République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de MEDEA

Facultés des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Mémoire de Fin d'Etude pour l'obtention du diplôme de
Master en Procédés Pharmaceutiques

Option : Procédés Pharmaceutiques

Thème

Effet des facteurs physico-chimiques sur les activitésantimicrobienne et antioxydanede l'ailAlgérien

<u>Proposé et Dirigé par</u> :
- Mr. ATSAMNIA Djamel.
- Pr. HANINI Salah.

<u>Réaliser par</u> :
- M^{elle}. BELMADANI Souad.
- M^{elle}. KALAI Leila.

2012-2013

بسم الله الرحمن الرحيم

"فلينظر الإنسان إلى طعامه"

الآية24 من سورة عبس.

صدق الله العظيم

بسم الله الرحمن الرحيم

"فادع لنا ربك يخرج لنا مما تنبت الارض من بقلها وقثائها و فومها وعدسها وبصلها" **الآية61 من سورة البقرة.**

صدق الله العظيم

DEDICACES

Je dédie ce travail

بسم الله الرحمن الرحيم
"وقلربي ارحمهما كما ربياني صغيرا "
الآية 24 من سورة الاسراء

صدق الله العظيم

A ma très chère mère **Meriem**

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse ALLAH, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon trèschèr père **Mohamed**

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes frères; **Merzak, Fateh** et sa femme **Amel, Mahfoud**, **Rabah.**

A les petites fleurs et la joie de la maison, les anges **Layane et Sondosse.**

A mes sœurs; **Dalila, Salima**.

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissances de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

A mes neveux, meilleurs vœux de succès dans vos études.

A toute la famille**Belmadani et Sabour**.

A mes enseignants de l'écoule primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidé; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Ama binôme **Leila** qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et à sa famille.

A mes amies; **Abir, Siham, Hadda, Amina, Naima, Amel, Safia, Meriem, Fatiha…** et à leurs familles.

Je vous remercie de votre patience vous m'avez aidée toujours à avancer vous êtes tous des grandes amies si gentilles, merci d'être toujours près de moi, amies avec lesquelles je souris.

A toute la promotion de génie des procédés pharmaceutiques

2012-2013

Souad

DEDICACES

Je dédie ce travail

بسم الله الرحمن الرحيم
"وقلربي ارحمهما كما ربياني صغيرا "
الآية 24 من سورة الاسراء

صدق الله العظيم

A ma très chère mère **Djamila**
Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse ALLAH, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A la mémoire de mon père **Taher**
Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A la fleur de la maison ma grande mère **Mahjouba**

A mes frères et sœurs; **Abedelkader, Sid Ahmed,Malika, kheira, Farah** et la petite ange**Salsabil**
Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissances de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.
A mes neveux, meilleurs vœux de succès dans vos études.

A l'espoir de la vie mon mari**Abdelrrazek Benaissa**pour son aide et ses encouragements,et sa famille

A toute la famille**Kalai et Abdet**.

A mes oncles**Rachid** et **Mohamed**, tantes, cousin et cousines affectueuses reconnaissances.

A mes enseignants de l'écoule primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidé; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Ama binôme **Souad** qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et à sa famille.

A mes amies; **Akila, Nabila, lamia, Khadija, Iman, Karima**,**Feirouz,Fatehia,Nadjia**et à leurs familles.

Je vous remercie de votre patience vous m'avez aidée toujours à avancer vous êtes tous des grandes amies si gentilles, merci d'être toujours près de moi, amies avec lesquelles je souris.

A toute la promotion de génie des procédés pharmaceutiques

2012-2013

Leila

REMERCIEMENTS

الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا أن هدانا الله

***T**out d'abord on rend grâce à **Allah**, le tout puissant qui nous a donné la santé et la volonté pour arriver à ce travail.*

***N**osvifs remerciements vont à tous qui nous a aidé de prés ou de loin à réaliser ce travail, spécialement :*

***N**os promoteurs : monsieur le professeur **HANINI Salah** pour son aide, ces conseils et ses encouragements, Mr. **ATSAMNIA Djamel** pour* son soutien*moral et pratique, est celuiqui a consacrébeaucoup de tempsà notre réussite.*

***N**os remerciements iront de même à **Mr. NEDJIOUI** le chef de département de génie des procédés à l'université de Médéa.*

***C**e projet a été réalisé au niveau des laboratoires : contrôle qualité, physico-chimique,Microbiologique du filiale antibiotical**SAIDAL**, c'est avec un sentiment de profonde satisfaction que nous remercions :*

Mme. KESKES: directrice du labo
M^{elle}. KARA Karima : chef de département de laboratoire contrôle qualité.
Mme. BAKHTI Farida : chef département de laboratoire physico-chimique.
Mr. BEN AMAIR : chef département de laboratoire microbiologique.

***S**ansoublié :*

Mr. BENMAHIEDDINE Mahfoud, Mr. BENZEKOURRabeh, Mr. CHRIF Tayeb, Mr. ABDELI Nouar, Mr. ZOUANBIA Fouad, Mr. BOUKHATEM Roudwane, Mr. DERGUA Khaled, Mr. AISAOUI Lakhdar, Mr. KHELFI Mourad, M^{me}. GRANE Souraya, M^{elle}. ATTARI Fatima elzahraa, M^{me}. LAZAR Fella,M^{me}. TOUATI Latifa.

Pour l'aide précieuse, les conseils éclairé, les encouragements qu'ils n'ont cessé de nous prodiguer afin de mener à bien cette tâche.

***I**l nous est agréable, en cette occasion d'adresser nos remerciements le plus vifs à :M^{elle} KHAOUANE Latifa, Mr HAMADACHE Mabrouk, Mme LAOUFI Sakina,*
Mr BEN AISSAAbdelrrazek.

***N**ous exprimons nos profonds remerciements à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.*

***N**ous tenons à remercier vivement tout le personnel du magasin de bibliothèque de l'université de Médéa, pour leur aide et leur disponibilité.*

***A**vec nos sincères gratitudes*

Résumés

Introduction générale

Chapitre I.

Synthèse bibliographique

Chapitre II.

Partie expérimentale

Chapitre III.

Résultat et discussion

Conclusion générale

Référence et bibliographie

Annexes

الملخص: *تأثير العوامل الفيزيوكيميائية للثوم على النشاطات المضادة للمكروبات و المضادة للأكسدة.*

تمت دراسة الأنشطة البيولوجية للثوم (بيسوم الآليوم ل) على نطاق واسع ، بما في ذلك المضاد للبكتيريا، المضاد للفطريات والمضاد للأكسدة. في سياق هذا البحث هو الهدف من عملنا، ويتركز اهتمامنا على دراسة الثبات الحراري للمكونات الرئيسية لمستخلص الثوم وألمع الآثار العلاجية لها. أسفرت النتائج المشجعة في أكثر من طريقة واحدة. بما في ذلك تأثير العوامل الفيزيوكيميائية على هذه الأنشطة، النشاط البكتيري مهم عند درجة حرارة 8 درجة مئوية والتأثير المضاد للأكسدة واضح عند درجة حرارة 25 درجة مئوية. تخمير الثوم وخفض التركيز يؤثر بطريقة كبيرة على أنشطة مستخلص الثوم: المضادة للبكتيريا، المضادة للفطريات والمضادة للأكسدة. وقد مكنت نتائج هذا المشروع الرئيسي من تسليط الضوء على بعض الإمكانات العلاجية لمستخلص الثوم وتمهد الطريق لدراسات في المستقبل.

الكلمات الجوهرية: الثوم- النشاط المضاد للبكتيريا- النشاط المضاد للفطريات- النشاط المضاد للأكسدة- مستخلص مائي- مستخلص ميثانولي-التركيز- الحرارة-التخمير.

Résumé: *l'influence des facteurs physico-chimiques sur les activités antimicrobienne et antioxydant de l'ail.*

Les activités biologiques de l'ail (Allium sativum L) : antibactérienne, antifongique et antioxydante, ont été largement étudiées. C'est dans ce cadre de recherches que se situe l'objectif de notre travail. Notre intérêt s'est porté sur l'étude de la stabilité thermique des constituants majeurs de l'extrait d'ail les plus doués d'effets thérapeutiques d'entre eux. Les résultats auxquels on a abouti sont encourageants à plus d'un titre. Notamment celui relatif à l'effet des paramètres physico-chimiques qui influent sur ces activités, l'activité antimicrobienne est significative à une température de 8°C et l'effet antioxydant est plus remarqué à 25°C. La fermentation de l'ail et la diminution de la concentration influent d'une manière considérable sur les activités: antibactérienne, antifongique, et antioxydant de l'extrait d'ail. Les résultats de ce projet de master auront permis de mettre en évidence une partie du potentiel thérapeutique de l'extrait d'ail et d'ouvrir la voie à de futures études.

Mots clés: Ail- Activité antibactérienne - Activité antifongique - Activité antioxydante - Extrait aqueux - Extrait méthanolique- Concentration - Température - Fermentation.

Abstract: *the influence of physicochemical factors on the antimicrobial and antioxidant activities of garlic.*

The biological activities of garlic (Allium sativum L), antibacterial, antifungal, antioxidant, have been widely studied. It is in this context that research is the goal of our work. Our interest is focused on the study of the thermal stability of the major components of garlic extract and the brightest of therapeutic effects of them. The results that are encouraging resulted in more than one way. Including that relating to the effect of physico-chemical parameters that influence these activities, the antimicrobial activity is significant at a temperature of 8 ° C and the antioxidant effect is observed at 25 ° C. Fermented garlic and decreasing the concentration of a considerable influence on the manner activities: antibacterial, antifungal, and antioxidant garlic extract. The results of this project have enabled master to highlight some of the therapeutic potential of garlic extract and pave the way for future studies.

Key words: Garlic - Antibacterial Activity - Antifungal Activity - antioxidant activity - Aqueous extract - Methanol extract-Concentration - temperature - Fermentation.

Pages

Synthèse bibliographique

Figure I.1. Photographie de l'ail (plante entière) et des fleurs……...……....03
Figure I.2. Bulbe d'ail ……...03
Figure I.3. Transformation de l'amine en amcine et de l'amcine en disulfure d'allyle……..05
Figure I.4. Formation des ajoènes…….……06
Figure I.5. Différents traitements appliqués à l'ail et produits obtenus…….06
Figure I.6. Récapitulatif des principales molécules présentes dans l'ail ……....07
Figure I.7. Effet hypolipémiant de l'extrait d'ail âgé chez les rats……14
Figure I.8. Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante……18
Figure I.9. Hydrodistillation traditionnelle……19
Figure I.10. Extraction « in-line» ……21
Figure I.11 . Schéma de préparation de l'extrait de rose en Herzégovine……..…22
Figure I.12. Différents types d'extraction par solvants volatils…….....24
Figure I.13. Différents états d'une molécule……25
Figure I.14. Schéma d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. ……27
Figure I.15. Schéma du montage d'extraction selon le principe «VMHD». ..……..27
Figure I.16. Schéma d'extraction selon le principe SFME ……....28
Figure I.17. Décomposition thermiquede l'allicine. ……..…..…31
Figure I.18. Décomposition thermiquede l'allicine. ……..……...31
FigureI.19. Chromatogrammede l'extraitau méthanol del'ail frais: Unalliine,, B, l'allicine. ……..……..35
FigureI.20. Chromatographe ioniquetotal del'extrait d'ailtypique. ……..…...36

