut apparaître sous forme solide, liquide ou semi-solide.

III.4.3. Evaluation de l'activité antifongique

Dans cette étude invitro, on a tenté de comparer l'influence des deux LIs et d'HE de *M. spicata* sur la croissance mycélienne des souches fongiques.

- **Repiquage et revivification des souches fongiques**

Cette étape est nécessaire car l'activité biologique des souches fongiques « *F. solani*, *F. redolens*, *F. oxysporum*, *F. equiseti* » est nulle à l'état conservé (congélation), la revivification a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure.

Pour chaque souche fongique, deux repiquages successifs ont été effectués afin de purifier et de revivifier les souches.

Le procédé est comme suite :

- 1- Dans une zone stérile, couler les boîtes de Pétri par le milieu de culture PDA et laisser refroidir ;



Figure n° 11 : Coulage des boîtes de Pétri par le milieu de culture PDA.

2- On prélève aseptiquement à l'aide d'une pipette Pasteur stérile un disque de colonie pour chaque souche. Puis, on le dispose avec une anse de platine stérile au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA préalablement préparé (Annexe n° 01). Enfin les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser sur la paillasse ;



Figure n° 12: Prélèvement et inoculation des colonies.

3 - Les boîtes ont été incubées dans l'étuve à une température de 28°C pendant 7J.

III.4.3.1. Protocol d'évaluation de l'activité antifongique des LIs

1. Dans un premier temps, nous avons préparé des solutions mères comme suit : 0,05ml d'un liquide ionique est dissoute dans 1ml de l'eau distillée pour atteindre une concentration de 5.10^4 ppm ;

2. Ensuite des volumes de 20µl, 40µl, 80µl, 160µl de la solution mère sont incorporés dans des tubes à essai préalablement stériles contenant 20ml du milieu PDA pour obtenir les concentrations finales de 50 ; 100 ; 200 et 400 ppm respectivement et agiter pendant 5min ;

- Chaque concentration est répétée trois fois et comparée avec son propre témoin négatif (-) et son témoin positif (+).

3. Couler le mélange dans des boîtes de Pétri, en triplicate (3 boîtes) ;

4. Un disque mycélien de 5mm de diamètre issu de la marge d'une culture âgée de 7J (les souches fongiques repiquées précédemment), a été prélevé dans des conditions stériles et déposé au centre de chaque boîte en raison de 1 disque par boîte ;

5. Incubation à 30°C pendant 24/48/72h.

- Les témoins négatifs (-) sont réalisés dans les mêmes conditions sans LIs « seulement PDA».
 - Les témoins positifs(+) « on solubilise 0,05g du fongicide Flint (Annexe n° 02) dans 1ml de l'eau distillée » sont réalisés dans les mêmes conditions.
- Ces opérations sont répétées pour le 2^{ème} LI dans les mêmes conditions.

III.4.3.2. Protocole d'évaluation de l'activité antifongique d'HE de *M. spicata*

Pour la réalisation de l'activité antifongique de l'HE de *M. spicata* on a adopté la méthode de contact direct.

Protocole expérimental

1- Pour préparer les différentes concentrations, on prélève des quantités d'HE du *M. Spicata* de 25, 125 et 250 µl et ajuster à 50 ml par PDA puis on agite pendant 5 min afin d'homogénéiser le milieu de PDA avec l'HE. Ces valeurs sont correspondes à 0.05%, 0.25% et 0.5% respectivement (Tableau N° 06).

Tableau N° 06 : Valeurs des dilutions utilisées.

Rapport de dilution (HE /PDA)	0	1/2000	1/400	1/200
µl HE/50mlPDA	0	25	125	250
Concentrations d'HE(%)	0	0.05	0.25	0.5

2- Après la dispersion de l'HE dans le milieu de culture, 15ml de ce mélange est versé dans des boîtes de Pétri puis laissé jusqu'au refroidissement sur la pailleasse ;

3- On prélève à partir de la marge d'une culture âgée de 7J (les souches fongiques repiquées précédemment), un disque mycélien de 5mm et ensuite a été inoculé au centre de chaque boîte (1disque/boîte) ;

4- Les boîtes sont incubées à l'étuve 144h /20°C, cette période a été retenue car il correspond à la date à laquelle le témoin rempli très nettement la boîte de Pétri.

– Chaque essai est répété trois fois, et comparé avec son propre témoin négatif (-) qu'il est réalisé dans les mêmes conditions sans HE « seulement PDA».

III.4.3.3. Evaluation de la croissance mycélienne

Dans le but d'estimer l'évolution de la croissance mycélienne qui est effectuée quotidiennement par la mesure du diamètre de la colonie mycélienne du champignon.

Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec celles des témoins, qui sont démarrés dans les mêmes conditions et le même jour du test. La croissance mycélienne est estimée lorsque le témoin a envahi la boîte de Pétri.

Toute pousse même légère de chaque champignon sera considérée comme action négative c'est-à-dire que les LIs et l'HE en question n'sont pas inhibiteurs vis-à-vis de la croissance fongique.

- **Détermination de TI**

D'après (**Doumbouya et al, 2012**) les taux d'inhibition de la croissance par rapport au témoin, sont ensuite calculés selon la formule suivante :

$$TI(\%) = \frac{D_c - D_0}{D_c} \times 100$$

TI(%) = Taux d'inhibition de la croissance du mycélium exprimé en pourcentage (%).

D_C : Diamètre de la colonie fongique du témoin (en mm).

D_0 : Diamètre de colonies fongique en présence de LIs ou HE (en mm).

- **Détermination de la CMI**

La CMI correspond à la plus faible concentration en LIs ou HE pour laquelle on n'observe pas de pousse visible à l'œil nu sur le milieu solide (**Ouraini et al, 2005**).

Elle mesure donc, un effet fongistatique et ne renseigne pas sur l'état de la population du champignon, ne permettant notamment pas de préciser si elle a été tuée en partie ou totalement ou si elle a seulement cessé se multiplier.

Les boîtes de Pétri dont les concentrations ayant montré une absence totale de la croissance mycélienne ; ont été sélectionnées pour déterminer les CMI.

- **Détermination de la VC**

Selon (**Cahagnier et Molard, 1998**), la vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule :

$$VC = [D1/Te 1] + [(D2-D1)/Te 2] + [(D3-D2)/Te 3] + \dots + [(Dn-Dn-1)/Te n]$$

D: diamètre de la zone de croissance du chaque jour.

Te: temps d'incubation (jour).

Chapitre –IV–

Résultats et Discussion

IV.1. Synthèse chimique de nos LIs

Après la synthèse chimique, nous avons obtenus deux LIs à base du cation souhaité « IM⁺ » et d'anion « Br⁻ » par la quaternisation du noyau d'azote de l'imidazole (Figure n° 13) et la modification de la longueur de la chaîne alkyle (éthyl et butyl).

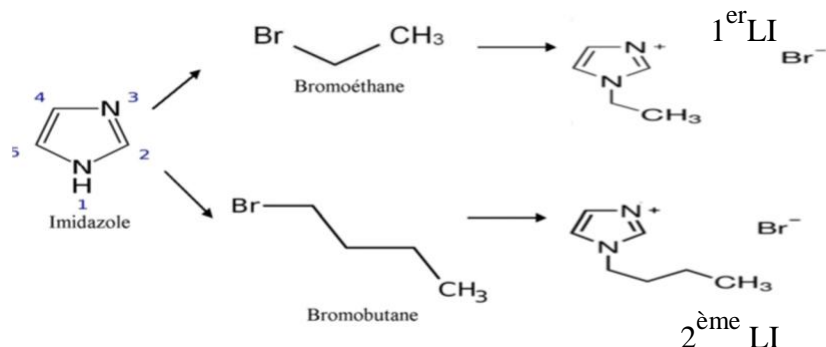


Figure n° 13 : Schéma général de l'étape de quaternisation.

Les caractéristiques de ces LIs synthétisés sont détaillées dans le tableau N° 07.

Tableau N° 07: Caractéristiques des LIs obtenus.

Nomenclature	Formule brute	Acronyme	Aspect
1-ethyl imidazolium bromide	C ₅ H ₉ BrN ₂	[EIM][Br]	Liquides visqueux
1-butyl imidazolium bromide	C ₇ H ₁₃ BrN ₂	[BIM][Br]	jaunes claires

IM: imidazolium, E: éthyl, B:butyl, Br: bromide.

• Propriétés physicochimiques de nos LIs

Les deux LIs « [BIM][Br] et [EIM][Br] » ont un certain nombre de propriétés physicochimiques remarquables, ils sont :

- Stables à T.a ; car ils se composent d'un cation d'imidazolium qui est chimiquement plus stable.
- Visqueux ; cette viscosité augmente lorsque la longueur des chaînes alkyles portées par le cation augmente. Donc : [BIM][Br] plus visqueux que [EIM][Br].

– Solubles dans l'eau ; grâce à leurs caractères hydrophiles qui sont déterminés principalement par la nature de l'anion, ces LIs constitués d'ions halogénures (Br^-) qui sont miscibles à l'eau en toute proportion. Aussi sont partiellement miscibles dans l'acétone.

● **Evaluation de l'activité antifongique de nos LIs et d'HE de *M. spicata***

L'objectif recherché est de tester et comparer l'effet antifongique de trois produits obtenus « [EIM][Br], [BIM][Br] et l'HE de *M. spicata* ». Après les repiquages successives des souches fongiques « *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. equisiti*, *F. solani* », nous avons observé la croissance mycélienne dans toutes les boîtes de Pétri (Figure n° 14).



Figure n° 14 : Aspect macroscopique des souches fongiques obtenues après 5J de repiquage

L'utilisation de l'eau comme milieu réactionnel pour la préparation des solutions mères ($5 \cdot 10^4$ ppm) à fin d'évaluer l'activité antifongique des [EIM][Br], [BIM][Br] semble un excellent choix; car nos LIs ont un caractère hydrophile qui vont être très soluble dans l'eau, et d'autre part les avantages sont nombreux. D'abord, il s'agit d'un composé abondant, non-toxique, non-corrosif et ininflammable, qualités qui le rendent plus sécuritaire que les solvants organiques traditionnels. De plus, l'eau possède une pression de vapeur très élevée en comparaison à ses homologues organiques, ce qui aide à prévenir efficacement les fuites.

IV.2. Travaux antérieurs

On nous basant sur des travaux antérieurs qui englobent l'ensemble des sous titres cités ci-dessous. Concernant l'activité antifongique des LIs, on a pris en considération seulement les LIs à base de dérivés d'imidazolium et autres testés sur quelques souches fongiques pour atteindre aux résultats proches à propos l'intitulé et l'objectif de notre travail.

IV.2.1. Propriétés physicochimiques des LIs

Les interactions cations-anions induisent des variations des propriétés physico-chimiques bien sélectives permet de distinguer les LIs des sels fondus ordinaires. (Torresi et al, 2017).

A. Point de fusion

Les LIs sont caractérisés par des T_{fus} basses et des $T_{\text{déc}}$ très élevées (350°C-400°C). Le tableau n° 09 présente les valeurs de T_{fus} obtenues pour des LIs à base imidazolium. Les paramètres qui influencent le point de fusion des LIs sont : la distribution de charge sur les ions, la possibilité de liaison hydrogène, la symétrie des ions et les interactions van-der Waals (Katrizky et al, 2002).