Partie expérimentale

Figure II.1. Ail de la région de Berrouaghia (2012)……..…43
Figure II.2. Etapes de la préparation de l'extrait aqueux d'ail : (a) ecrasement d'ail , (b) maciration d'extrait aqueux d'ail, (c) filtration de l'extrait d'ail sous vide à 0,5 micro mètre. ……45
Figure II.3. Spectrophotométrie UV-visible [SAIDAL]……..46
Figure II.4. IR [SAIDAL]……47
Figure II.5. HPLC [SAIDAL] ……..……48
Figure II.6. Schéma illustrant la méthode des aromatogramme……50
Figure II.7. Préparation des boites pétries dans la hott……51
Figure II.8. Étapes de la dilution de l'extrait aqueux d'ail……..……52
Figure II.9. Tubes de dilution (50%) ……..53
Figure II.10. Ensemencement par écouvillon……53
Figure II.11. Filtration à l'aide d'un papier filtre (0.5micro mètre)……..……57
Figure II.12. Étapes de dilution de l'extrait méthanoïque d'ail…….58
Figure II.13. Protocole de détermination du pouvoir réducteur OKTAY *et al* (2003)…….59
Figure II.13. Dilution (50%)……60
Figure II.14. Protocole de fermentation de l'ail……61
Figure II.15. Protocole de préparation de l'extrait aqueux d'ail fermenté a une concentration 1.5g/ml……....62
Figure II.16. Protocole de préparation de l'extrait méthanolique d'ail fermenté a une concentration 0,46g/ml……..63

Résultat et discussion

Figure III.1. Extrait aqueux d'ail frais……..64
Figure III.2. Extraitméthanolique d'ail frais ……64
Figure III.3. Ail en fonction de temps à T=100°c ;(a)l'ail frais à t=0 ; (b) t=4heurs ; (c) t=6heurs ; (d) t=7heurs…..…65
Figure III.4. Spectre IR de l'extrait aqueux d'ail ……66
Figure III.5. Présentation graphique d'analyse par HPLC d'alanine (le premier pic correspond à l'alanine)…….67
Figure III.6. Chromatogramme de l'extrait aqueux d'ail…….....67
Figure III.7. Spectres d'analyse par HPLC de l'extrait aqueux d'ail à déférentes températures……68
Figure III.8. Aromatogramme de l'extrait aqueux d'ail (a) *E. Coli* ;(b) *bacillus subtilis*; (c) *Stphy. Aureus*……..69
Figure III.9. Influence de la concentration sur le diamètre d'inhibition pour l'E .coli ……71
Figure III.10. Influence de la concentration sur diamètre d'inhibition pour bacillus ……71
Figure III.11. Influence de la concentration sur diamètre d'inhibition pour staphy-auraus ……....72
Figure III.12. Diamètre d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait aqueux d'ail pour les trois bactéries…..72
Figure III.13. Zones d'inhibition pour E.coli obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé aux différentes températures (8-100°C)……...74
Figure III.14. Zones d'inhibition pour Bacillus subtilis obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé aux différentes températures (8-100°C)……..……74

Figure III.15. Zones d'inhibition pour Staphyloccoucs aureus obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubés aux différentes températures (8-100°C)……74
Figure III.16. Influence de température sur l'activité antibactérienne d'extrait aqueux d'ail pour l'E.coli…….75
FigureIII.17. Influence de température sur l'activité antibactérienne d'extrait aqueux d'ail pour bacillus…….75
Figure III.18. Influence de température sur l'activité antibactérienne d'extrait aqueux d'ail pour staphy-auraus…….76
Figure III.19. Influence de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour les trois souches.....76
Figure III.20. Aromatogramme de l'extrait aqueux d'ail pour condidaalbicans ……77
Figure III.21. Influence de la concentration de l'extrait aqueux d'ail sur l'activité antifongique, (a) la zone d'inhibition à **1.5 g/ml ;(b)** la zone d'inhibition à **0.75g /ml ;(c)** les zones d'inhibition à **0.375, 0.187 et 0.093 g/ml ; (d)** les zones d'inhibition à **0.046, 0.023, 0.0115 g/ml**……78
Figure III.22. Influence de la concentration sur l'activité antifongique……...79
Figure III.23. Influence de la température de l'extrait aqueux d'ail sur l'activité antifongique. (a) à T=8°C ;(b) à T=25°C ;(c) à T=35°C ;(d) à T=100°C……..80
Figure III .24. Influence de la température de l'extrait d'ail sur l'activité antifongique……..80
Figure III.25. Lepouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail frais……..81
Figure III.26. Comparaison entre le Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail frais et l'acide ascorbique……82
Figure III.27. Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail pour différentes concentrations……..…….82
Figure III.28. Pouvoir réducteur pour différentes concentrationsde l'acide ascorbique. ……...83
Figure III.29. Influence de la température de l'extrait méthanolique d'ail frais sur l'activité antioxydant. ……84
Figure III.30. Caractéristiques de l'ail avant et après la fermentation……..85
Figure III.31. Zones d'inhibition d'E.coli obtenus pour l'extrait aqueux d'ail fermenté pendant (1) 3 , (2) 5, (3) 11,(4) 14jours)……...86
Figure III.32. Zones d'inhibition de l'extrait aqueux d'ail fermenté pendant (1) 3,(2) 5, (3) 11, (4) 14 jours Pour *bacillussubtilus*……..86
Figure III.33. Zones d'inhibition de S.auraus obtenus pour l'extrait aqueux d'ail fermenté pendant (1) 3 , (2) 5, (3) 11,(4) 14 jours)……...87
Figure III.34. Influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour staphy……..87
Figure III.35. Influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour bacillus …….88
Figure III.36. Influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour E.coli…….88
Figure III.37. Influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour les trois souches bactériennes……...89
Figure III.38. Zones d'inhibition de condidaalbicans obtenus pour l'extrait aqueux d'ail fermenté pendant (3, 5, 11, 14 jours)……..90
Figure III.39. Influence de la fermentation sur l'activité antifongique de l'extrait aqueux d'ail……90
Figure III.40. Influence de la fermentation de l'ail sur l'activité antioxydant de l'extrait méthanolique d'ail……91

Pages

Synthèse bibliographique

Tableau I.1. Avantage et inconvénients de L'extraction par CO2 supercritique..……25
Tableau I.2. Sensibilité des différentes espèces bactériennes à l'allicine……..37
Tableau I.3. Effetde l'allicinesur diversfongiques pathogènes……..38

Partie expérimentale

Tableau II.1. Souches microbiennes utilisées……...43
Tableau II.2. Milieux de culture utilisés pour les tests microbiologiques……43
Tableau II.3. Matériels utilisés pour l'analyse et l'activité antioxydant……...44
Tableau II.4. Matériels et Réactifs utilisés……44
Tableau II.5. Conditions d'analyses par HPLC……49
Tableau II.6. Matériels et Réactifs utilisés……50
Tableau II.7. Matériels et Réactifs utilisés……52
Tableau II.8. Matériels et Réactifs utilisés……54
Tableau II.9. Matériels et Réactifs utilisés……57
Tableau II.10. Matériels et Réactifs utilisés……..58
Tableau II.11. Préparation des solutions utilisées……58
Tableau II.11. Matériels et Réactifs utilisés……60

Résultats et discussion

Tableau III.1. Caractéristiques de l'extrait aqueux d'ail..……64
Tableau III.2. Caractéristiques de l'extrait méthanolique d'ail...……65
Tableau III.3. Masse de l'ail en fonction de temps à T=100°c……65
Tableau III.4. Résultats de l'absorbance dans l'IR……..65
Tableau III.5. Conditions d'analyses de l'alanine par HPLC..…… ……...66
Tableau III.6. Hauteur de pic l'allicine dans l'extrait aqueux d'ail en fonction de la température de conservation (analyse HPLC). ……68
Tableau III.7. Résultats des diamètres des zones d'inhibition (aromatogramme). ……69
Tableaux III.8. Diamètres des zones d'inhibition des différentes concentrations. ..……...70
Tableaux III.9. Zones l'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait aqueux d'ail……..70
Tableaux III.10. CMI pour chaque bactérie en (cm). ……..73
Tableaux III.11. Diamètres des zones d'inhibition pour différentes concentrations de l'extrait d'ail...……78
Tableau III.12. Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail frais……..81
Tableau III.13. Résultats de comparaison entre le pouvoir réducteur de l'extrait méthanoïque d'ail et l'acide ascorbique ……..82
Tableau III.14. Caractéristiques de l'ail avant et après la fermentation……...85

Abréviations :

ATCC:**A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection.

APCI : **A**tmosphérique **I**onisation **C**himique à **P**ression.
CCM : **C**hromatographie sur **C**ouche **M**ince.
CMI:**C**oncentration **M**inimale **I**nhibitrice.
CPG :**C**hromatographie en **P**hase **G**azeuse.
DADS : **D**iallyldisulfide.
DAS : **D**iallylsulfide.
DATS : **D**iallyltrisulfide.
DL : **D**ose **L**étale.
DNPH : 2,4-**d**i**n**itro**p**hényl**h**ydrazine.
DO : **D**ensité **O**ptique.
DPDS : **D**ipropyldisulfide.
DPS : **D**ipropylsulfide.
E-coli : **E**scherichia –**C**oli.
FSC : **F**luides**S**upercritiques.
FTIR : **I**nfra **R**ouge à **T**ransformée de **F**ourrier.
GC :**C**hromatographie**G**azeuse.
HDL: **L**ipoprotéines de **H**aute **D**ensité
HPLC:**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography.
IFAC : Institut des **F**ruits et **A**grumes **C**oloniaux.
IR : **I**nfra **R**ouge.
LDL :**L**ipoprotéines de faible **D**ensité
MAE: **M**icrowave **A**ssisted **E**xtraction.
MAP:**M**icrowave **A**ssisted **P**rocess.
MDR :**R**ésistante à l'**a**ntibiotique.
NADPH :Nicotinamide **A**dénine**D**inucléotide **P**hosphate**H**ydrogéne
OxLDL : **L**ipoprotéines de faible Densité**Ox**ydés
PC:**P**ression**C**ritique.
ROS:**R**eactive **O**xygen **S**ppecies
GSH:**G**lutathione.
SAC: **S**-allylcystéine.
SAMC: **S**-allylmercaptocystéine.
SDE:**S**imultaneous **D**istillation **E**xtraction.
SEC : **S**-éthylcystéine.
SFME: Solvant Free Extraction Microwave.
SNAP25:**P**rotéine**A**ssociée**S**ynaptosomale de 25.
SPC : S-propylcystéine.
Staphy-aureus : Staphyloccoucs –aureus.
TCA : **T**richlorure **A**cétique.
TC : **T**empérature **C**ritique.
UV-VIS : **U**ltra **V**iolet-**Vis**ible.
VMHD: **V**accum**M**icrowave **H**ydro **D**istillation.

Les unités de mesure:

- ✓ **g**: **g**ramme.
- ✓ **mg**: **m**illi**g**ramme.
- ✓ **l**: **l**itre.
- ✓ **ml** : **m**illi**l**itre.
- ✓ **cm** : **c**enti**m**ètre.
- ✓ **mm** : **m**illi**m**ètre.
- ✓ **µl** : **microl**itre.
- ✓ **µm :m**icro**m**ètre.

Les symboles :

- ✓ **λ:** Longueur d'onde.

Pages

Introduction générale……...01

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1. Etude botanique……02
I.1.1. Classification……02
I.1.2. Distribution géographique……02
I.1.3. Description botanique……..02
I.1.4. La drogue……...03
I.2. Etude chimique……04
I.2.1. Analyse quantitative des composés contenus dans l'ail…….....04
I.2.2. Analyse qualitative des composés contenus dans l'ail……05
I.2.3. Identification……07
I.3. Etude pharmacologique……08
I.3.1. Historique et emplois……...08
I.3.2. Propriétés diverses……09
I.3.2.1. Propriétés antiseptiques, antibactériennes, antivirales, antifongiques, Antiparasitaires……09
I.3.2.2. Modifications des sécrétions respiratoires……09
I.3.2.3. Propriétés préventives vis-à-vis du cancer……09
I.3.2.4. Action hypoglycémiante……...10
I.3.2.5. Propriétés cardiovasculaires……10
I.3.2.6. Effet hypocholestérolémiant……11
I.3.2.7. Etudes sur cultures cellulaires……...13
I.3.2.8. Etudes chez l'animal……..13
I.3.2.9. Autres propriétés……...14
I.3.3. Utilisation de l'ail……15
I.3.3.1. Posologie:……..15
I.3.3.2 Mode d'administration:……..15
I.3.3.3. Médicaments:……15
I.4. Toxicité de l'ail……15
I.4.1. Odeur de l'ail……15
I.4.2. Effets indésirables rencontrés lors de l'utilisation de l'ail……16
I.4.3. Toxicologie……16
I.4.4. Contre-indications……17
I.5. Techniques d'extraction……...17
I.5.1. Procédés d'extraction traditionnels……...17
I.5.1.1. Introduction……...17
I.5.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau……..17
I.5.1.3. Hydrodistillation et ses variantes……...18
I.5.1.4. Expression à froid……...20
I.5.1.5. Distillation à vapeur saturée……...21
I.5.1.6. Hydrodiffusion……..22
I.5.1.7. Distillation « sèche »……..22
I.5.1.8. Extraction par solvants volatils ……23
I.5.2. Procédés d'extraction moderne……24
I.5.2.1. Extraction par fluides supercritiques (FSC)……...24
I.5.2.1.1. Définition……...24
I.5.2.1.2. Propriétés des fluides supercritiques……25
I.5.2.1.3. Extraction par CO2 supercritique…….....25
I.5.2.2. Extraction assistée par micro-ondes……...26
I.6. Méthodes d'analyse……..29
I.6.1. Méthode colorimétrique pour la détection des thiosulfinates……...30
I.6.2. Techniques chromatographiques……...30
I.6.2.1. chromatographie en phase gazeuse(CPG)……30
I.6.2.2. Chromatographie en phaseLiquide à Haute Performance (HPLC)……..32
I.6.2.3. HPLC en phase inverse(C18-HPLC)…….....32
I.6.2.4. HPLC en phasenormale…….....33
I.6.2.5. CouplageLC-MS……...35

I.7. Propriété antimicrobienne ……..36
I.7.1. Propriété antibactérienne de l'ail ……..36
I.7.2. Activité antifongique de l'ail……38
I.8. Propriété anti oxydation de L'ail……..39
I.9. Fermentation……41
I.9.1. Définition ……41
I.9.2. Processus de fermentation……41
I.9.3. Différentes fermentations……41
I.9.4. Fermentation d'ail ……42

Chapitre II.partie expérimentale

II.1. Matière végétale……43
II.2. Matériels microbiologiques……43
II.2.1. Les micro-organismes testés……43
II.2.2. Milieu de culture ……43
II.3. Matériels……44
II.4. choix de solvant d'extraction……44
II.5. Préparation de l'extrait aqueux de l'ail……44
II.5.1. Matériels et Réactifs……44
II.5.2. Mode opératoire……45
- Ecrasement ……45
- Macération ……45
- Filtration ……45

II.6. Détermination approximative du rendement d'extrait d'ail……46
II.6.1. Mode opératoire……46
II.7. Etudes physico-chimiques……46
II.7.1. Spectrophotométrie UV-visible……46
II.7.2.Spectrométrie infrarouge (IR)……47
II.7.3Chromatographie en phaseLiquide à Haute Performance (HPLC)……48
II.7.3.1. Conditions d'analyses par HPLC……49
II.7.3.2. Stabilité thermique de l'allicine……49
II.8. Activité antimicrobienne de l'ail……49
II.8.1. Aromatogramme……49
II.8.2. Préparation du milieu de culture……50
II.8.2.1. Matériels et Réactifs……50
II.8.2.2. Soja agar pour Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylocoque aureus……50
II.8.2.2. Mode opératoire……50
II.8.2.3. Sabouraud pour les condidas……51
II.8.2.3.1. Mode opératoire……51
II.8.3. Activité anti bactérienne……51
II.8.3.1. Détermination de la CMI ……51
II.8.3.1.1. Matériels et Réactifs……52
II.8.3.1.2. Mode opératoire……52
II.8.3.1.2.1. Dilution……52
II.8.3.1.2.2. Ensemencement par écouvillonnage……53
II.8.3.1.2.3. Application des disques……53
II.8.3.1.2.4. Incubation……53
II.8.3.1.2.5. Lecture……53
II.8.3.2. Influence de la température……54
II.8.3.2.1. Mode opératoire……54
- 1er étape ……54
- 2ème étape : Ensemencement et application des disques ……54
- 3ème étape : Incubation……54
- 4ème étape : Lecture……54

II.8.4. Activité antifongique……54
II.8.4.1. Influence de la concentration……54
II.8.3.1.1. Matériels et Réactifs……54
II.8.3.1.2. Mode opératoire……55
II.8.3.1.2.1. Dilution ……55
II.8.3.1.2.2. Ensemencement……55

II.8.3.1.2.3. Application des disques……55
II.8.3.1.2.4. Incubation……..55
II.8.3.1.2.5. Lecture……55
II.8.3.1.3. Influence de la température……55
II.8.3.1.3.1. Mode opératoire……..55
- 1er étape ……...55
- 2ème étape : Ensemencement et application des disques. ……56
- 3ème étape : Incubation ……56
- 4èmeétape : Lecture ……...56

II.9.Activité antioxydante de l'extrait méthanolique d'ail (détermination du pouvoirréducteur)……..56
II.9.1.Principe……56
II.9.2. Préparation de l'extrait méthanolique de l'ail……57
II.9.2.1. Matériels et Réactifs……...57
II.9.2.2. Mode opératoire……...57
- Ecrasement……57
- macération……..57
- Filtration ……...57

II.9.3. Influence de la concentration sur l'activité antioxydant……..58
II.9.3.1. Matériels et réactifs……..58
II.9.3.2. Mode opératoire……...58
II.9.3.2.1. Préparation des solutions utilisées……58
II.9.3.2.2. Dilution……58
II.9.3.2.3. Protocole d'OKTAY……59
II.9.3.2.3. Acide ascorbique……...60
II.9.4. Influence de la température……..60
II.9.4.1.Mode opératoire……60
II.10. Fermentation de l'ail……60
II.9.3.1. Matériels et réactifs……...60
II.9.3.2. Mode opératoire……...61
II.9.3.3. Influence de la fermentation sur l'activité antimicrobienne……62
II.9.3.4. Influence de la fermentation sur l'effet anti oxydant……63

Chapitre III. Résultats et discussion

III .1. Qualité de l'extrait obtenu……...64
III.1.1. Extrait aqueux ……64
III.1.1.1. Caractéristiques de l'extrait aqueux d'ail…..……..64
III.1.2. Extrait méthanolique……...65
III.1.2.1. Les caractéristiques de l'extrait méthanolique d'ail ……65
III.2.Détermination approximative de taux d'humidité de l'ail frais utilisé……....65
III.3.Etude physico-chimique de l'extrait d'ail……..65
III.3.1. Spectroscopie infrarouge(IR) ……65
III.3.1.1. Discussion……66
III.3.2. Chromatographie en phaseLiquide à Haute Performance (HPLC)……...66
III.3.2.1. Le standard ……67
III.3.2.2.L'échantillon ……67
III.3.2.3. Stabilité thermique de l'extrait d'ail……...68
III.3.2.2.1. Discussion……68
III.4. Activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'ail……...69
III.4.1. Activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail……..69
III.4.1.1. Diamètre des zones d'inhibitions……69
III.4.1.2. Détermination de la CMI……70
III.4.1.3.Discussion……73
III.4.1.4. Effet de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail……...74
III.4.1.5.Discussion……77
III.4.2. Effet antifongique de l'extrait aqueux d'ail……77
III.4.2.1. Choix de la souche……...77

III.4.2.2. Diamètre des zones d'inhibitions……77
III.4.2.3. Détermine CMI ……..……78
III.4.2.4. Discussion.....79
III.4.2.5. Influence de la température sur l'activité antifongique……...79
III.4.2.6. Discussion……...81
III.5. Activité antioxydante de l'extrait méthanolique d'ail ..……...81
III.5.1. Influence de la concentration de l'extrait méthanoliquesur l'activité antioxydante……...82
III.5.2. Influence de la concentration de l'acide ascorbique sur l'activité antioxydante……83
III.5.3. Discussion……...83
III.5.4. Influence de la température sur l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de l'ail frais. ……..84
III.5.5. Discussion……...84
III.6. Fermentation de l'ail……..85
III.6.1. Caractéristiques de l'ail avant et après la fermentation ……85
III.6.1. Effet antibactérien de l'ail fermenté……...86
III.6.2. Discussion……...89
III.6.3. Effet de la fermentation sur l'activité antifongique……90
III.6.4. Discussion……...91
III.6.5. Influence de la fermentation sur l'effet antioxydant ……..91
III.6.5. Discussion……...91
III.7. Conclusion……92

Conclusion générale ……...……...93
Références bibliographiques…….……...……94
Annexe

.

L'ail est cultivé depuis des milliers d'années autant pour une utilisation culinaire que médicinale. Il compte parmi les plantes médicinales les plus anciennes. En prêtant sa saveur piquante à divers mets, on lui a attribué diverses fonctions au cours du temps. Considéré aussi bien comme sacrée, magique ou protecteur selon certains, il a aussi été méprisé à cause de sa forte odeur. Bon nombre de propriétés pharmacologiques et thérapeutiques lui sont encore aujourd'hui attribuées.

L'ail (Allium sativum) a fait l'objet d'un intérêt considérable en tant que médicament dans le monde entier depuis l'Antiquité.Plusieurs études in vitro et in vivo ont mis en évidence les potentiels pharmacologiques de l'ail.

De manière générale, on attribue à l'ail des qualités: antibactérienne, antibiotique, anticancéreuse, hypolipémiante, hypotensive, inhibitrice de l'agrégation plaquettaire, expectorante et immunostimulante. C'est pour ces différentes raisons qu'il serait prescrit lors d'hypertension, d'hypercholestérolémie, de bronchite, de maux de gorge ou lors de calculs urinaires. L'ail aurait aussi des vertus antifongiques et agirait contre les mycoses digestives. Etant donné les nombreuses qualités qu'on lui suppose, l'ail a beaucoup été étudié, Pour essayer de comprendre les capacités médicinales qui lui sont accordées.

Le but de la présente étude était d'étudier dans un premier lieu l'aspect physico chimique de l'extrait d'ail aqueux, par utilisation de la chromatographie liquide à haute performance et infrarouge, on se propose de suivre la stabilité de l'extrait d'ail à différentes températures afin de déterminer les conditions optimales de conservation des composés soufrés responsable des effets thérapeutiques de l'ail, par la suite il sera question d'étudier successivement l'action antibactérienne, antifongique, et antioxydant de l'ail, d'évaluer l'influence de la température de la concentration et de la fermentation sur chacun de ces effets et de comparer les résultats auxquels ont abouti d'autres études.

La première partie dans ce travail est consacrée à une étude bibliographique, dans laquelle nous traitons la présentation de l'ail, ces différents composés, ces vertus thérapeutiques et les différentes techniques analytiques utilisés.

La deuxième partie regroupe l'étude expérimentale ainsi que les résultats et discussions. Une conclusion mettant en exergue les objectifs atteints dans ce travail.

Ce travail se termine par une conclusion générale qui rassemble les résultats trouvés et des perspectives qui peuvent être envisagées dans le future.