Tableau N° 08: Température de fusion de quelques LIs (Tokuda et al, 2005 ; Ngo et al, 2000).

LI	T_{fus} (°C)
1-methyl-3-methylimidazolium NTf2	26
1-butyl -3-methylimidazolium NTf2	-3
1-ethyl -3-methylimidazolium PF6	62
1-propyl -3-methylimidazolium PF6	40

B. Densité

La densité des LIs à T.a est en général plus grande que celle de l'eau. La densité augmente en augmentant la longueur de la chaîne alkyle dans le cation IM (Neidermeyer et al, 2012), et aussi elle est contrôlée par la nature de l'anion et augmente linéairement lorsque la température diminue (Dzyuba et al, 2002). Le tableau n° 10 indique les valeurs de densité de quelques LIs.

Tableau N°09: Valeurs de la densité de quelques LIs à T=25°C.

LI	d (g/ml)
[Bmim] [PF6]	1.373(30°C)
[Bmim] [CF3CO2]	1.209(25°C)
[Emim] [NTf2]	1.52 (25°C)
[Hmim] [NTf2]	1.37

C. Viscosité

La viscosité η des LIs dépendent de leurs interactions inter ioniques, la liaison d'hydrogène et les interactions de van der Waals qui provoquent l'augmentation de la viscosité à cause de l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle (**L. Wu et al, 2013**).

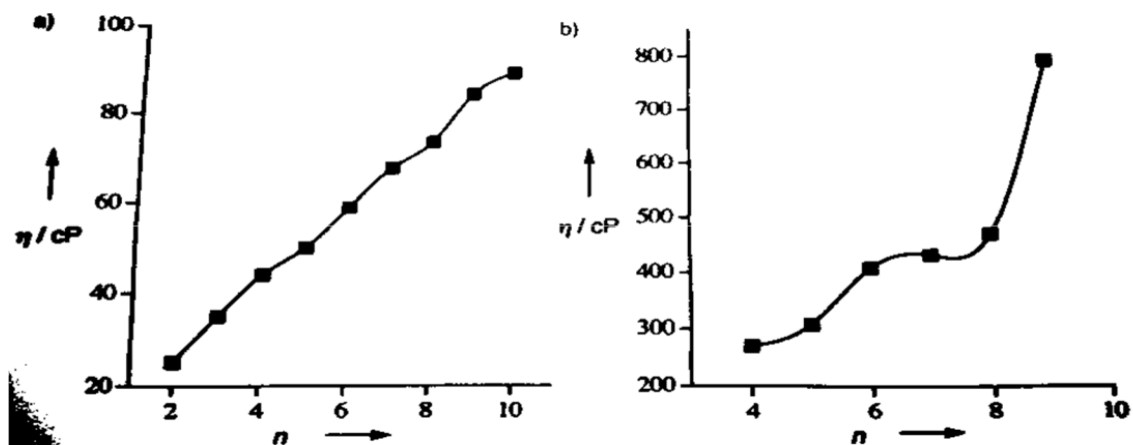


Figure n° 15 : L'influence de la chaîne alkyle sur la viscosité de a) C_nmimTF₂N et b) C_nmimPF₆ à 35°C.

Par conséquent, η des LIs varie considérablement avec la composition, T et la structure chimique. Elle semble être liée au choix de l'anion. Ainsi pour un même cation la viscosité évolue dans le sens :



D. Stabilité thermique

La température maximale de fonctionnement de ces sels est déterminée par la T_{déc} (**Niedermeyer et al, 2012**). Généralement, les cations d'IM ont des T_{déc} supérieures à celles des cations ammonium, permettant leur utilisation à des températures supérieures à 250°C et dans certains cas supérieures à 400°C (**Bonhote, 1996**). La stabilité thermique pour un LI constitué d'un cation IM dépend essentiellement de la structure de l'anion. Ainsi, les anions engendrant les plus faibles interactions intermoléculaires induisent les T_{déc} les plus élevées, avec l'ordre :

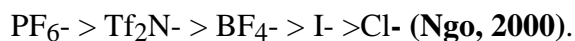


Tableau N° 10 : Les valeurs de la température de décomposition de certains LIs.

LI	T _{déc} (°C)
[Emim] [Cl]	285 (sec)
[Emim] [BF ₄]	391
[Emim] [TF ₂ N]	417/ 455 (sec)
[Emim] [TF ₂ N]	254 (sec)
[Bmim] [Cl]	403 (sec) 400/
[Bmim] [TF ₂ N]	439 (sec)

Sec : LI séché sous vide

E. Solubilité

Les LIs possèdent un grand pouvoir solvatant qui leur permet de solubiliser la majorité des composés organiques ou inorganiques (**Yang, 2017**).

- **Solubilité dans l'eau**

Les LIs à base d'IM sont généralement hygroscopiques mais ils peuvent être totalement miscibles avec l'eau (LIs hydrophiles), soit partiellement miscibles et forment un système biphasé (LIs hydrophobes). Ce comportement est principalement gouverné par la nature de l'anion qui forme des liaisons hydrogènes avec l'eau.

Selon une étude utilisant l'anion Bis (trifluoromethylsulfonyl) amide et variant le cation a montré que la solubilité des LIs dans l'eau diminue dans l'ordre (**Pandey et al, 2017**):

Imidazolium>pyrrolidinium>puridinium>piperidinium

- **Solubilité dans les solvants organiques**

Les LIs sont entièrement ou partiellement miscibles avec des solvants organiques polaires tels que méthanol, acétone, tétrahydrofurane, dichlorométhane, acétonitrile, mais non miscibles avec les solvants non polaires ou de basse polarité, y compris les éthers et les alcanes.

F. Conductivité

Les LIs présentent une grande conductivité ionique généralement de l'ordre de (10^{-1} S.m⁻¹), qui est liée à la variation de la taille des anions et les cations ; lorsque la σ augmente la taille de l'anion augmente par contre elle diminue par l'augmentation de la taille de cation.

Une nouvelle étude a permis de constater que parmi les 500 LIs en trouvent 8 LIs de bonne conductivité ionique (Les valeurs de la conductivité des trois premiers LIs sont prédites).

Tableau N° 11 : Les valeurs des LIs qui ont une bonne conductivité ionique.

LI	σ (S/m)
1-methyl-4-amino-1,2,4-triazolium azide	1,482
1-ethyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphate	1,26
1-ethyl-3-methylimidazolium nitrate	1,459
1-ethyl-3-methylimidazolium dicyanoamide	2,7
1-ethyl-3-methylimidazolium hydrofluoride	12

IV.2.2.Extraction de l'HE de *M. spicata*

L'extraction de l'HE des feuilles séchées de *M. spicata* par l'hydrodistillation permet d'obtenir un liquide limpide, jaune claire qui se caractérise par une forte odeur (agréable). Et le rendement a été calculé dans le tableau N° 12 (Aoun, 2019).

Tableau N° 12: Rendements calculés pour l'HE de *M. spicata*.

Quantité de la biomasse (g)	Quantité d'HE de <i>M. spicata</i> (g)	Rdt (%)
293,7	2,8	0,93

- **Composition chimique d'HE de *M. spicata***

La composition chimique de l'HE de *M. spicata* obtenus par **Roldan et al**, montre que le carvone est le composé majoritaire (61.53 %) suivis par limonène (12.58%) tandis que β -Myrcène (4.71 %) et le Germarene D (4 .23 %), les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n° 13:

Tableau N° 13 : La composition chimique de l'HE de *M. spicata* (Roldan et al, 2010).

Composés	(%)	Composés	(%)
α -Pinène	0.86	Linalol	0.41
Camphre	0.16	Bornéol	0.39
Sabinène	0.52	Transdihydrocarvone	0.92
β -pinène	0.91	Dihydrocarvone	0.64
β -Myrcène	4.71	Transcarvéol	0.46
3-Octanol	0.19	Carvone	61.53
Limonène	12.58	Isopulegol acétate	0.19
1,8 Cinéole	3.37	β -Bourbonéne	1.05
β -Transocimiène	2.1	β -Caryophellène	1.68
β -Cis ocimène	0.48	(Z)- β -Farnésène	0.29
β -Cubene	0.51	Germarene D	4.23
Eliméne	0.48	Calaménène	0.19

IV.2.3. Evaluation de l'activité antifongique des LIs

a). **Demberelnyamba et al (2004)**. D'écrit l'activité antifongique de neuf LIs de l'imidazolium et pyrrolidinonium « 3 séries » contre *C. albicans* qui a été choisi comme représentant champignons, et les valeurs de CMI ($\mu\text{g/ml}$) de chaque composé après 1J d'exposition sont indiquées dans le tableau N° 14.

Tableau N° 14 : La CMI des sels d'imidazolium et de pyrrolidinonium.

Composants	substituent	Anion	CMI (µg/mL)
	R1		<i>C.albicans</i>
Séries(A)			
1-methyl-3-octylimidazolium bromide (1a)	C ₈ H ₁₇	Br	250
1-methyl-3-decylimidazolium chloride (1b)	C ₁₀ H ₂₁	Cl	250
1-methyl-3-dodecylimidazolium bromide (1c)	C ₁₂ H ₂₅	Br	32
11-methyl-3-tetradecylimidazolium chlorides (d)	C ₁₄ H ₂₉	Cl	8
1-methyl-3-tetradecylimidazolium bromide (1 ^e)	C ₁₄ H ₂₉	Br	8
1-methyl-3-hexadecylimidazolium bromide (1f)	C ₁₆ H ₃₃	Br	8
Séries (B)			
1-hydroxyethyl-2-methyl-3-tetradecylimidazolium chloride (2a)	C ₁₄ H ₂₉	Cl	64
1-hexadecyl-3-hydroxyethyl-2-methylimidazolium chloride (2b)	C ₁₆ H ₃₃	Cl	8
Série(C)			
N-dodecyl-Nhydroxyethylpyrrolidinonium chloride (3b)	C ₁₂ H ₂₅	Cl	

- Les Sels d'imidazolium des séries A et B à longue chaîne alkyle avaient une très bonne activité antifongique contre *C. albicans* (Annexe 06).

b). Cornellas et al (2011). Ont Synthétisé deux séries de LIs à base d'imidazolium et de pyridinium à longue chaîne « Séries 1: 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide (C_nmimBr), Séries 2 : 1-alkylpyridinium bromide (C_nPyrBr) », pour étudier l'effet de la longueur de la chaîne alkyle et la nature de cation sur l'activité antifongique

Parmi les microorganismes étudiés : *C. albicans* et les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau n° 15.

Tableau N° 15: Valeurs de CMI de 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ($C_n\text{mimBr}$) et 1-alkylpyridinium bromide ($C_n\text{PyrBr}$).

	CMI (μM)			
$C_n\text{mimBr}$				
$C_n\text{PyrBr}$	C8	C10	C12	C14
<i>C.albicans</i>	R	R	R	178
	R	R	R	395

R : Micro-organisme résistant à la concentration la plus élevée (256 mg/L).

Le plus court homologue de chaque séries testées $C_8\text{mimBr}$ et $C_8\text{pyrBr}$ ont montré une faible activité (CMI >256 mg/l) contre *C. albicans*. Seulement le LI avec une longue chaîne alkyle à 14 atomes de carbone $C_{14}\text{mimBr}$ et $C_{14}\text{pyrBr}$ ont une activité antifongique contre *C. albicans* (Annexe 07).