II.1. Matière végétale

Le matériel végétal est constitué des bulbes d'ail frais d'une espèce locale (algérienne) cette dernière est récoltée de la région de Berrouaghia de la wilaya de Médéa le mois de septembre en 2012, La plante fraichement récoltée est conservée à l'ombre dans un endroit sec et aéré, l'extrait a été obtenu par écrasement d'une quantité d'ail frais.



Figure II.1. Ail de la région de Berrouaghia(2012).

Les expériences ont été effectuées sur la matière végétaleau complexe antibiotique (SAIDAL) de Médéa.

II.2. Matériels microbiologiques

II.2.1. Micro-organismes testés

Les souches microbiennes testées ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de SAIDAL, nous avons retenu les espèces suivantes citées dans le tableau :

Tableau II.1. Souches microbiennes utilisées**.**

	Souche	***Source***	***Gram***	***Nature***
Souche Bactérienne	***E-coli***	ATCC 1536	Gram négatif	pathogène
	Staphylococcus aureus	ATCC 12228	Gram positif	pathogène
	Bacillus subtilis	ATCC 66 33	Gram positif	non pathogène
Souche fongique	***Candida albicans***	ATCC 10231	Levure	pathogène

II.2.2. Milieu de culture

LesMilieux de culture utilisés pour les tests microbiologiques sontprésentés dans le tableausuivant :

Tableau II.2. Milieux de culture utilisés pour les tests microbiologiques.

Souches	***Milieu***
Souches bactériennes	Soja agar
Souches fongiques	Sabouraud

II.3. Matériels

Le matériel utilisépour l'analyse et l'activité antioxydant sont donné dans le tableau suivant :

Tableau II.3. Matériel utilisé pour l'analyse et l'activité antioxydant.

Manipulation	***Appareillage***	***Marque***
Analyse	Spectrophotomètre UV-visible	Perkin Elmen (precisely) lambda25
	Spectromètre FTIR	Specac/ perkinElmen
	Chromatographie (HPLC)	Shimadzu LC-10AD vp
Activité antioxydant	centrifugeuse	ProgettazionieEcostruzioni-Roma REPERE Y 9516
	Bain marie	ProgettazionieEcostruzioni-Roma REPERE Y 95053

II.4. Choix dusolvant d'extraction

Dans ce type d'extraction, deux types de solvants ont été utilisés,l'eau distillée pour l'obtention d'un extrait aqueux d'ailet le méthanol pour l'obtention de l'extrait méthanoïque.

II.5. Préparation de l'extrait aqueux de l'ail

II.5.1. Matériels et Réactifs

Le matériel et les réactifs utilisés pour la préparation de l'extrait aqueux d'ail sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau II.4. Matériels et Réactifs utilisés.

Matériels	***Réactifs***
✓ Mortier ✓ Bécher ✓ Pipette graduée de 20ml et pro pipette. Opticolor (germany) ✓ Flacon en verre. ✓ Balance numérique. ✓ Spatule. ✓ Compresse. ✓ Entonnoir. ✓ Papier aluminium. ✓ Filtre sous vide vakwmfest(millipore) xx10 04724	✓ Ail frais. ✓ Eau distillée.

II.5.2. Mode opératoire

La préparation de l'extrait aqueux d'ail est basée sur trois étapes essentielles(**écrasement,macération, filtration) :**

- ***Ecrasement* :** Dans un **mortier,** 30g d'ail épluché et écrasé. Et au cours de l'écrasement on ajoute par petite quantités 20ml d'eau distillé.
- ***Macération* :**Dans un flacon en verre menu d'un entonnoir, on fixe une compresse multicouche, puis on met l'ail écrasé dans la compresse et on fait la macération.
- ***Filtration* :** Le macéra obtenu est filtré par la suite sous vide avec un papier filtre de 0.5µm.On met l'extrait aqueux de l'ail filtré dans un flacon en verre Couvert par un papier aluminium, puis exposé par la suite à une température de 8°C à l'abri de la lumière.

La figure suivante résume les trois étapes de la préparation de l'extrait aqueux d'ail

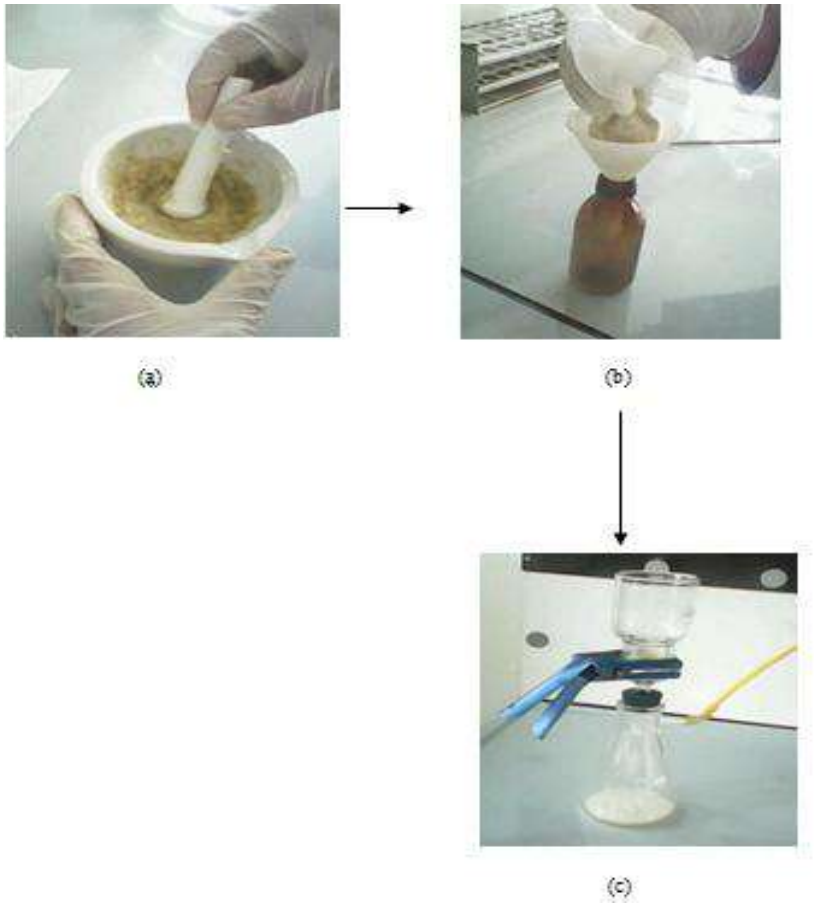


Figure II.2. Etapes de la préparation de l'extrait aqueux d'ail : (a) ecrasement d'ail , (b) macération d'extrait aqueux d'ail, (c) filtration de l'extrait d'ail sous vide à 0,5 µm.

II.6. Détermination approximative du taux d'humidité de l'ail frais utilisé

II.6.1. Mode opératoire

On a épluché les bulbes l'ail puis on met 30g d'ail pure dans un papier aluminium, on l'a placé dans une étuve de 100°C. Puis on procède à la mesure de la masse d'ail après chaque heure.

II.7.Etudes physico-chimiques

Trois techniques d'analysesdifférentes ont été appliquées pour caractériser l'extrait aqueuxd'ail.

II.7.1. Spectrophotométrie UV-visible

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dansles laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineusesde longueur d'onde déterminée.

L'absorbance des composés dans le proche UV et le visible est exploitée en analyse quantitative par application de la loi de Beer-Lambert. La méthode s'applique non seulement aux composés qui présentent une absorption dans le visible mais également aux composés dont un dérivé obtenu par une réaction chimique présente une telle absorption.

Dans ce travail, une spectrophotométrie *Perkin Elmer (precisely)*a été utilisée pour l'obtention de spectre UV –Visible de l'échantillon entre 200 à 400nm.

Les mesures sont faites dans des cuves en quartz avec un trajet optique de 1cm.



Figure II.3. Spectrophotométrie UV-visible[**SAIDAL**]

II.7.2.Spectrométrie infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge (parfois désignée comme spectroscopie IR) est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption. Comme pour toutes les techniques de spectroscopie, elle peut être employée pour l'identification des composés ou pour déterminer la composition d'un échantillon. Les tables de corrélation de spectroscopie infrarouge sont largement présentées dans la littérature scientifique.

Les échantillons liquides peuvent être placés entre deux plaques d'un sel très pur (habituellement le chlorure de sodium, ou sel de table, bien qu'un nombre important d'autres sels comme le bromure de potassium ou le fluorure de calcium soient aussi utilisés). Les plaques sont transparentes à la lumière infrarouge et n'introduisent donc pas de bandes supplémentaires dans le spectre. Cependant, comme de nombreux sels sont très solubles dans l'eau, les échantillons et agents de lavage doivent être anhydres.

Dans ce travail on a préparé la pastille par le KBr. On prend quelques mg de KBr en poudre et on fait le broyage puis on ajoute quelques gouttesde l'extrait aqueux d'ail frais, pour le séchage on vèrse une quantité de chloroforme puis on laisse reposé dans la hott pendant 08 jours.

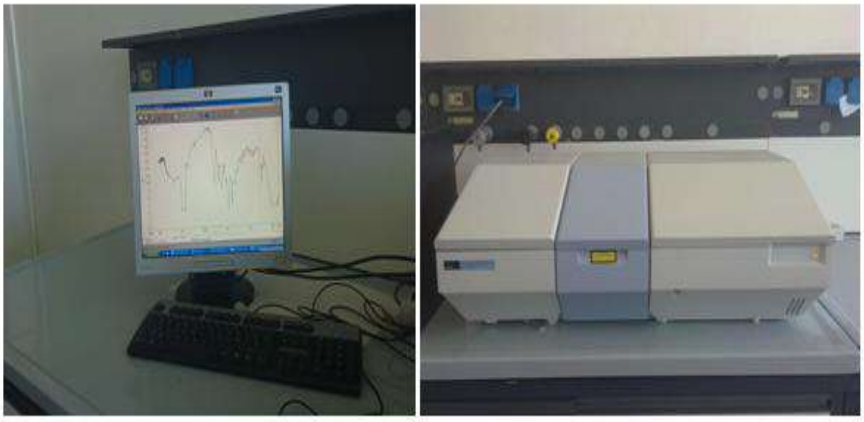


Figure II.4. IR**[SAIDAL].**

II.7.3. Chromatographie en phaseLiquide à Haute Performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), on trouve plus fréquemment l'abréviation anglaise HPLC (high performance liquidchromatography) depuis les années 1990.HPLC est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Pour HP signifie « haute pression».

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelée phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les «grains» sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système.

Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les «grains» qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas). La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation «haute performance».



Figure II.5. HPLC **[SAIDAL].**

II.7.3.1. Conditions d'analyses par HPLC

Les conditions d'analyse par HPLC sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau II.5. Conditions d'analyses par HPLC**[SAIDAL]**

Langueur d'onde	254nm
Colonne	C18
Phase mobile	Acétonitrile /eau 50/50
Température de travail	25°c
Volume injecté	20 µl

- ***Le standard*** **:**l'analyse par HPLCà été faite sur l'alanine pur pour déterminer le temps de rétention de l'alliine.
- ***L'échantillon*** **:**l'analyse par HPLC à été faite sur l'extrait aqueux d'ail.

II.7.3.2.Stabilité thermique de l'extrait d'ail

L'extrait aqueux d'ail est exposé à déférentes températures 8°C, 25°C, 35°C, 100°C puis on fait l'analyse par HPLC.