Contrairement à l'effet de la longueur de la chaîne alkyle sur l'efficacité et tant qu'agents antimicrobiens, il convient de noter que la nature du groupe hydrophile « imidazolium » ou cation « pyridinium », n'a pas des effets significatifs sur leur activité biologique.

c). Luczak et al (2010). Ont étudié la relation structure-activité « SAR = Structure-activity Relationship » et évalué l'activité antifongique de 30 composés, ces variétés des LIs à base imidazolium sont présentées dans le tableau N° 16.

Tableau N° 16 : Abréviation et nom de tous les ions.

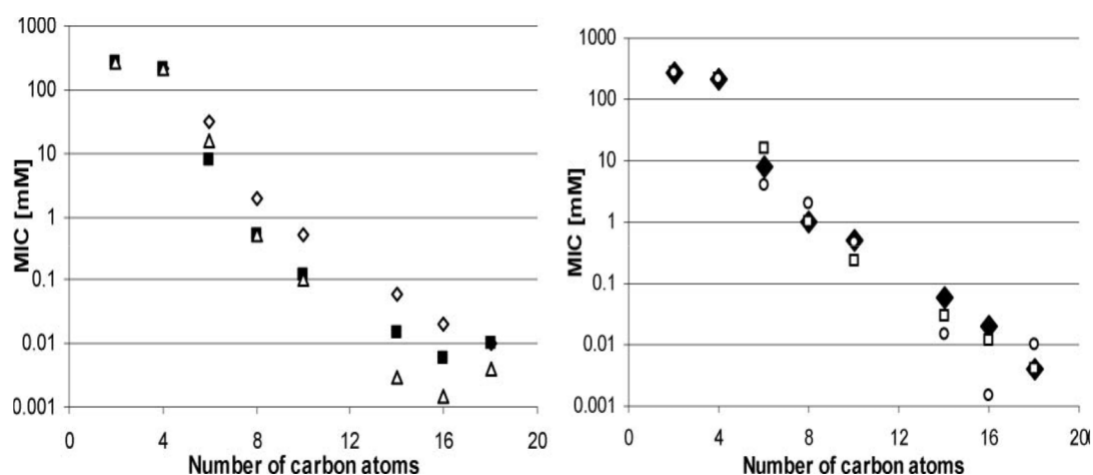
Cation	Anion
[EMIM] 1-ethyl-3-methylimidazolium	[Cl] Chloride
[BMIM] 1-butyl-3-methylimidazolium	[BF ₄] Tetrafluoroborate
[HMIM] 1-hexyl-3-methylimidazolium	[MeOSO ₃] Methyl sulfate
[OMIM] 1-methyl-3-octylimidazolium	[OctOSO ₃] Octyl sulfate
[DMIM] 1-decyl-3-methylimidazolium	[Tf ₂ N] Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide
[TDMIM] 1-methyl-3-tetradecylimidazolium	[TFMS] Trifluoromethanesulfonate
[HDMIM] 1-hexadecyl-3-methylimidazolium	[pTs] p-Toluenesulfonate
[ODMIM] 1-methyl-3-octadecylimidazolium	1-Methyl-3 octadecylimidazolium

- Les moyens de CMI de quelques souches fongiques sont présentés dans le tableau N°17.

Tableau N° 17 : Activités antifongiques des LIs d'imidazolium mesurées en CMI [mM].

LI	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Candida glabrata</i> DSM 11226	<i>Candida tropicalis</i> KKP 334	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
[BIM]	11	14.7	14.7	14.6	14.6
[EMIM][Cl]	>26.8	261.8	261.8	261.8	261.8
[BMIM][Cl]	207.5	20.7.5	207.5	207.5	207.5
[HMIM][Cl]	31.2	7.8	15.6	15.6	4
[OMIM][Cl]	2	0.5	2	0.5	2
[DMIM][Cl]	0.5	0.2	0.5	0.1	0.5
[TDMIM][Cl]	0.06	0.03	0.2	0.003	0.015
[HDMIM][Cl]	0.02	0.02	0.12	0.0015	0.0015
[ODMIM][Cl]	0.01	0.01	0.004	0.004	0.01
[EMIM][BF ₄]	49.3	61.95	124	45.9	7.7
[BMIM][BF ₄]	62.5	31.25	62.5	15.63	15.36
[HMIM][BF ₄]	31.4	15.7	31.4	7.8	7.8
[OMIM][BF ₄]	4.3	4.3	4.3	4.3	1.6
[DMIM][BF ₄]	2.1	2.1	2.1	3.2	1.6
[EMIM][MeOSO ₃]	>267.5	>267.5	>267.5	>267.5	267.5
[BMIM][MeOSO ₃]	92	>92	>92	62.5	62.5
[BMIM][Tf ₂ N]	>2	>2	>2	>2	>2
[BMIM][TFMS]	250	62.5	125	125	62.5
[OMIM][TFMS]	11.4	15.2	11.4	15.1	15.1
[EMIM][OctOSO ₃]	60.2	30	45.25	29.7	22.3
[BMIM][OctOSO ₃]	62.5	62.5	31.25	15.7	15.7
[OMIM][OctOSO ₃]	1	1	1	0.5	1
[BMIM][pTs]	62.5	125	125	62.5	62.5

- Les valeurs CMI présentes étaient liés au nombre d'atomes de carbone des LIs (Figure n° 18).



(◇) *C. albicans*, (△) *G. candidum*, (■) *S. cerevisiae* ATCC9763, (□) *S. cerevisiae* JG, (◆) *C. glabrata*, (○) *R. mucilaginosa*.

Figure n° 18 : Relation entre les activités antifongiques des 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride et la longueur de la chaîne alkyle du cation imidazolium.

-Les résultats démontrent qu'une augmentation de la chaîne alkyle entraîne une diminution des CMI, ce qui signifie que l'allongement du substituant alkyle augmente fortement l'activité antifongique des LIs, l'activité la plus élevée été observée pour des longues chaînes alkyles avec 16 ou 18 atomes de carbone. Dans les chaînes latérales alkyles très longues l'efficacité biologique ne peut plus être augmentée. Ce phénomène a été mentionné comme un « effet de coupure = cut-off effect ».

-Les sels d'imidazolium à chaîne courte EMIM BMIM avec anion chloride présentent une faible activité, l'échange de l'halogénure par d'autres anions a entraîné une augmentation de cette activités pour ces cation. Par exemple BMIM et différents anions sont présentés dans la figure n°19.

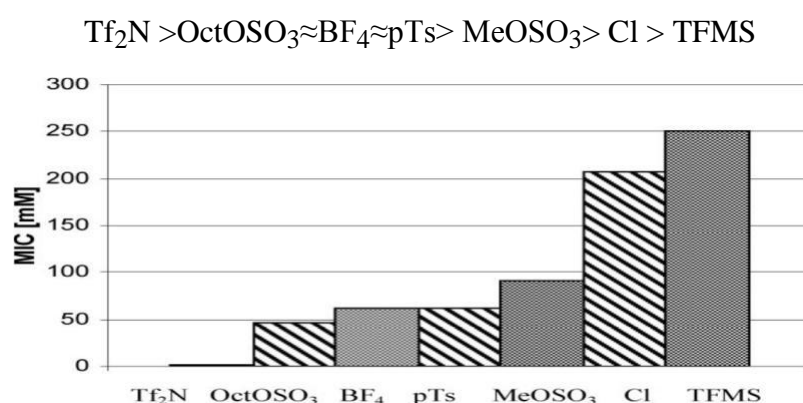


Figure n° 19 : Activités antifongiques des composés cationiques BMIM et divers types d'anions déterminés pour *C. albicans*.

-Le large éventail d'anions utilisés sans l'enquête a révélé que la structure cationique et le type d'anion ont des effets sur l'activité biologique (Annexe 08).

d). D'après **Feder-Kubis et Tomczuk (2013)**. Ils ont fait une observation de la sensibilité des microorganismes aux chlorures avec un substituant (1R, 2S, 5R)-(-)-menthoxyméthyl.

Composé 1a : [(1R,2S,5R)-(-)-Menthoxyméthyl] diméthylundécylammoniumchloride dérivé d'ammonium ;

Composé 2a : 3-Decyl-1-[(1R, 2S, 5R)-(-)-menthoxyméthyl]imidazolium chloride dérivé d'alkylimidazolium ;

Composé 3a : 1-[(1R, 2S, 5R)-(-)-Menthoxyméthyl]-3-nonyloxyméthylimidazolium chloride dérivé d'alkoxyméthylimidazolium ;

Composé 4a : 1-[(1R, 2S, 5R)-(-)-Menthoxyméthyl]-4-diméthylaminopyridinium chloride dérivé de pyridinium.

Les chlorures 1a, 2a et 3a peuvent être considérés comme hautement actifs contre les champignons testés (Figure n° 20), alors que le composé 4a restait inactif contre *C. albicans* et *R. rubra* (Annexe 09).

Les chlorures d'alkylimidazolium et d'alkoxyméthylimidazolium présentent également des activités plus élevées que celles du chlorure de benzalkonium.

Les résultats suggèrent un énorme effet de la structure cationique sur l'activité biologique.

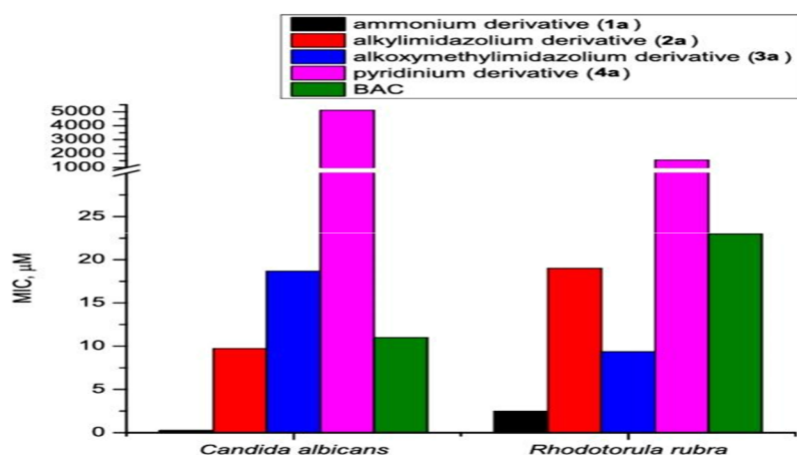


Figure n° 20 : Les valeurs de CMI de champignons.

IV.2.5. Evaluation de l'activité antifongique d'HE

Kadia et al (2010). Ont évalué l'effet de l'HE de *M. spicata* sur la croissance et la production d'aflatoxine B1(AFB1) par la souche *Aspergillus flavus* (Tableau n° 18) et

étudié l'effet de cette huile sur la teneur en ergostérol dans la membrane plasmique de cette souche.

Tableau N° 18 : Effet de différentes concentrations d'HE de *M. spicata* sur la croissance et la production de l'aflatoxine B1 par la souche *A. flavus* LHP ©-D6.

Concentration ($\mu\text{l ml}^{-1}$)	Diamètre de colonie (Cm)	% inhibition mycélienne	Contenu de AFB1 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	% inhibition de contenu AFB1
CNT	5.96 ± 0.06^a	–	2096.0 ± 36.10^a	–
0.1	5.42 ± 0.03^b	9.06	1901.4 ± 32.01^b	9.28
0.2	4.86 ± 0.03^c	18.46	1752.5 ± 28.20^c	16.39
0.3	4.02 ± 0.08^d	32.55	1612.0 ± 35.97^d	23.09
0.4	3.32 ± 0.07^e	44.30	1459.3 ± 20.55^e	30.38
0.5	2.12 ± 0.21^f	64.43	1184.1 ± 42.43^f	43.51
0.6	2.00 ± 0.14^f	66.44	1044.4 ± 29.44^g	50.17
0.7	1.80 ± 0.06^f	69.80	642.38 ± 29.14^h	69.35
0.8	1.37 ± 0.02^g	77.01	214.68 ± 21.86^i	89.76
0.9	0.90 ± 0.03^h	84.90	0.00 ± 0.00^j	100
1.0	0.00 ± 0.00^i	100	0.00 ± 0.00^j	100

CNT, Control

L'HE de *M. spicata* provoque une inhibition de 100% de la croissance mycélienne à 1 $\mu\text{l/ml}$, et l'inhibition complète de l'AFB1 par l'huile a été enregistrée à 0.9 $\mu\text{l ml}^{-1}$.

L'effet de l'HE de *M.spicata* sur la teneur en ergostérol (à 282nm) dans la membrane plasmique d'*A. flavus* est illustrée à la figure n° 21.

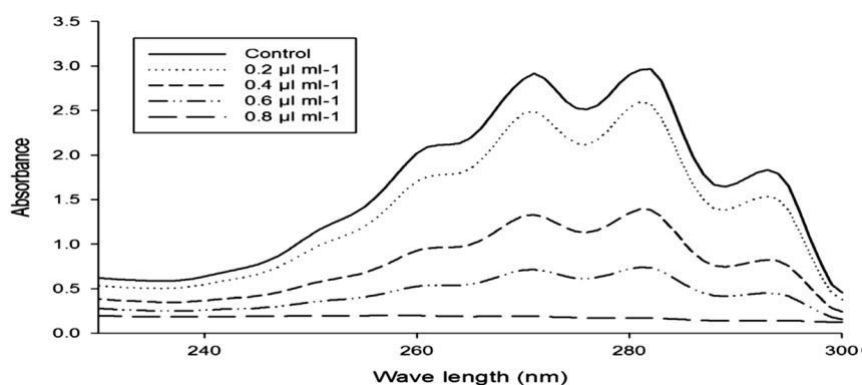


Figure n° 21 : Effet de différente concentration d'HE de *M. spicata* sur la teneur en ergostérol dans membrane plasmique d'*A. flavus*.

Le présent résultat a révélé que l'huile de *M. spicata* peut induire une altération de la biosynthèse de l'ergostérol par *A. flavus* et diminution subséquente de la biomasse avec l'augmentation des concentrations d'HE.

Kedia et al (2014). Ont également étudié l'activité antifongique de l'HE de *M. spicata* contre 19 moisissures biodégradables (Tableau n° 19).

Sauf pour *A. luchuensis* et *A. terreus*, l'huile a provoqué 100% d'inhibition de la croissance de tous les champignons (Annexe 10).

Tableau N° 19 : Sensibilité et la nature de toxicité de l'HE de *M. spicata* vis à vis de différentes souches fongiques.

Espèce fongique	% d'inhibition	Nature de toxicité
<i>Absidia ramosa</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Alternaria alternata</i>	100 ± 0.00	Fongicide
<i>Aspergillus fumigatus</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Aspergillus glaucus</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Aspergillus luchuensis</i>	91.72_ 0.36	_
<i>Aspergillus niger</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Aspergillus terreus</i>	75.67 _ 0.74	_
<i>Aspergillus unguis</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Cladosporium cladosporioide</i>	100 ± 0.00	Fongicide
<i>Curvularia lunata</i>	100 ± 0.00	Fongicide
<i>Fusarium oxysporum</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Mucor sp</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Mycelia sterilia</i>	100 ± 0.00	Fongicide
<i>Penicillium citrinum</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Penicillium italicum</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Penicillium luteum</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Penicillium purpurogenum</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Rhizopus stolonifer</i>	100 ± 0.00	Fongistatique
<i>Spondylocladium australe</i>	100 ± 0.00	Fongistatique

Conclusion générale

Conclusion générale

Les agents pathogènes fongiques sont un problème de santé majeur causant plus de 1,6 millions de décès par an, ils provoquent aussi de nombreuses maladies chez les végétaux et de la détérioration des aliments. Les antifongiques, les pesticides et les désinfectants commerciaux ne sont pas suffisants, ils ne sont assez actifs contre certaines souches fongiques. Dans le but de développer de nouveaux composés hautement actifs d'origine végétale et chimique, respectueux de l'environnement ; des études sur de nouveaux agents antifongiques ont été un domaine de recherche actif.

Le travail présenté dans ce mémoire est basé sur la synthèse de nouveaux LIs à base d'imidazolium en changeant la chaîne alkyle (ethyl/butyl) porté par le cation, et tester leurs efficacités vis-à-vis quatre souches appartenant au genre *Fusarium*.

- Comme une première étape, nous avons synthétisé deux LIs par la quaternisation de l'atome d'azote de l'imidazole, cette étape permet d'accéder aux LIs de première génération. Notre expérience s'est terminée avec succès et par la formation de « [BIM][Br] et [EIM][Br] » qui ont le même aspect (liquide jaune clair visqueux).
- Outre cela, nous avons ajouté l'extraction d'huile essentielle par hydrodistillation des feuilles séchées de la menthe verte « *Mentha spicata* » pour mieux comparer leur effet avec les résultats obtenus.

Les propriétés physicochimiques des LIs sont modifiées par variation des combinaisons anion/cation et ils sont souvent considérés comme solvants modifiables.

Pour l'évaluation de l'effet antifongique des LIs et d'HE de *M. spicata* on nous basant sur des travaux antérieurs.

D'après les résultats de « **Cornellas, Demberelnyamba, Łuczak, Feder - Kubis; et al** », il est évident que les propriétés antifongique des LIs dépendent de certains paramètres, principalement de l'élongation de la chaîne alkyle. On conclut que :

- Les LIs à chaînes alkyle courts généralement ne sont pas actifs contre les champignons.
- Les LIs à longue chaîne latérale présentent un effet élevé contre toutes les souches fongiques testées, l'augmentation de cette chaîne entraîne une diminution des CMI, ce qui signifie que l'allongement du substituant alkyle augmente fortement l'activité antifongique des LIs.
- La dépendance entre l'augmentation de l'activité biologique ne tiennent plus vrai pour les chaînes latérales alkyles très longues, à une certaine longueur de chaîne, l'efficacité biologique ne peut plus être augmentée « effet de coupure = cut-off effect ». Pour ce

Conclusion générale

phénomène de coupure plusieurs explications ont été postulées sur la base soit d'une solubilité insuffisante, soit d'une perturbation ou aspect cinétique.

– La pluparts des études analysant l'activité antifongique des LIs ont étudié l'effet du cation qui est variable selon sa nature, tandis que la connaissance de l'effet de l'anion est limitée. Cependant il faut noter que l'influence des anions était relativement faible.

L'activité antifongique des HEs peut être due à la présence des terpènes qui causent la rupture des membranes fongiques et inhibent le développement des champignons. L'HE de *M. spicata* dont le principe composé est la carvone (61,53%) qui est bien connue pour son activité antifongique. D'après **kedja, et al.** L'HE de *M. spicata* ; a été testé comme pesticide d'origine végétale. Il est montré que :

– Une efficacité contre les moisissures biodégradables, cette huile provoque une inhibition de 100% de la croissance des champignons et la nature de leur effet est marquée comme fongicide ou fongistatique (*Fusarium oxysporum*).

– Une bonne activité antifongique sur la croissance et la production d'aflatoxine B1 ; le présent résultat a révélé que l'huile de *M. spicata* peut induire une altération de la biosynthèse de l'ergostérol de *A. flavus* et une diminution subséquente de la biomasse avec l'augmentation de concentration d'HE. L'inhibition de la production d'AFB1 peut être due à l'inhibition du catabolisme des glucides chez *A. flavus* par une action sur certaines enzymes.

Les LIs et l'HE de *M. spicata* sont des biocides efficaces, actuellement considérés comme un atout prometteur pour lutter contre les infections fongiques. Le mécanisme d'action exact des sels d'imidazolium reste encore inconnu à ce jour, toutefois, il a été suggéré que les sels d'imidazolium agissent comme des détergents, du fait de leur caractère amphiphile et de la dépendance de l'activité biologique envers l'élongation de la chaîne carbonée. En générale, les LIs caractérisés par leurs potentiels en "chimie verte", principalement dû à leurs faibles tensions de vapeur et la bioactivité d'HE est influencée par leur composition chimique, qui peut varier selon les parties de la plante, les saisons, les méthodes d'extraction, les conditions écologiques et le moment de l'extraction.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Afnor. (2000).** Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse monographies relatives aux huiles essentielles (tome 2).
- Aoun, B. (2010).** Liquides ioniques : structure et dynamique. Thèse de Doctorat, Université d'Orléans, France. p29.
- Aoun, B. (2019).** Activité fongicide des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba*, *Ocimum basilicum* et *Mentha spicata* sur les Champignons phytopathogènes du pois et de la fève. Université Mohamed Khider, Biskra, Algérie.
- Bonhote, P., Dias, A. P., Papageorgiou, N., KalyanaSundaram, K., Gratzel, M. (1996).** Hydrophobic, Highly conductive ambient temperature molten salts. *Inorganic Chemistry*,35(5), 1168-1178
- Botton, R., Breton, A., Fevre, M., Guy, P H., Larpent, J.P., Veau P. (1985).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Biotechnologies. Masson, p139 à 145.
- Boulebd, H. (2016).** Synthèse, Caractérisation et évaluation biologique de nouveaux dérivés poly-hétérocycliques à base d'imidazole. Thèse de doctorat, Université de Frères Mentrouri-Constantine. Algérie. p 39 41 44.
- Boumediene, H. (2012).** Nouveaux liquides ioniques Bis-Pipéridinium: Synthèse, Etude des propriétés thermiques et relaxation diélectrique. Thèse de doctorat, Université Djilali Liabes, Sidi Bel Abbès, Algérie
- Bouziane, M. (2009).** Biodégradation du méthanol en réacteur batch et étude de l'influence des paramètres physico-chimique sur la cinétique. Mémoire de Magister en chimie physique analytique, Université de Frères Mentrouri-Constantine. Algérie.
- Brans, A. (2015).** Les mycoses superficielles : Pharmacologie des anti-fongiques. Thèse de doctorat, Université de Lille 2.
- Bruneton, J. (1999).** pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales (3^{ème} Ed), technique
- Burt, S. (2004).** Essential oils : their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *International journal of food microbiology*, (94), 223-253