II.8. Activité antimicrobienne de l'ail

II.8.1. Aromatogramme

L'aromatogrammeest à la phytothérapie ce que l'antibiogramme décrit par la pharmacopée française des antibiotiques est à la médecine .Cette transposition due au Dr M GIRAUT dés 1971, est décrit dans le tome3du traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelé antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques.

cette méthode a l'avantage d'être d'une grand souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale, il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar 1 réalisée dans boite de pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité d'extrait **[DEGRYSE et *al*., 2008].**

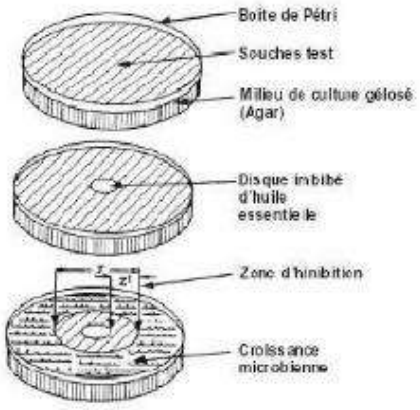


Figure II.6. Schéma illustrant la méthode des aromatogrammes **[DEGRYSE et *al.*, 2008].**

II.8.2. Préparation du milieu de culture

II.8.2.1. Matériels et Réactifs

Le matériel et les réactifs utilisés pour la préparation du milieu de culture sont représente dans le tableau suivant :

Tableau II.6. Matériel et Réactifs utilisés.

Matériels	Réactifs
✓ Balance numérique (**GIBRTINI (made in italy))** ✓ Flacons en verre de 500ml. ✓ Boittes pétrie. ✓ Hotte. ✓ Autoclave (**ThermostabilK2).** ✓ Four. ✓ Pince. ✓ Entonnoir. ✓ Cas roule.	✓ Soja agar. ✓ Eau distillé. ✓ Sabouraud

II.8.2.2. Soja agar pour Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphy-aureus

II.8.2.2. Mode opératoire

Mettre 20g de soja agar poudre en suspension dans un litre d'eau distillé, bien mélanger, chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir pendant1min jusqu'à dissolution complète, répartiret partager la solution entre deux flacons pour éviter la surpression au cours de l'autoclavage, stériliser en autoclave à 121°C pendant 1heurpuislaisser les deux flacons pendant 10min pour refroidissement.

Sous la hotte remplir les boites pétries par le milieu de soja agar et stocker ces boites pétries sous une température de 4°C.



Figure II.7. Préparation des boites pétries dans la hotte.

II.8.2.3.Sabouraud pour les candidas

II.8.2.3.1. Mode opératoire

Mettre 65g de poudre en suspension dans un litre d'eau distillé, bien mélanger, chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir pendant 1min jusqu'à dissolution complète, répartir et partager la solution entre deux flacons pour éviter la surpression au cours de l'autoclavage , stériliser en autoclave à 121°C pendant 1heur puislaisser les deux flacons pendant 10min pour refroidissement.

Sous la hotte coller les boites pétries par le milieu de sabouraud et stocker ces boites pétries sous une température de 4°C

II.8.3. Activité anti bactérienne

II.8.3.1. Détermination de la CMI

Le but de cette méthode est la détermination de la concentration la plus faible de l'extrait aqueux d'ail qui pourrait détruire les micro-organismes ou empêcher leur développement.Cette technique se pratique soit sur milieu solide ou en milieu liquide, mais la plus économique est celle sur milieu solide, qui permet de tester plusieurs souches bactériennes dans la même boîte (il est possible d'ensemencer une trentaine de souches dans une seule boîte par la méthode de touches **[Benjilali B. et al, 1986].**Dansse travail on utilise uniquement le milieu solide.

II.8.3.1.1. Matériels et Réactifs

Le matériel et les réactifs utilisés pour la détermination de la CMI sont représentes dans le tableau suivant :

Tableau II.7. Matériels et Réactifs utilisés.

Matériels	Réactifs
✓ Boites pétries de soja agar (1000mm). ✓ Tubes à essais. ✓ Seringue de 5ml. ✓ Ecouvillons. ✓ Bec benzène. ✓ Disques (9mm). ✓ Pince. ✓ Etuve de 35°C.(labco) ✓ Etuve de 25°C.(labco) ✓ Appareil pour mesure de diamètre.	✓ Extrait aqueux d'ail à 8°C. ✓ Eau distillée. ✓ Eau physiologique.

II.8.3.1.2. Mode opératoire

L'étude de l'influence de la concentration sur l'activité antibactérienneestbasée sur quatre étapes :

II.8.3.1.2.1. Dilution : On met 2 ml de l'extrait aqueux d'ail dans un tube à essai puis on fait une dilution de 50% ensuite onrépété l'opération jusqu'à la 5èmedilution,les tubes sont exposé sous une température 8°C.

La figure suivante représente les déférentes étapes de la dilution de l'extrait aqueux d'ail frais.

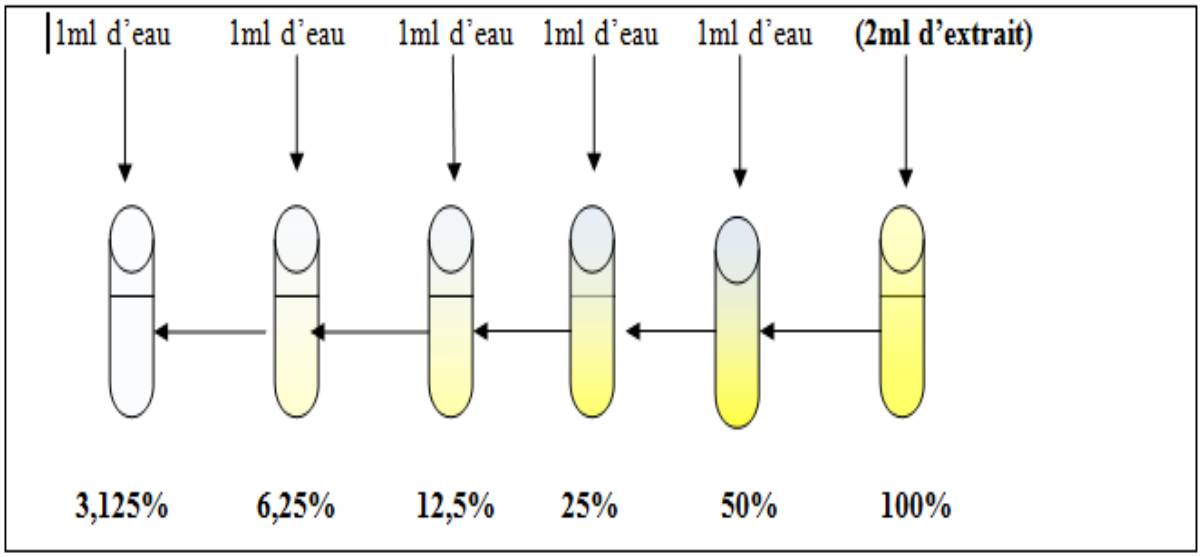


Figure II.8. Étapes de la dilution de l'extrait aqueux d'ail.



Figure II.9. Tubes de dilution (50%)

II.8.3.1.2.2. Ensemencement par écouvillonnage : On a Stérilisé l'écouvillon dans la flamme de bec benzène puis on prend une quantité de la souche bactérienne, on l'a rince dans le flacon de l'eau physiologique, on a bienHomogénéiséla solution ensuite on fait l'ensemencement par écouvillonnage dans les 06 boites pétries pour chaque souche (stérilisation de l'écouvillon et le flacon avant chaque ensemencement). **(Figure II.10.)**

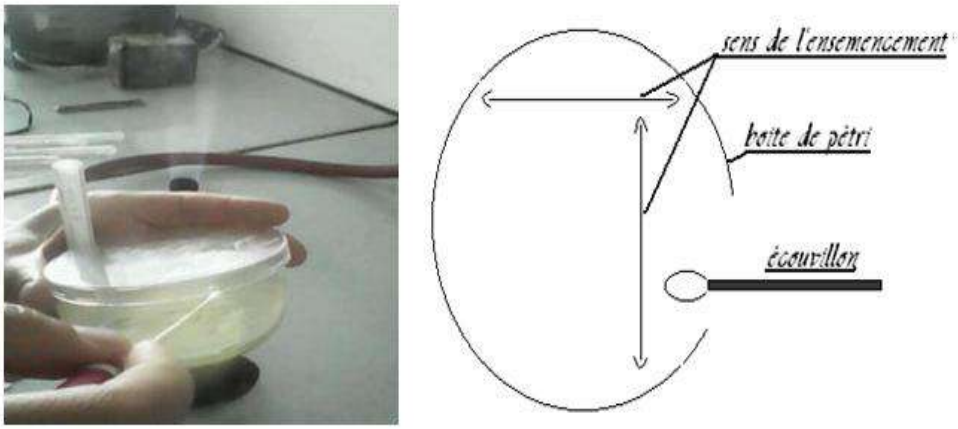


Figure II.10. Ensemencement par écouvillon.

II.8.3.1.2.3. Application des disques : Alaide d'un pince stérilisé, on fait absorbé le disque par l'extrait aqueux d'ail par phénomène de capillarité à partir de première tube, le disque est placé par la suite dans le centre de la boite pétrie de la 1^{ére} souche, on refait l'opération pour les 06 dilutions et pour les deux autres souches.

II.8.3.1.2.4. Incubation : OnFait l'incubation des boites pétries dans l'étuve à35°C pendant 24heurs.

II.8.3.1.2.5. Lecture: Elle consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée.

II.8.3.2. Influence de la température

II.8.3.2.1. Mode opératoire

- **1ère étape :**On prend une quantité d'extrait d'ail de la 1ère dilution puis on l'à subdivise sur 4 tubes à essais exposé comme suite:
  - ✓ 1er tube dans un frigo à 8°C ;
  - ✓ 2ème tube dans une étuve à 25°C ;
  - ✓ 3ème tube dans une étuve à 35°C ;
  - ✓ 4ème tube dans un bain Marie à 100°C.
- **2ème étape :Ensemencement et application des disques :** On a Fait l'ensemencement de chaque souche bactérienne dans les quatre boites pétries. À l'aide d'un pince stérile, on fait absorbé le disque par l'extrait aqueux d'ail par phénomène de capillarité à partir du premier tube, le disque est placé par la suite dans le centre de la boite pétrie de la 1ére souche, on Refait l'opération pour les autres températures et pour les deux souches restantes.
- **3ème étape : Incubation :**L'incubationdes boites pétries est faite dans l'étuve à 35°C pendant 24heurs.
- **4ème étape : Lecture :**Elle consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée.

II.8.4. Activité antifongique

II.8.4.1. Influence de la concentration

II.8.3.1.1. Matériels et Réactifs

Le matériel et les réactifs utilisés pour la détermination de la CMI sont représente dans le tableau suivant:

Tableau II.8. Matériels et Réactifs utilisés.

Matériels	Réactifs
✓ Boites pétries de sabouraud (milieu de culture). ✓ Tubes d'essais. ✓ Seringue de 5ml. ✓ Ecouvillon ✓ Bec benzène. ✓ Disques. ✓ Pince. ✓ Etuve de 25°C. ✓ Appareil pour la mesure de diamètre	✓ Extrait aqueux d'ail à 8°C. ✓ Eau distillée. ✓ Eau physiologie

II.8.3.1.2. Mode opératoire

L'étude de l'influence de la concentration sur l'activité antifongique est basée sur quatre phases :

II.8.3.1.2.1. Dilution : On met 2 ml de l'extrait aqueux d'ail dans un tube à essai puis on fait une dilution de 50% ensuite on répété l'opération jusqu'à la 5ème dilution, les tubes sont exposéssous une température de 8°C.