Références Bibliographiques

- Cahagnier, B., Melcion, D., Bakan, B., Richard Molard, D. (1998).** Influence of temperature on fumonisin B1 production on maize grain by *Fusarium proliferatum*. Sciences des Aliments (France)
- Chabasse, D, Guiguen, C I., Contet-Audonneau , N. (1999).** Mycologie médicale. Les abrégés. Paris, Masson. 320p.
- Chaker, Y. (2016).** Synthèse et caractérisation de nouveaux liquides ioniques et de poly(liquides ioniques) à base d'imidazolium. Thèse de doctorat , Université Oran, Algérie.
- Chatel, G. (2012).** Liquides ioniques et ultrasons pour l'époxydation d'oléfines : combinaison synergique plus éco-compatible. Thèse de doctorat, Université de Grenoble. France.
- Chauvin, Y., Olivier-Bourbigou, H. (1995).** Nonaqueous ionic liquids as reaction solvents. *Chemtech*, 25(9), 26-30.
- Cornellas, A., Perez, L., Comelles, F., Ribosa, I., Manresa, A., Garcia, M. T. (2011).** Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution. *Journal of colloid and interface science*, 335 (1), 164-171.
- Cronquist, A., 1981.** An intergrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Nueva York. 1262 pp.
- Debourgogne, A. (2013).** Typage moléculaire du complexe d'espèces *Fusarium solani* et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France.
- Demberelnyamba, D., Kim, K. S., Choi, S., Park, S. Y., Lee, H., Kim, C. J., & Yoo, I. D. (2004).** Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(5), 853-857.
- Dharaskar, S. A., Varma, M. N., Shende, D. Z., Yoo, C. K., Wasewar, K. L. (2013).** Synthesis, characterization and application of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride as green material for extractive desulfurization of liquid fuel. *The Scientific World Journal*.
- Doumbouya, M., Abo., K., Lepengue A, N., Camara, B., Kanko, K., Aidara, D., Kone, D. (2012).** Activités comparées invitro de deux fongicides de synthèse et deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraichères en Cote d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 50,3520-3532.

Références Bibliographiques

- Dzyuba, S.V., Bartsch, R. A. (2002).** Influence of structural variations in 1-alkyl (aralkyl)-3-methylimidazol hexafluorophosphate and Bis (trifluoromethylsulfonyl) imide on physical properties of the ionic liquids, *ChemPhysChem*, 3(2), 161-166
- Feder-Kubis, J., Tomczuk, K. (2013).** The effect of the cationic structures of chiral ionic liquids on their antimicrobial activities. *Tetrahedron*, 69(21), 4190-4198.
- Ferkous, I. (2016).** Les huiles essentielles et l'aromathérapie. Cas de la menthe poivrée (*Mentha x piperita*).
- Fernell C.W., Lindsey K.L., McGaw L.J., et al. (2004).** Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacology screening and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*. 94:205-217.
- Fraga-Dubreuil, J., Famelart, M. H., Bazureau, J. P. (2002).** Ecofriendly Fast Synthesis of Hydrophilic Poly (ethyleneglycol)-Ionic Liquid Matrices for Liquid-Phase Organic Synthesis. *Organic process research & development*, 6 (4), 374–378.
- Ghorri, S. (2015).** Isolement des microorganismes possédant une activité anti- *Fusarium*. Thèse de doctorat, Université de frères Mentouri, Constantine.
- Granier F. (2003).** Antifongiques : classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. *Antibiotiques (Paris)*, 5(1), 39–48.
- Guezzen, B. (2014).** Les liquides ioniques et le D2EHPA/TBP dans l'exaction liquide – liquide de Zn (II), Cd (II) & Hg (II). Thèse de doctorat, Université de Tlemcen.
- Hameurlaine, S., (2009).** Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhantherium adpressum* de la région de Ghardaia. Université de Kasdi Merbah-Ouragla.
- Jacquemin, J. (2006).** Etude thermodynamique de liquides ioniques non Aqueux. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, France.
- Jeunot, B. (2005).** Les Fusariotoxines sur céréales : détection, risque et nouvelle réglementation, pharmacie, Thèse de doctorat, UHP-Universié Henri Poincaré- Nancy 1, p30.
- Jobin, É. (2009).** Extraction d'actinides et de lanthanides par des liquides ioniques fonctionnalisés ou non. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.

Références Bibliographiques

Katrizky, A. R., Jain, R., Lomaka, A., Petrukhin. R., Karelson, M, Visser, A. E., Rogers, R. D. (2002). Correlation of the melting points of potential ionic liquids (imidazolium bromides and benzimidazolium bromides) using the CODESSA program. *Journal of chemical information and computer sciences*, 42(2), 225-231.

Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., Chanotiya, C. S., Dubey, N. K. (2014). Antifungal, antiaflatoxic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 89, p 29-36

Kobrak, M. N (2008). The chemical environment of ionic liquids/ links between liquid structure, dynamics, and solvation. *Advanced in Chemical Physics* 139, 85 - 137

Kunle, O., Okogun, J., Egamana, E., Emojevwe, E., Shok, M. (2003). Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*, 10(1), 59-61.

Lantelme, F., Groult, H. (2013). Molten Salts Chemistry: From Lab to Applications. Newnes.

Lepoivre, D. (2003). Phytopathologie : bases moléculaires de biologiques des pathosystèmes et fondement des stratégies de lutte. De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux (Eds).

Łuczak, J., Jungnickel, C., Lacka, I., Stolte, Hupka, J. (2010). Antimicrobial and surface activity of 1-alkyl-3-methylimidazolium derivatives. *Green Chemistry*, 12(4), 593-601.

Mohammed, L.M., Salah, T. F.M., Qader, K. O. (2017). Chemical composition and antifungal activity of *Mentha spicata* L. plant from Sulaimaniyah in Iraq. *Kurdistan Journal of Applied Research*, 2(1), 52-56.

Messiaen C, M. (1981). Les variétés résistantes. Méthodes de lutte contre les maladies et ennemies des plantes. Edition INRA. Paris. 374p.

Moutiers, G., Billard I. (2005). Liquides ioniques : des solvants pour l'industrie, Techniques de l'Ingénieur. Sciences fondamentales, (AF6712).

Ngo, H. L., Lecompte, K., Hargens, L., McEwen, A. B. (2000). Thermal properties of imidazolium ionic liquids, *Thermochem Acta*, 357, 97-102.

Références Bibliographiques

- Niedermeyer, H., J. P., Villar Garcia, I. I., Hunt, P. A., welton, T. (2012).** Mixtures of ionic liquids. *Chemical Society Reviews*, 41(23), 7780-7802.
- Ouacel, K., Omar, Z. (2018).** Synthèse et caractérisation des liquides ioniques à base d'imidazolium. Chimie organique. Tiaret, Alger
- Ouraini, D., Agoumi, A., Alaoui, M. I., Alaoui, K., Cherrah, Y., Benlemlih, M., Belabbas, M.A. (2005).** Approche thérapeutique des dermatophyties par les huiles essentielles de plantes aromatiques marocaines. *Phytothérapie*, (1), 3-12.
- Ozenda, P. (1990).** Les organismes végétaux, tome I : Végétaux inférieurs, Masson, p.220.
- Pandey, A., Ekka, M. K., Rajan, S., Maiti, S., Sachidanandan, C. (2017).** Teratogenic, cardiotoxic and hepatotoxic properties of related ionic liquids reveal the biological importance of anionic components, *RSC Advances*, 7(37), 22927-22935.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B. F., Wheeler, K. A., & Tanboon-Ek, P. (1994).** The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 23(1), 35-53.
- Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., Bottin-Weber, U., Poczobutt, J., Hoffmann, J., & Jastorff, B. (2004).** Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths
- Reetz, M. T., Wiesenhöfer, W., Francio, G., leitner, W. (2002).** Biocatalysis in ionic liquids : batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase, *chemical communications*, (9), 992-993.
- Reis, D. C., Despaigne, A. A. R., Silva, J. G. D., Silva, N. F., Vilela, C. F., Mendes, I. C., Takahashi, J. A., Beraldo, H. (2013).** Structural studies and investigation on the activity of imidazole-derived thiosemicarbazones and hydrazones against crop-related fungi. *Molecules* 18(10), 12645-12662.
- Revelli, A. L. (2010).** Etude thermodynamique des Liquides Ioniques : Applications à la protection de l'Environnement. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine.

Références Bibliographiques

Roldan, L. P., Diaz, G. J., Durringer, J. M. (2010). Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(4), 451-461.

in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicology and environmental safety*, 58(3), 396-404.

Sajjadi, S. M. H. (2013). Étude des extractions de composés organiques à l'aide de liquides ioniques et nanoparticules d'oxydes de métaux. Thèse de doctorat, Université de Lorraine et l'école Doctorale de chimie et physique moléculaire.

Scimeca, D. (2006). Les plantes du bonheur. Ed Alpen, 2006, p. 12-17.

Semal, J. (1989). Traité de pathologie végétal -Les presses agronomiques de Gembloux .A.S.B.L, Belgique, 621p.

Sibrac-pelayo, C. (2013). Les antifongiques azolés: utiles et efficaces mais non dénués de danger : adaptation de la thérapie antifongique chez une patiente atteinte d'histoplasmose Thèse de doctorat, Université Toulouse III Paul Sabatier.

Selvakumar, P., Edhaya, N. B., Prakash, D. S. (2012). studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and eucalyptus globules, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S715-S719.

Taleb-Toudert, K. (2015). Extraction et caractérisation des huiles essentielles des dix plantes aromatique provenant de la région de kabyle (Nord Algérien): évaluation de leurs effets sur la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). Thèse de doctorat, Université Mouloud mammeri, Tizi Ouzou.

Tokuda, H., Hayamizu, K., Ishii, K., M. A. B. H., Watanabe, M. (2005). Physicochemical properties and structures of room temperature ionic liquids.2. Variation of alkyl chain length in imidazolium cation. *The journal of Physical Chemistry B*, 109(19), 6103-6110.J.

Torresi, R. M., Corréa, c. M., Benedetti, T. M., Martins, V. L. (2017). Tailoring transport properties aiming for versatile ionic liquids and poly (ionic liquids) for Electrochromic and gaz capture applications. In *Polymerized ionic liquid* (pp.342- 380).

Vidal, M. (2013). Développement de nouveaux sels Binol-imidazoliums : de la catalyse asymétrique aux applications biologiques, Thèse de doctorat, Université de Montréal.

Références Bibliographiques

- Viguié-Vallante, C. (2001).** Traitements antifongiques en dermatologie. Encyclopédie Médico-chirurgicale. Dermatologie, 98-906.A-10. Paris, Elsevier SAS. 16.
- Walden, PI. (1914).** A propos de la taille moléculaire et de la conductivité électronique de certains sels fondus. Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Petersbourg. 8 (6), 405-422.
- Wasserscheid , P., Welton, T. (2008).** Ionic Liquids in Synthesis; John Wiley & Sons.
- Weingartner, H. (2008).** Understanding ionic liquids at the molecular level: facts, problems, and controversies. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(4), 654-670.
- Wu, L., Lee, S. H., Endo, T. (2013).** Effect of dimethyl sulfoxide on ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate pretreatment of eucalyptus Wood for enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, 140, 90-96
- Yang, H., Liu, Y., Ning, H., Lei, J., Hu, G. (2017).** Synthesis structure and properties of imidazolium based energetic ionic liquid. *RSC Advances*, 7(53), 33231-33240.
- Zama, S. (2015).** Les Dérivés Poly-Hétérocycliques : les Halogénoimidazoles et Benzimidazole-Hétérocycles : Synthèse, Réactivité et Evaluation Biologique. Thèse de Doctorat, Université des frères Mentouri Constantine, Algérie.
- Zambonelli, A., D'Aulerio, A. Z., Severi, A., Benvenuti, S., Maggi, L., & Bianchi, A. (2004).** Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. *Journal of Essential Oil Research*, 16(1), 69-74.
- Zeghad, N. (2009).** Etude de contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Thèse de doctorat. Université de frères Mentouri, Constantine. Algérie.
- Zhang, M., Xu, X., Zhang, M. (2008).** Hydrothermal synthesis of sheaf-like CuO via ionic liquids. *Materials Letters*, 62 (3), 385-388.

Annexes

ANNEXE - 01-

Milieu de culture (PDA)

Le milieu de culture PDA (Figure a) (Potato Dextrose Agar) est favorable pour la croissance des champignons phytopathogènes.

A. Constituants :

- 200g de pomme de terre ;
- 15g de dextrose ou de sucre blanc de cannes ;
- 20g d'agar-agar, gélose ou de gélatine ;
- 1litre d'eau distillée.

B. Préparation :

1. Dissoudre 20g d'agar-agar dans 300ml d'eau distillée, homogénéiser la solution.
2. Peser 200g de pomme de terre (lavée et bien découpé), et mélanger cette quantité avec 300ml d'eau distillée, bouillir à 100°C pendant 20 à 25 min, ensuite recueillir l'eau de la pomme de terre environ 300ml.
3. Le 300ml de l'eau venant de la pomme de terre est mélangé à 300ml de la solution agar-agar.
4. Ajuster ensuite le volume du mélange au moyen de l'eau distillée jusqu'à 1000ml.
5. Autoclaver le mélange à la température de 125°C, la pression de 1,4 bar pendant 15min.
6. Laisser refroidi. Dans une zone stérile, couler la solution obtenue sur des flacons stériles.



Figure a: Milieu de culture PDA.

ANNEXE – 02 -

Fongicide « Flint »

La lutte chimique contre les champignons phytopathogènes consiste à appliquer des biocides appelés fongicides, classiquement définis comme étant des substances chimiques ou biologiques qui tuent ou neutralisent les champignons pathogènes.

A. Définition

Flint est un fongicide (Figure b) pour grandes cultures, arboriculture, viticulture, petits fruits, légumes et plantes ornementales. Qui agit en gênant la respiration des champignons pathogènes des plantes. Il est un puissant inhibiteur de la germination des spores et de la croissance mycélienne.



Figure b : Le fongicide Flint.

B. Informations sur le produit

- Homologation: W 5994 ;
- Formulation: Granulé dispersible dans l'eau (WG) ;
- Matière active: 50 % Trifloxystrobine ;
- Groupe de résistance FRAC: 11 ;
- Coformulant à déclarer: Sodium dibutylnaphthalenesulphonate (CAS 25417-20-3).

C. Mode d'action

Fongicide à large spectre à base de Trifloxystrobine. Grâce à ses propriétés mésostémiques, Flint forme à la surface des végétaux un dépôt fongicide persistant qui résiste au lessivage. La fixation du produit dans la couche cireuse de la cuticule et sa diffusion par voie gazeuse dans les tissus et parties végétales adjacents assurent au Flint un effet fongique de haut niveau.

ANNEXE – 03-

Tableau N° a : Détermination des valeurs nécessaires de produits de départ.

	Les lois	Les données	Les calculs et les valeurs
$n(\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2)$	$n = \frac{m}{M}$	M=112,17g/mol m =5g	$n = \frac{5\text{g}}{112,17\frac{\text{g}}{\text{mol}}}$ n =0,044 mol
V ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Br}$)	$\rho = \frac{m}{V}$	$\rho=1,47\text{g/cm}^3$ M=108,97g/mol	$V = \frac{0,044 \text{ mol} \times 108,97\text{g/mol}}{1,47\text{g/cm}^3}$ V = 3,26 ml \approx 3ml
V ($\text{C}_4\text{H}_9\text{Br}$)	$V = \frac{n \times M}{\rho}$	$\rho=1,27\text{g/cm}^3$ M=137,018g/mol	$V = \frac{0,044 \text{ mol} \times 137,018\text{g/mol}}{1,27\text{g/cm}^3}$ V = 4,74 ml \approx 5ml

ANNEXE – 04-

Procédé de synthèse des liquides ioniques

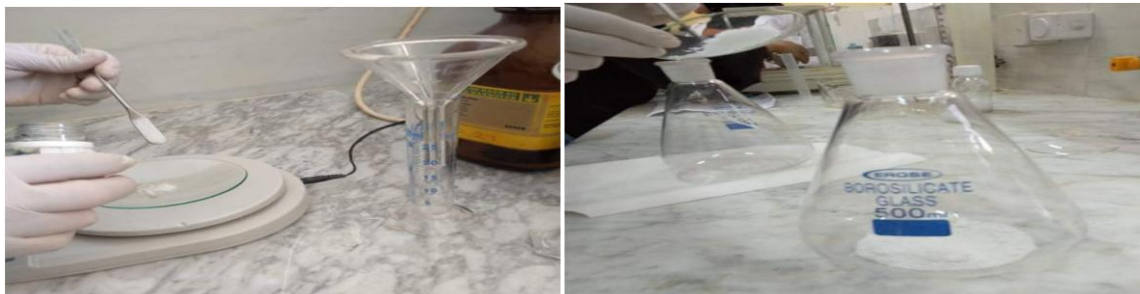


Figure c : Pesage de quantité d'imidazole et la mise dans des erlenmeyers.



Figure d : Versement des volumes d'EtBr et de BtBr.

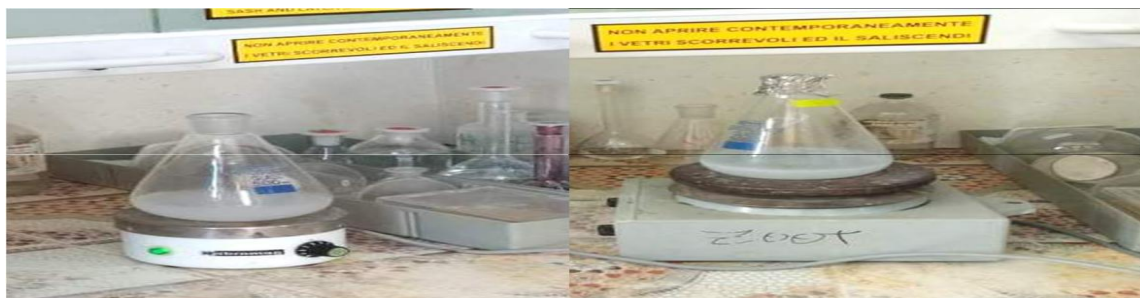


Figure e : Ajout d'AcOEt et Agitation des mélanges.



Figure f : Filtration et l'ajout d'Et₂O/ Agitation des mélanges.

ANNEXE – 05-

Caractérisation des LI

Comme un exemple de caractérisation des LI, on a choisi la caractérisation de [BMIM][BF₄] par la technique de RMN(Dharaskar et al, 2013).

- **Résultats de l'analyse RMN du ¹H de [BMIM][BF₄]**

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): σ (ppm) 8.857 (2, 1H, t), 7.417 (3, 1H, t), 7.257 (3, 1H, t), 4.191 (6, 2H, t), 1.864 (7, 2H, m), 1.358 (8, 2H, m), 0.959 (9, 3H, t), 3.962 (10, 3H, s).

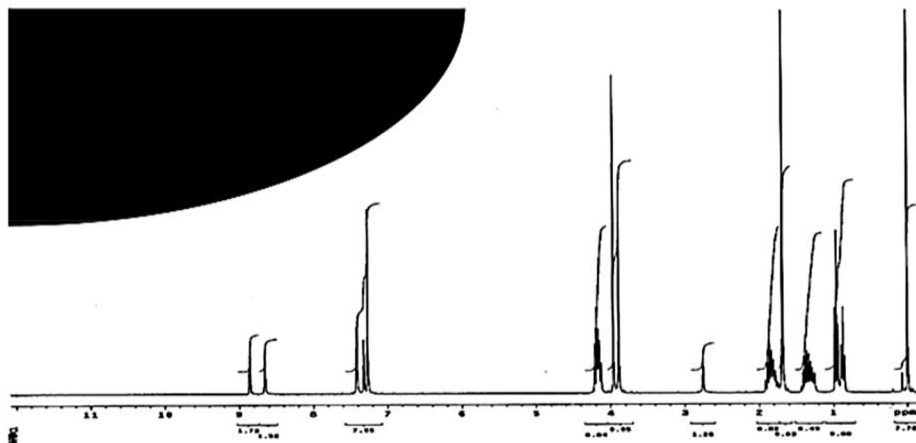


Figure g : Spectres RMN du ¹H de [BMIM][BF₄].

- **Résultats de l'analyse RMN du ¹³C de [BMIM][BF₄]**

¹³C NMR (76 MHz, CDCl₃): σ (ppm) 135.99 (C2), 123.80 (C4, d), 126.5 (C5, d), 49.57 (C6, d), 31.86 (C7), 19.25 (C8), 13.27 (C9), 36.04 (C10).

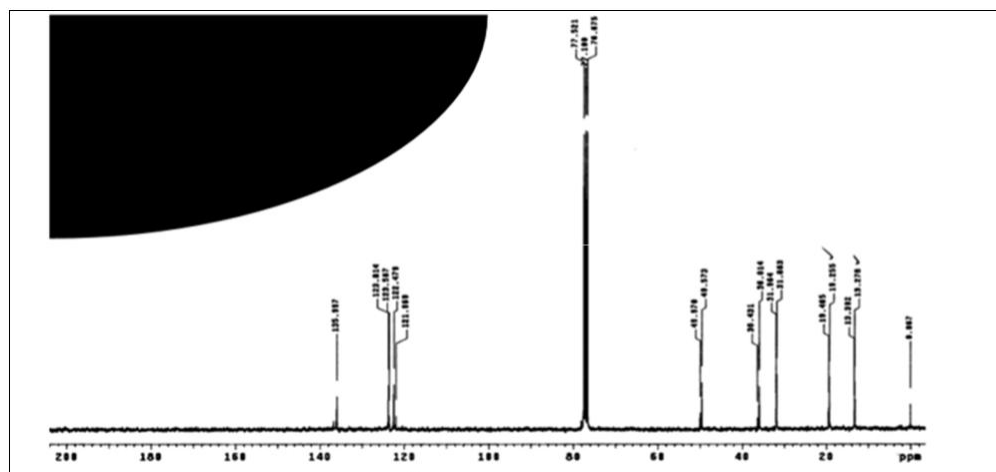


Figure h : Spectres RMN du ¹³C de [BMIM][B



Synthesis and antimicrobial properties of imidazolium and pyrrolidinium salts

D. Demberelnyamba,^a Ki-Sub Kim,^a Sukjeong Choi,^a Seung-Yeob Park,^a Huen Lee,^{a,*} Chang-Jin Kim^b and Ick-Dong Yoo^b

^aDepartment of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, South Korea

^bAntioxidant Research Lab., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52 Oeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, South Korea