II.8.3.1.2.2. Ensemencement par écouvillonnage : On a Stérilisé l'écouvillon dans la flamme de bec benzène puis on prend une quantité de *candida albicans*,onl'a rince dans le flacon de l'eau physiologique, on abienHomogénéisé la solution ensuite on fait l'ensemencement par écouvillonnage dans les 04 boites pétries pour cette souche (stérilisation de l'écouvillon et le flacon avant chaque ensemencement).

II.8.3.1.2.3. Application des disques : A laide d'un pince stérilisé, on fait absorbé le disque par l'extrait aqueux d'ail par phénomène de capillarité à partir du premier tube, le disque est placé par la suite dans la boite pétrie delasouche, on Refait l'opération pour les 06 dilutions.

II.8.3.1.2.4. Incubation: On a fait l'incubation des boites pétries dans l'étuve à 25°C pendant 24heurs.

II.8.3.1.2.5. Lecture: Elle consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée.

II.8.3.1.3. Influence de la température

II.8.3.1.3.1. Mode opératoire

Pour étudier l'influence de la température sur l'activité antifongique il faut baser sur les étapes suivantes:

- **1ère étape :**On prend une quantité d'extrait d'ail de la 1ère dilution puis on l'à subdivise sur 4 tubes à essais exposé comme suite:
  - ✓ 1er tube dans un frigo à 8°C ;
  - ✓ 2ème tube dans une étuve à 25°C ;
  - ✓ 3ème tube dans une étuve à 35°C ;
  - ✓ 4ème tube dans un bain Marie à 100°C.

- **2ème étape :Ensemencement et application des disques :** On a Fait l'ensemencement de *candida albicans* dans les quatre boites pétries. À l'aide d'un pince stérile, on fait absorbé le disque par l'extrait aqueux d'ail par phénomène de capillarité à partir du premier tube, le disque est placé par la suite dans le centre de la boite pétrie de la souche, on refait l'opération pour les autres températures.
- **3ème étape : Incubation :** On a fait l'incubation des boites pétries dans l'étuve à25°c pendant 24heurs.
- **4ème étape : Lecture :**Elle consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée.

II.9.Activité antioxydante de l'extrait méthanoliqued'ail(détermination du pouvoir réducteur)

Les antioxydants, sont des composés qui protègent les cellules du corps des dommages causés par les radicaux libres. Ces derniers sont des molécules très réactives qui seraient impliquées dans le développement des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement.

II.9.1.Principe

Le pouvoir réducteur, mesure la capacité qu'a un antioxydant à donner un électron **[Balasundram N etal., 2005].** La détermination du pouvoir réducteur est réalisée selon la méthode d'OKTAY **[OKTAY et al., 2003]**.

La réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}), est mesurée par l'intensité de la solution bleue vert qui en résulte. Celle-ci absorbe à une longueur d'onde de 700 nm. Une augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé **[Balasundram N et al., 2005].**

II.9.2. Préparation de l'extrait méthanolique de l'ail

II.9.2.1. Matériels et Réactifs

Le matériel et les réactifs utilisés pour la préparation de l'extrait méthanoliquesont représente dans le tableau suivant :

Tableau II.9. Matériel et Réactifs utilisés.

Matériels	Réactifs
✓ Mortier. ✓ Becher. ✓ Pipette graduée de 20ml et pro pipette. ✓ Flacon en verre. ✓ Balance numérique. ✓ Spatule. ✓ Compresse. ✓ Entonnoir. ✓ Papier aluminium.	✓ Ail frais. ✓ Méthanol.

II.9.2.2. Mode opératoire

Les étapes suivantes sont utilisées pour la préparation de l'extrait méthanolique d'ail :

- ***Ecrasement* :** Dans un **mortier,** 30g d'ail épluché et écrasé. Et au cours de l'écrasement on ajoute par petite quantités 65ml de méthanol**.**
- ***Macération* :**Dans un flacon en verre menu d'un entonnoir, on fixe une compresse multicouche, puis on met l'ail écrasé dans la compresse et on fait la macération.
- ***Filtration* :** Le macéra obtenu est filtré par la suite sous vide avec un papier filtre de 0.5micro mètre.On mit l'extrait méthanolique de l'ail filtré dans un flacon en verre Couvert par un papier aluminium, puis exposé par la suite à une température de 8°C à l'abri de la lumière.



Figure II.11. Filtration à l'aide d'un papier filtre (0.5µm).

II.9.3. Influence de la concentration sur l'activité antioxydante

II.9.3.1.Matériels et réactifs

Le matériel et les réactifs utilisés pour étudier l'influence de la concentration de l'extrait méthanoliquesur l'activité antioxydante sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau II.10. Matériels et Réactifs utilisés.

Matériels	Réactifs
✓ Tubes d'essais ✓ Bain Mare ✓ Centrifugeuse ✓ Seringue ✓ Filtre de 0,22µm	✓ Eau distillée ✓ Extrait méthanolique l'ail ✓ Tampon phosphate 0.1M (pH=6.6) ✓ TCA 10% ✓ Ferricyanure de potassium 1% ✓ Chlorure de fer 0.1% ✓ Acide ascorbique 0.5 g/ ml.

II.9.3.2. Mode opératoire

II.9.3.2.1. Préparation des solutions aqueuses

Les solutions aqueusesutilisées sont préparéesselon le tableau suivant :

Tableau II.11. Préparation des solutions utilisées

Solution	Masse (mg)	Volume d'eaux distillées (ml)
Tampon phosphate 0.1M (pH=6.6)	780	50
TCA 10%	5000	50
Ferricyanure de potassium 1%	500	50
Chlorure de fer 0.1%	50	50
Acide ascorbique	50	100

II.9.3.2.2. Dilution

On a mit 10 ml d'extrait méthanolique d'ail dans un tube à essai puis on fait une dilution de 50%par le méthanol, l'opération est répété jusqu'à la 5ème dilution, les tubes sont exposées sous une température de 8°C.

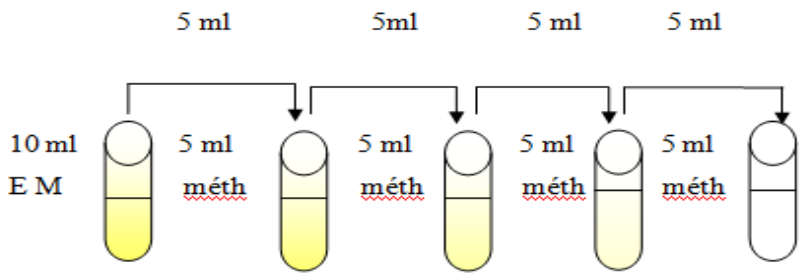


Figure II.12. Étapes de dilution de l'extrait méthanolique d'ail (EM).

II.9.3.2.3. Protocole d'OKTAY

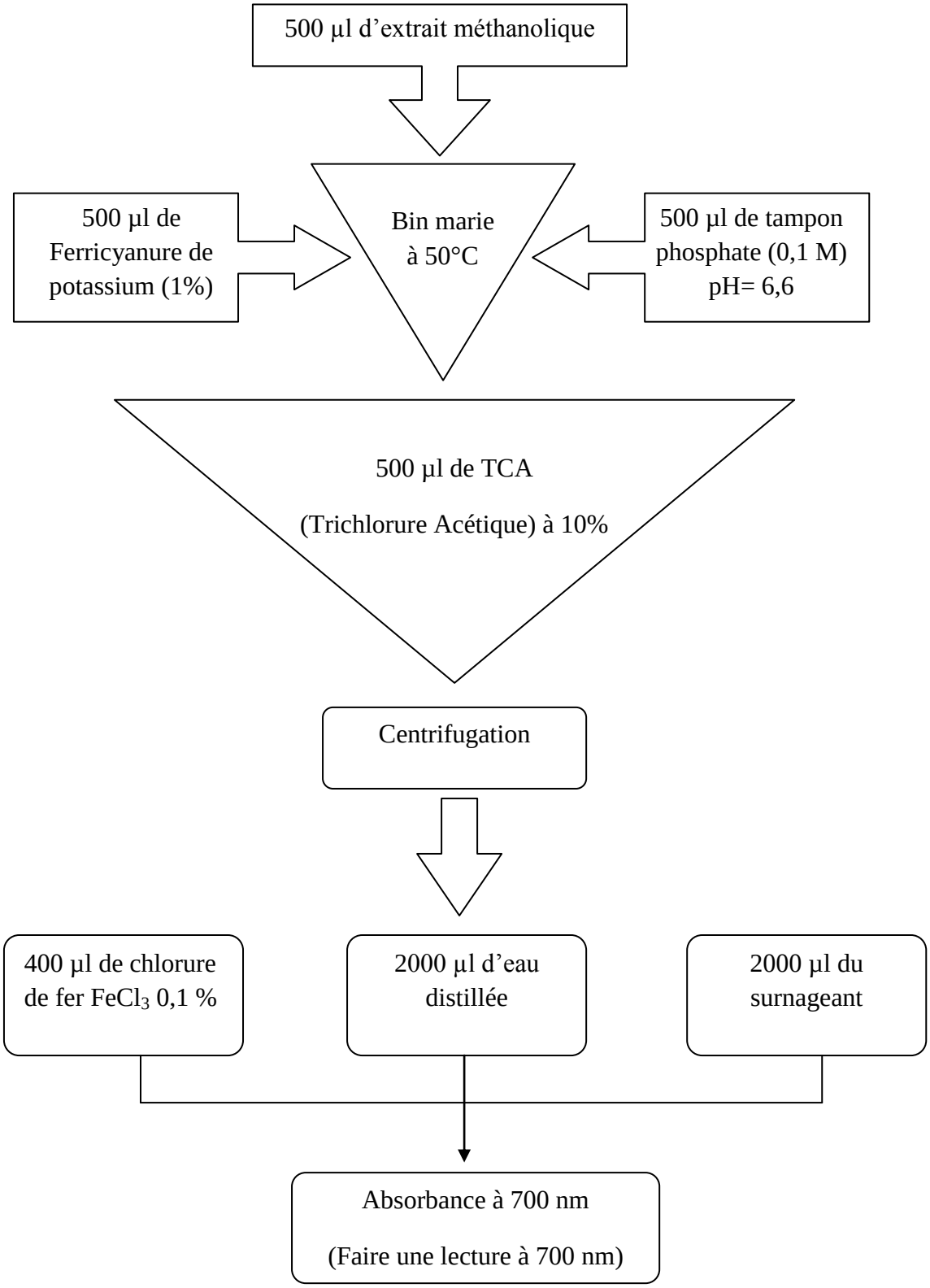


Figure II.13. Protocole de détermination du pouvoir réducteur **[OKTAY *et al.*,2003].**

- Pour le blanc : il est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée.
- Pour le méthanol : il est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par du méthanol.

- Refaire lemêmeprotocolepourtoutes les dilutions



Figure II.13. Dilution (50%).

II.9.3.2.3. Acide ascorbique

Par la suite, on a essayé de comparer le pouvoir réducteur du l'ail par un antioxydant utilisé en industrie alimentaire, c'est l'acide ascorbique (Vitamine C).

Pour cela on a utilisé une concentration de 0,46g/ml d'acide ascorbique, on fait la dilution jusqu'à 0.0625g/ml, ensuite on à suivie le même protocole que le premier test, sauf pour la longueur d'onde, l'acide ascorbique absorbe mieux à 686 nm.

II.9.4. Influence de la température

II.9.4.1.Mode opératoire

On introduit dans 4 tubes à essai 2ml de l'extrait méthanolique d'ail (0.46g/ml), exposé par la suite à déférentes températures (8°C ,25°C, 35°C, 100°C), on suit le même protocole précédant pour l'étude de l'activité antioxydante**(**Le protocole d'OKTAY).

II.10. Fermentation de l'ail

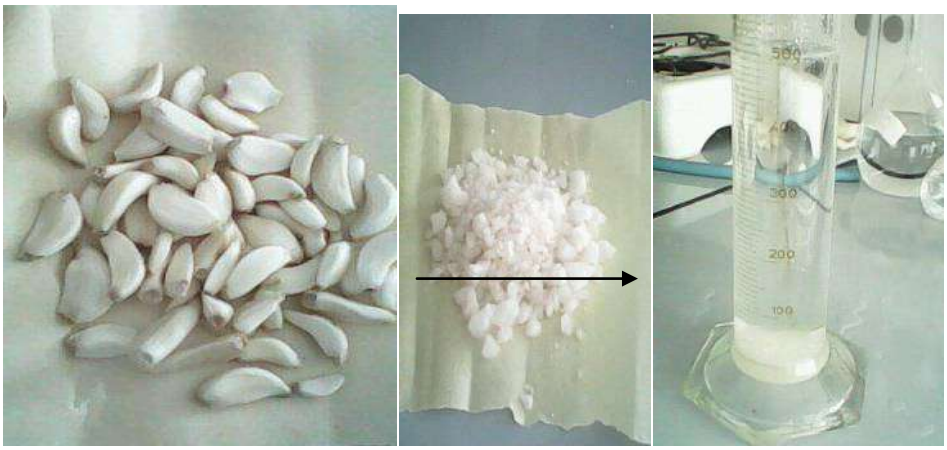
II.9.3.1. Matériels et Réactifs

Le matériel et les réactifs utilisés pour la fermentation de l'ail sont représentés dans le tableau suivant :

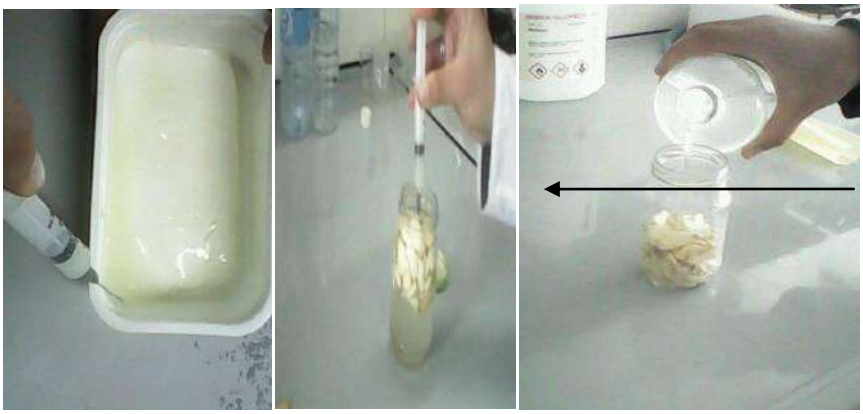
Tableau II.11. Matériels et Réactifs utilisés.

Matériels	Réactifs
✓ Flacon en verre ✓ Seringue de 5ml ✓ Balance numérique	✓ Ail frais (51.05 g) ✓ Eau distillé (500ml) ✓ Sel gras (15g) ✓ Lacto -sérum de lait

II.9.3.2.Mode opératoire



- Éplucher les bulbes l'ail. Préparer la saumure (15 g dans 500 ml)
- Peser l'ail pur à l'aide d'une balance numérique.
- Laisser l'ail entiers (bulbes) ou coupés en morceaux,



- Ensemencer avec le petit-lait Remplir le récipient de l'ail et



- Couvrir avec la saumure
- Fermer et conserver le récipient dans une étuve à 25°C

Figure II.14. Protocole de la fermentation de l'ail.

II.9.3.3. Influence de la fermentation sur l'activité antimicrobienne

La fermentation de l'ail à été faite durant 14jours, pendant des périodes bien définie on fait l'extraction de 7.5g d'ail fermenté avec 5ml d'eau distillé froid pourpréparé un extrait aqueux de concentration 1.5 g /ml.Étudier par la suite l'activité antibactérienne de l'ail fermenté pour les trois souches *E.coli, staphy-aureus, bacillus* et l'activité antifongique pour *candida albicans*.

La figure suivante représente le protocole de préparation de l'extrait aqueux d'ail fermenté à une concentration de 1,5g/ml.

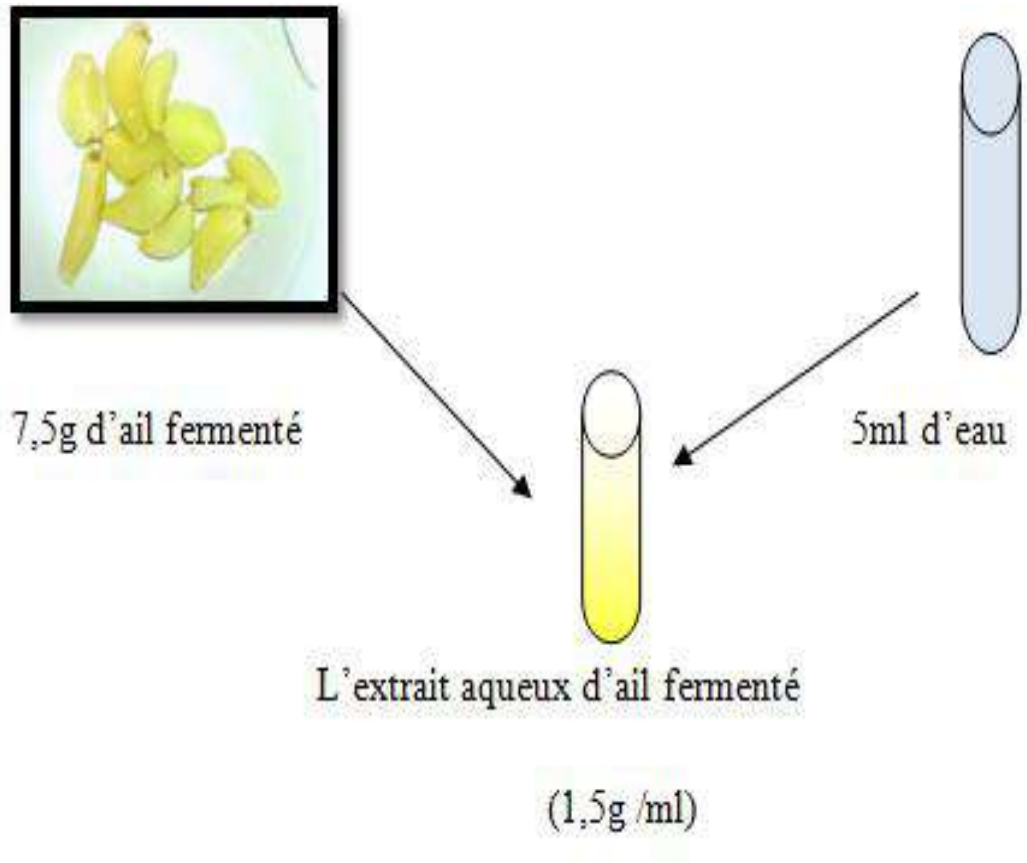


Figure II.15. Protocolede la préparation de l'extrait aqueux d'ail fermenté à une concentration 1,5g/ml.

II.9.3.4. Influence de la fermentation sur l'effet anti oxydant

durant 14 jours de fermentation de l'ail et pendant des périodes bien définie on fait l'extraction de 4 .615g d'ail fermenté avec 10ml deméthanolfroid dans le but de préparer un extrait méthanolique de concentration 0.46 g /ml pour étudier par la suite l'activité antioxydante de l'extraitméthanoliqued'ail fermenté.

La figure suivante représente le protocole de préparation de l'extrait méthanolique d'ail fermenté à une concentration de 0,46g/ml.

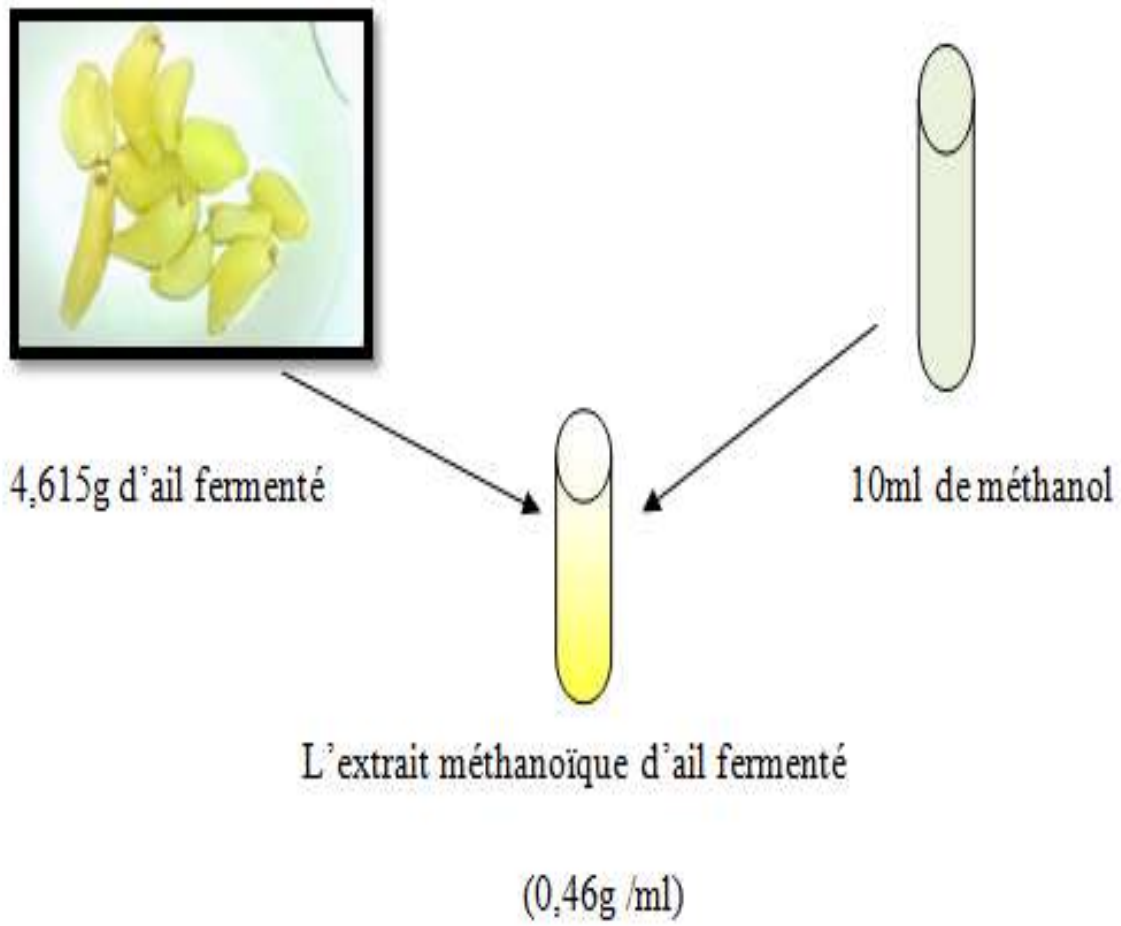


Figure II.16. Protocolede la préparation de l'extrait méthanolique d'ail fermenté à une concentration 0,46g/ml.