Received 22 October 2003; accepted 6 January 2004

Abstract—For the purpose of developing new disinfectants and antiseptics, we searched for compounds having high bactericidal activity against gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and fungi. Three different series of quaternary imidazolium and pyrrolidinium salts were synthesized: series A (1-alkyl-3-methylimidazolium chlorides and bromides); series B (1-alkyl-2-methyl-3-hydroxyethylimidazolium chlorides); and series C (*N*-alkyl-*N*-hydroxyethylpyrrolidinium). Series B and C were newly designed. These three series were tested to evaluate their antibacterial and antifungal properties for the first time. Seven microbial strains were used in the study: *Escherichia coli* KCTC1924, *Salmonella typhimurium* KCTC1926, *Staphylococcus aureus* 209 KCTC1916, *Staphylococcus aureus* R209 KCTC1928, *Bacillus subtilis* KCTC1914, *Candida albicans* KCTC1940, and *Chlorella regularis*. The antimicrobial efficiency was measured by bacterial and fungal growth inhibition expressed as minimal inhibitory concentration (MIC) values. Series A and B imidazolium salts had very good antimicrobial activity against the examined Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, and fungi. Also the pyrrolidinium salt was found to have low MIC for some of tested microorganisms. The antibacterial and antifungal active properties of the salts depend upon the structure of functional groups and the alkyl chain length in the imidazolium and pyrrolidinium ring. Among the synthesized quaternary imidazolium and pyrrolidinium salts, the imidazolium salts containing a long alkyl chain and the introduction of a hydroxyethyl chain and methyl group into the imidazolium ring structure leads to broad spectrum active antimicrobial agents which not only have bacteriostatic properties but could be powerful bactericides.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The history of modern antiseptics and disinfectants dates back several decades. The chronological list includes benzalkonium chloride (BAC) and cetylpyridinium chloride (CPC), both of which are quaternary ammonium compounds and are still now broadly used. Quaternary ammonium compounds (QAC) are generally known to be bioactive substances and are used mainly for environmental disinfection, disinfection of

medical equipment, and disinfection in hospitals. In 1938, Domagk¹ introduced the first QACs based on the disinfectant known as Zephird. In 1926, Browning et al.² described the antibacterial and antifungal activity of heterocyclic QACs derivatives. In 1983, Preston³ detailed the effect of a number of structural features on the efficiency of dialkyl QACs; total carbon atom contents of 22–24 were expected to be the most effective. In 1985, Kourai et al.⁴ investigated the heterocyclic QACs and reported that for bacteria there was a quantitative relation between MIC (minimum inhibitory concentration) and water–octanol partition coefficient *P*, on the basis of *N*-alkylpyridinium iodides. In 1995 and 1996, Pernak^{5,6} reported, for quaternary alkylthiomethylimidazolium chlorides, the existence of a quantitative relation between CMC (critical micellar concentration) and MIC against bacteria and the hydrophobicity index (HI).

Keywords: Antimicrobial agents; Antimicrobial activity; Quaternary *N*-alkyl-*N*-methylimidazolium halides; Quaternary *N*-alkyl-*N*-hydroxyethylimidazolium halides; Quaternary *N,N*-alkylhydroxyethylpyrrolidinium halides.

*Corresponding author. Tel.: +82-4286-93917; fax: +82-4286-93910; e-mail: h_lee@kaist.ac.kr



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

www.elsevier.com/locate/jcis



Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution

Anna Cornellàs^a, Lourdes Perez^a, Francesc Comelles^a, Isabel Ribosa^a, Angeles Manresa^b,
M. Teresa Garcia^{a,*}

^aDepartment of Chemical and Surfactant Technology, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC), CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^bFacultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 September 2010
Accepted 20 November 2010
Available online 25 November 2010

Keywords:
Long-chain ionic liquid
Surface activity
Micellization
Biological activity

ABSTRACT

Two series of long-chain imidazolium and pyridinium based ionic liquids (1-alkyl-3-methylimidazolium and 1-alkylpyridinium bromides) were synthesised and the effect of the alkyl chain length and the nature of the cationic head group on micellization and antimicrobial activity of the ionic liquids (ILs) were investigated. Tensiometry, conductometry, spectrofluorimetry and PGSE-NMR were applied to study the self-aggregation of the amphiphilic ILs in aqueous solution. The ILs investigated displayed surface activity and the characteristic chain length dependence of the micellization process of surfactants. The antimicrobial activity was evaluated against Gram-negative and Gram-positive bacteria and fungi. ILs containing more than eight carbon atoms in the alkyl chain showed antimicrobial activity. Their efficiency as antimicrobial agents increased with the hydrophobicity of the amphiphilic cation being the C₁₄ homologous the most active compounds.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Ionic liquids (ILs) are organic salts with melting points under 100 °C, often even lower than room temperature which represent a new class of non-molecular ionic solvents with potential for use in sustainable processes as solvents, catalysts and electrolytes [1–4]. ILs are outstanding good solvents as they are non-volatile, non-flammable, have a high thermal stability and favourable solvating properties for a broad range of organic, inorganic and polymeric materials. Although earlier applications of ILs were mainly in chemical separations [5,6], organic chemistry [3,7] and electrochemistry [8], the scope of their application is now much broader and covers their use in biocatalysts [9], polymer science [10], sensors [11], solar cells [12], fuel cells [13] and biomass processing [14] and as thermal fluids [15], ionogels [16] and lubricants [17]. Most widely studied ILs [18,19] are comprised of bulky, asymmetric N-containing organic cations in combination with any wide variety of anions, ranging from simple inorganic anions to more complex organic species. Changes in the cation and anion combinations or the nature of the moieties attached to each ion allow the physical properties of ionic liquids to be tailored for specific applications [1,6].

Long-chain imidazolium and pyridinium based ionic liquids consist of a charged hydrophilic head group and a hydrophobic tail

and consequently possess an inherent amphiphilic nature. It can be, therefore, anticipated that these compounds will exhibit an interfacial and aggregation behaviour analogous to that displayed by conventional cationic surfactants. Thus, the ability to form self-assembled structures may have consequences in a variety of areas such as the extractions of products from IL-containing systems, the synthesis and purification of bulk ILs, the solvation properties of the ILs molecules, the formation of dispersed or phase-separated systems, etc. Simple changes in the hydrophobicity of ionic liquids by varying the alkyl chain length, the type of head group or the nature of the counter ion allow a fine tuning of the structure and dynamics of the micellar aggregates for specific purposes.

Most of quaternary ammonium based surfactants (QACs) are known to possess, in addition to interfacial activity, prominent biological activity against bacteria and fungi. Kopecky [20] analyzed micellization of QACs in aqueous solutions in connection with their antimicrobial activity. They found that antimicrobial activity of them is closely related to their surfactant properties. Due to the structural resemblances between QACs and long chain pyridinium and imidazolium ILs, it is expected that this type of ILs may also exhibit antimicrobial activity. This anticipation has been confirmed by different authors for some ILs [21,22]. Likewise recent toxicology data indicate a strong correlation between the length of the alkyl chain appended to the IL cation and the resulting toxicity [23,24]. The association phenomena in aqueous solutions of long chain ILs may affect substantially the available concentration of

* Corresponding author. Fax: +34 32045904.
E-mail address: teresa.garcia@iqac.csic.es (M.T. Garcia).

Antimicrobial and surface activity of 1-alkyl-3-methylimidazolium derivatives

Justyna Łuczak,^a Christian Jungnickel,^{**a} Izabela Łącka,^b Stefan Stolte^c and Jan Hupka^a

Received 19th October 2009, Accepted 9th February 2010

First published as an Advance Article on the web 22nd March 2010

DOI: 10.1039/b921805j

Knowledge of the structure–activity relationship (SAR) allows for the possibility to design and synthesize new cationic amphiphiles with optimized antimicrobial activities for future development of new disinfectants, sanitizers or preservatives. The need to design and identify new compounds, possessing antimicrobial properties, results from the emergence of more resistant micro-organisms in our globalized society. Hitherto, most studies which analyse the biological activity of ionic liquids (ILs) investigate the effect of the cation, whereas the knowledge of the effect of the anion is limited. The present study confirms the existence of a strong relationship among structure, surface activity and biological action of imidazolium ionic liquids on bacteria and fungi. The dependence of the antimicrobial activity on chemical structure–chain length and anion type of 30 compounds was determined. The anion is an important structural element which partakes in the definition of the physicochemical properties of the IL, and in consequence the technological applications and mode of action of the compound. The introduction of a longer substituent on the imidazolium cation results in a lower minimal inhibitory concentration (MIC). Thus, antifungal and antibacterial activities were found to increase with chain length, very often up to a point exhibiting a cut-off effect at chain lengths of 16 or 18 for the imidazolium cation and the [Cl] anion. The efficiency of surface tension reduction circumscribed by the pC_{20} and the relationship between antimicrobial activity and pC_{20} is described herein. The relationship indicates an antimicrobial mode of action dependant on the surface activity of the molecule, inferring that surface activity may contribute to the cut-off effect in the biological activity of ILs.

Introduction

The properties of certain ionic liquids (ILs) such as high extractive selectivity, negligible volatility, inflammability, thermal stability *etc.* allow ILs to play a promising role as alternative media in diverse areas. These can include synthesis and catalytic chemistry,¹ separation² and electrochemical³ processes, and combined reaction–separation processes. One of the main aspects gaining attention in IL research is the enormous range of cation–anion combinations, which results in a large potential for adjustability of structure/properties. ILs are often called ‘designer solvents’ or considered ‘task-specific’ because of their possibility to be tailored to fulfil the technological demands of a variety of applications.

In previous research, it has been shown that the toxicity is not only comparable to common molecular solvents, but also

to highly toxic biocides. The structure–activity relationships (SARs) of ILs have indicated in almost all investigated test-systems (*in vitro* assays,^{4,5} organism studies comprising *e.g.* bacteria,⁶ earthworms,⁷ water fleas,^{8,9} zebrafish,¹⁰ and algae¹¹) that the length of the side chain is the most significant indicator of biological activity.

A number of studies were published which analyse also the microbial inhibition of ILs. Demberelnyamba *et al.* described antimicrobial activity of nine ILs from the imidazolium and pyrrolidinium families against seven strains of bacteria and fungi.¹² The antimicrobial effects of butyl-, hexyl- and octylimidazolium and pyridinium bromide ILs on the growth of a group of microorganisms (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Saccharomyces cerevisiae*) was investigated by Docherty *et al.*¹³ Both groups presented biological activity dependence on the chain length in the investigated cations of ILs. Cieniecka-Roslonkiewicz *et al.* tested a broad range of phosphonium ILs with diverse anions, revealing that the biological activity of phosphonium salts depend on both cation structure and anion type. Replacement of halide anions with other, more complicated, moieties was found to decrease the antimicrobial properties.¹⁴ Pernak *et al.* established the correlation between MIC (minimal inhibitory concentration) and hydrophobicity (octanol–water partition coefficient) of *N*-alkoxymethylpyridinium and alkylthiomethylimidazolium derivatives,^{6,15} where it was found that the higher

^aDepartment of Chemical Technology, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, ul. Narutowicza 11/12, 80-233, Gdańsk, Poland. E-mail: cahj@chem.pg.gda.pl; Fax: +48 583472065; Tel: +48 583472334

^bDepartment of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Chemical Faculty, Gdańsk University of Technology, ul. Narutowicza 11/12, 80-233, Gdańsk, Poland

^cDepartment of Sustainable Chemistry – Centre for Environmental Research and Sustainable Technology (UFT), University of Bremen, Leobener Straße, D-28359, Bremen, Germany



The effect of the cationic structures of chiral ionic liquids on their antimicrobial activities



Joanna Feder-Kubis^{a,*}, Krzysztof Tomczuk^b

^a Wrocław University of Technology, Faculty of Chemistry, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland

^b Wrocław University of Technology, Faculty of Mechanical and Power Engineering, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2012

Received in revised form 13 March 2013

Accepted 26 March 2013

Available online 2 April 2013

ABSTRACT

In this study the significant effect of the cationic structures of ionic liquids on their antimicrobial efficacy has been shown. An analysis has been made for the structure of ammonium, alkylimidazolium, alkoxy-methylimidazolium, and pyridinium chiral ionic liquids. The cationic structures of the discussed chiral ionic liquids and commonly used benzalkonium chloride were ranked in terms of antimicrobial activity. The broadest and the strongest spectrum of activities against microbes represent ammonium chlorides. Alkylimidazolium and alkoxy-methylimidazolium chlorides exhibit activities also higher than the ones shown by benzalkonium chloride. These compounds can be successfully applied in antiseptics and disinfection. Contained in the structures of discussed chlorides chiral pool of (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)-menthol has significant impact on strengthening the biological activity of ILs. Several chlorides with (±)-menthol derivative have been synthesized and their biological activity has been estimated. The racemic counterparts are much less effective than the optically active chlorides.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ionic liquids (ILs), currently defined as salts with melting points below 100 °C, have been known for almost a century.¹ Interest in ILs comes from their extraordinary physicochemical properties, such as: low vapor pressure, high polarity, high thermal stability, high ionic conductivity, tunability and non-flammability. They have been found to produce unique selectivities and reactivities, when used as solvents. Because of these singularities, ionic liquids have become promising alternatives to volatile organic solvents in numerous industrial chemical processes.² ILs have been shown to deliver improved reaction rate and yield a number of chemical reactions. Extraordinarily important is the fact that they might be appropriate replacements for toxic catalysts, facilitate product recovery and have the potential for recyclability. They have been found to be extremely advantageous in various applications, not only in synthetic, separation, extraction chemistry, but also a number of biological processes,^{3–6} CO₂ absorption,⁷ synthesis of nanoparticles,⁸ and also utilization of ionic liquids as active pharmaceutical ingredients (APIs).⁹

Biological issues such as stability, toxicity, biodegradability, and recyclability have become ever more important considerations in the subject matter of ionic liquids. Appropriate design but also well

thought-out use of ionic liquids having antimicrobial activity seems to be extremely important and, what is more, can deliver significant benefits in infection control through improved disinfectants, antiseptics and biocides. The antimicrobial activities of various classes of ionic liquids against both environmental and clinically important microorganisms have been shown in various studies.^{10–14} In general, it was shown that antimicrobial activity is related to the length of the substituent chain.^{15–17} The compounds with short functionalised side chains have weaker biological efficacy than those with long chain in all organisms and strains tested. Gilmore and co-workers reported for the first time the *in vitro* antibiofilm activity of a series of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids against clinically relevant pathogenic bacteria (including MRSA) and fungi¹⁸ using the Calgary Biofilm Device (CBD).¹⁹ They have presented a comparison of antimicrobial activity against planktonic bacteria and established biofilms. 1-Alkyl-3-methylimidazolium chlorides possess potent, broad spectrum antibiofilm activity. The potential of ionic liquids as antibiofilm agents could lead to a range of clinical and industrial applications. Łuczak et al. correlated the efficiency of surface tension reduction for imidazolium salts with the MIC to quantify the surface activity of investigated compounds.²⁰ The relationship indicates an antimicrobial mode of action dependant on the surface activity of the molecule, inferring that surface activity may contribute to the cut-off effect in the biological activity of ILs. Malhotra and co-workers have determined for the first time the anti-cancer activity and cytotoxicity of phosphonium, ammonium,²¹ and imidazolium²²-based ionic liquids via

* Corresponding author. Tel.: +48 71 320 29 75; fax: +48 71 328 04 75; e-mail address: joanna.feder-kubis@pwr.wroc.pl (J. Feder-Kubis).



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiodAntifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oilAkash Kedia^a, Bhanu Prakash^a, Prashant Kumar Mishra^a, C.S. Chanotiya^b,
Nawal Kishore Dubey^{a,*}^aLaboratory of Herbal Pesticides, Centre of Advanced Study in Botany, Banaras Hindu University, Varanasi 221005, U.P., India^bCentral Institute of Medicinal & Aromatic Plants, Lucknow 226015, U.P., India

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2013

Received in revised form

15 October 2013

Accepted 15 October 2013

Available online 31 January 2014

Keywords:

Mentha spicata

Essential oil

Antifungal

Aflatoxin B₁*Callosobruchus chinensis*

Plant-based pesticide

ABSTRACT

This study reports on the chemically characterized essential oil (EO) from *Mentha spicata* L. which was tested as a plant-based pesticide in because it showed efficacy against food-deteriorating molds, aflatoxin production, lipid peroxidation, and the insect pest *Callosobruchus chinensis*. The chemical characterization of this EO through GC/MS analysis depicted 13 compounds comprising 97.09% of the EO, carvone being the major component (59.6%). The EO significantly inhibited growth and aflatoxin B₁ production by the toxigenic strain of *Aspergillus flavus* [LHP(C)-D6] at 1.0 and 0.9 $\mu\text{l ml}^{-1}$ levels, respectively. The EO also had a broad fungitoxic effect against 19 food-deteriorating molds. The oil caused 100% mortality to *C. chinensis* during a fumigation test with an LC₅₀ value of 0.003 $\mu\text{l ml}^{-1}$ air after 24 h of treatment and 100% repellency at 0.025 $\mu\text{l ml}^{-1}$ air concentration. The EO of *M. spicata* at 0.1 $\mu\text{l ml}^{-1}$ air concentration was recorded as the effective fumigant, showing 98.46% oviposition deterrence, 100% ovicidal activity, 88.84% larvicidal activity, 72.91% pupacidal activity, and 100% antifeedant activity against *C. chinensis*. The phytotoxicity assay showed 100% germination of EO-treated chickpea seeds. The EO had a low mammalian toxicity with an LD₅₀ of 8342.33 $\mu\text{l kg}^{-1}$ for oral toxicity on mice. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) value of EO was 18.55 $\mu\text{l ml}^{-1}$ during a DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Stored food commodities in major parts of the world are vulnerable to biodeterioration by fungal and insect attack. It has been estimated that around 30–35% of the yearly damage to agricultural food commodities takes place during post-harvest storage (Prakash et al., 2012a). World population is projected to increase to 9 billion by 2050, so we can ill afford such losses. *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae), the adzuki bean weevil, is a biodeteriorating insect pest of legumes that causes serious losses—damaging up to 32–64% of stored legumes in Asia and Africa (Shukla et al., 2011). Weight loss due to insect feeding leads to quantitative damage and loss of nutritional and aesthetic value leads to qualitative damage of stored products

(Kumar et al., 2011). In addition to insects, food-borne molds and their toxic metabolites cause quantitative and qualitative deterioration of nearly 25% of agricultural food items throughout the world (Pittet, 1998; Prakash et al., 2012b). Mold infestation leads to change in color and texture, increase in free fatty acids, and reduced nutritional value and germination ability (Dhingra et al., 2001). In some cases insect infestations accelerate mold infestation and also create favorable conditions for mycotoxin secretions by mycotoxigenic storage fungi (Fennell et al., 1978). The dominance of *Aspergillus* species, particularly *Aspergillus flavus*, in stored food items is a matter of great concern, as these species have the capability to secrete aflatoxins in affected food items (Wagacha and Muthomi, 2008). Aflatoxicosis can induce hepatocarcinogenesis, teratogenesis, mutation, and immunosuppression in humans as well as in livestock, causing food safety concerns (Mishra et al., 2012; Passone et al., 2012). In addition to fungal mycotoxin and insect contaminations, lipid peroxidation due to the chain reaction of free radical oxidation in food items is another major problem for food industries because the oxidized

* Corresponding author. Tel.: +91 9415295765.

E-mail addresses: nkdubey2@rediffmail.com, nkdubeybhu@gmail.com (N. K. Dubey).

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو اختبار تأثير مضادات الفطريات لسائل أيوني جديد على الفطريات المسببة للأمراض التي تنتمي إلى جنس فيزاريوم.

– في البداية، قمنا بتحضير مجموعة من السوائل الأيونية القائمة على الشحنة الموجبة للإميدازوليوم عن طريق تغيير طول سلسلة الألكيل. تم هذا التحضير بواسطة خطوة رباعية الرابطة لذرة النيتروجين للإميدازوليوم للحصول على 1-إيثيل إميدازوليوم بروميد و 1-بوتيل إميدازوليوم بروميد.

– وفي المرحلة الثانية، تم إضافة الزيت الأساسي من أوراق النعناع الأخضر منثا سريلفاتا المجففة بواسطة تقنية التقطير المائي. ولمقارنة تأثير هذه المكونات الثلاثة على الفطريات، اعتمدنا على نتائج الأعمال السابقة التي تبين أن السوائل الأيونية و السائل الأساسي للنعناع الأخضر لها تأثير واضح على الفطريات.

الكلمات المفتاحية: سوائل أيونية، إميدازوليوم، رباعية الرابطة، فيزاريوم، الزيت الأساسي، النعناع الأخضر.

Résumé :

Ce présent travail a pour but de tester l'effet antifongique d'un nouveau liquide ionique sur des champignons phytopathogènes appartient au genre *Fusarium*.

– En premier temps, nous avons synthétisé deux liquides ioniques à base d'imidazolium en changeant la longueur de la chaîne alkyle. Par la quaternisation de l'atome d'azote, qui résultant l'obtention de 1-butyl imidazolium bromide et 1-ethyl imidazolium bromide.

– Et en deuxième temps, l'extraction d'huile essentielle à partir des feuilles séchées de *Mentha spicata* par hydrodistillation a été ajoutée.

Pour mener bien à cette étude et afin de comparer l'effet antifongique de ces trois composés on a basé sur les résultats des travaux antérieurs. Ils s'avèrent qu'ils ont une bonne activité antifongique.

Les mots clés : liquides ioniques, imidazolium, quaternisation, *Fusarium*, huile essentielle, *Mentha spicata*.

Abstract:

The purpose of this work is to test the antifungal effect of a new ionic liquid on phytopathogenic fungi belonging to the genera *Fusarium*.

– Firstly, we synthesized two imidazolium based ionic liquids by changing the alkyl chain length. By the quaternization of the nitrogen atom, resulting in the obtaining of 1-butyl imidazoliumbromide and 1-ethyl imidazoliumbromide.

– Secondly, extraction of essential oil from the dried leaves of *Mentha spicata* by hydrodistillation was added.

To compare the antifungal effect of these three components, the results of previous work were used. They are found to have good antifungal activity.

Keywords: Ionics liquids, imidazolium, quaternization, *Fusarium*, essential oil, *Mentha spicata*.