I.1. Etude botanique

I.1.1. Classification

L'ail est une plante monocotylédone. Il appartient à l'ordre des *Liliales***,** à la famille des *Liliacées* et au genre Allium. Le nom botanique de l'ail commun est *Allium sativum L.*

[Girre L., 1980] «Allium» provient du celtique «AlI» qui signifie «brûlant», en raison des propriétés de la plante et de la saveur de son bulbe et «sativum» signifie «cultivé». Il est également dénommé «Thériaque des Pauvres» ou «Kigmen» en Bretagne**. [Girre L., 1980]**

I.1.2. Distribution géographique

L'ail est originaire d'Asie Centrale **[Anonyme, 1991, 1942; Garnier et al., 1961]**. De là, il passera en Egypte puis dans le bassin méditerranéen. Aujourd'hui, sa culture est largement répandue en Europe. Il croît sans intervention humaine en *Sicile, en Espagne, en Egypte* et en *Algérie* **[Daif N., 1993 ; Girre L., 1980].** En France, il est cultivé en Limagne, dans les régions du Sud-Ouest et de la vallée de la Loire **[Delaveau et P., 1982]**. Sa culture peut se faire à partir de bulbilles situés dans l'inflorescence ou à partir des fragments du bulbe (caïeux) **[Delaveau, P., 1982].**

I.1.3. Description botanique

Il s'agit d'une *plante herbacée, vivace* par l'intermédiaire d'un bulbe ou « tête d'ail**»** **[Delaveau P., 1982].** Elle est représentée dans la figure I.1. Son odeur est forte et piquante **[Garnier G. et al., 1961].**Sa tige est creuse et peut atteindre 50 cm de hauteur **[Girre et L., 1980].** Ses feuilles sont linéaires, engainantes à limbe allongé, plat, étroit, atténué, en pointe.

Les feuilles renversées et tombantes naissent toutes du bulbe. Elles sont de plus en plus longues et emboîtées les unes dans les autres, pouvant atteindre le milieu de la tige **[Garnier G. et al., 1961].** La tige se termine par des fleurs blanchâtres ou rosées, largement pédonculées, groupées, mêlées à des bulbilles en ombelles simples terminales, renfermées avant la floraison dans une spathe membraneuse, munie d'une pointe très longue et ne persistant pas **[Bruneton J., 1999].**

La fleur est composée de 3 sépales et de 3 pétales libres persistants, de 6 étamines plus courtes que le périanthe et disposées en 2 verticilles. Les filets des étamines internes sont dilatés, élargis à 3 pointes égales au sommet, la pointe médiane portant seule l'anthère. L'anthère introrse est oblongue et fixée par le dos **[Garnier G. et al, 1961].** Après féeondation, il y a formation d'une capsule triangulaire, libre à 3 loges avec 2 ovules par loge.

Les graines sont anguleuses et comprimées, noires et à albumen chamu **[Garnier G. et al., 1961].**

Le style est mince et persistant, le stigmate quant à lui est petit.



Figure I.1. Photographie de l'ail (plante entière) et des fleurs *(d'après **(International Research Institute of the Tibetan Medicine (page consultée le 5 avril 2005))** en biblio)*

I.1.4. La drogue

C'est le bulbe ou «tête d'ail». Il a une odeur caractéristique **[Girre L., 1980; Girre L., 2001].** Il est utilisé depuis l'Antiquité comme antiseptique. Il foumit, après cryodessiccation ou séchage à une température inférieure à 65°C, la poudre d'ail officinale (Ph. Eur., 3ème édition, add 1998) **[Bruneton J., 1999]**. La poudre contient au minimum 0,45 % d'allicine **[Bruneton J., 1999]**.

Le bulbe entier est composé d'une dizaine de caïeux (bulbilles) improprement appelés «gousses», insérés sur un axe aplati portant des restes membraneux de feuilles. Les feuilles extérieures forment une enveloppe particulière à chacun des caïeux nés à leur aisselle. Les caïeux sont blanchâtres ou rosés, ovoïdes, oblongs, comprimés latéralement et un peu arqués. Ils forment une masse charnue enveloppée d'une tunique propre, plus ou moins résistante et cartilagineuse.



Figure I.2. **Bulbe** d'ail *(d'après **(PROTEUS (page consultée le 5 avril 2005))** biblio)*

I.2. Etude chimique

I.2.1. Analyse quantitative des composés contenus dans l'ail

Les parties comestibles contiennent **[Garnier G. et al., 1961]:**

- 64,66 % d'eau.
- 6,76 % de substances azotées.
- 0,06 % de lipides.
- 26,3 % de substances extractibles non azotées.
- Sucre.
- 0,77 % de substances de membrane.
- 1,44 % de cendres (avec chaux ct silice).

Le bulbe contient **[Aouadi R. et al, 2000]:**

- manganèse (17,84 mg/kg de matière sèche).
- cuivre (10,23 mg/kg de matière sèche).
- zinc (31,7 mg/kg de matière sèche et 10,0 mg/kg de matière fraîche).
- aluminium (36 mg/kg de matière sèche et 19,9 mg/kg de matière fraîche).
- brome (0,00051 g % de poids sec).
- chlore (0,066 g % de poids sec).

Il a été aussi prouvé que l'ail est capable de fixer d'importantes quantités d'iode **[Grun-Thomas S., 1998].**

Les glucides contenus dans les bulbes à maturité se répartissent en :

- 1,2 % de sucres réducteurs.
- 3,6 % de saccharose.
- 75 % d'un fructosane appelé fructosane 5 (=glucofructosane) [**Garnier G. et al, 1961].**

Les caïeux donnent de 0,680 à 0,750 % d'huile essentielle (en % du poids sec) **[Garnier G. et al, 1961].**

Les tiges fournissent 0,665 à 0,720 % d'huile essentielle par expression **[Garnier G. et al., 1961].**Par distillation, seulement 0,05 à 0,09 % d'huile essentielle est obtenue. L'huile essentielle d'ail est jaune, d'odeur forte et désagréable et de saveur brûlante **[Delaveau P ., 1982].**

I.2.2. Analyse qualitative des composés contenus dans l'ail

Comme nous l'avons vu précédemment, le bulbe d'ail renferme des sucres (fructanes), des saponosides (hétérosides de furostanols : sativosides, proto-éruboside-B etc.) **[Bruneton et J., 1999; Delaveau P., 1982].** Mais les composés les plus connus qui le composent sont les *dérivés soufrés***.** Le composant principal de l'ail frais non contusé est *l'alliine* ou sulfoxyde de S-allyl-L-(+)-cystéine.C'est un composé sulfuré stable sans odeur qui a été isolé en 1948 par Arthur Stoll et Erwald Seebeck **[Grun-Thomas S., 1998].**

Le bulbe d'ail en contient en moyenne de **0,35 % à 1,15** % **[Wichtl M. et Anton R., 2003]** et jusqu'à 1,8 %. Lorsque les tissus sont blessés, l' alliine est transformée par une enzyme, **l'allinase** (= S-alkyl-L-cystéine sulfoxyde lyase), en acide pyruvique et acide 2propènesulfènique, qui sera immédiatement transformé en *allicine* (0,3 % de la masse fraîche) **[Anonyme T., 1991, 1942 ; Delaveau P., 1982 ; Grun-Thomas S., 1998; Girre L., 2001]**. L'allicine (ou allyl-2 propènethiosulfate) a été isolée pour la première fois en 1944 par Chester 1. Cavallito à partir d'un extrait aqueux d'ail frais.

C'est un composé sulfuré, instable et odorant (odeur de l'ail fraîchement coupé) aux propriétés antibactériennes **[Grun-Thomas S., 1998].** Il se décompose, selon la température et les conditions du milieu en composés soufrés volatiles et fortement aromatiques **[Wichtl M. et Anton R., 2003].**

D'autres précurseurs sont également retrouvés: la *cycloalliine* et la *méthylalliine* qui sont décomposés en trisulfure de méthylalliine **[Delaveau P., 1982].**

L'oxydation par l'air de l'allicine conduit au 1,7-dithiaocta-4,5-diène, ou *disulfure de diallyle* (6 % de la masse sèche **[Garnier G. et al, 1961]** : c'est lui qu'on retrouve majoritairement dans l'«essence» d'ail **[Delaveau P., 1982 ; Grun-Thomas S., 1998].** On retrouve également divers vinyldithiines provenant de la cycloaddition du propènethial par exemple **[Wichtl M. et Anton R., 2003].**

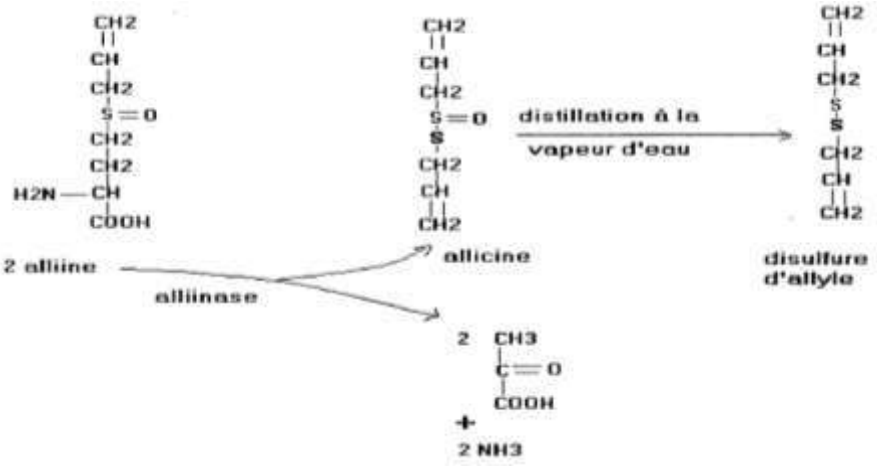


Figure I.3. Transformation de l'alliine en allicine et de l'allicine en disulfure d'allyle.

En analysant les extraits alcooliques d'ail, on retrouve la présence de produits de condensation de l'allicine, les *6Z- et 6E-ajoènes* (4, 5, 9-trithiadodéca-1, 6, 11-trièn-9-Soxyde) et de produits de cycloaddition du propènethial (vinyldithiines) [**Anderson J.W. et al, 2000].** Les ajoènes sont des produits obtenus secondairement par dégradation de l'allicine. L'ajoène est formé par condensation de 3 molécules d'allicine. Dès que l'ail est coupé, il y a formation de dérivés cis et trans de l'ajoène.

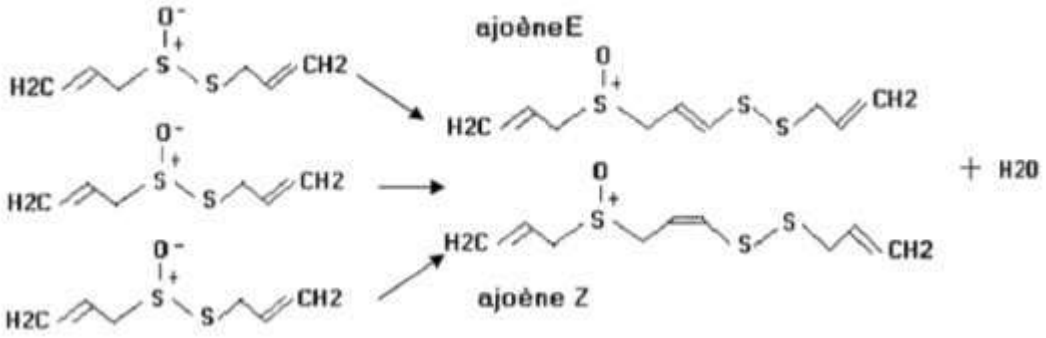


Figure I.4. Formation des ajoènes.

De nombreux composés identifiés en CPG dans les diverses «essences» d'ail ne sont que des artefacts. Ceci a été confirmé par l'analyse en CLHP des produits obtenus par simple distillation sous vide poussé et à température ambiante: il n'a été trouvé que des thiosulfinates R-S(O)-R' ; l'allicine (R=R'=allyl) étant le composé majoritaire (80-90%). La figure I.5 récapitule les différents traitements pouvant être appliqués à l'ail et les produits obtenus. La figure I.6 reprend les différentes molécules retrouvées dans l'ail.

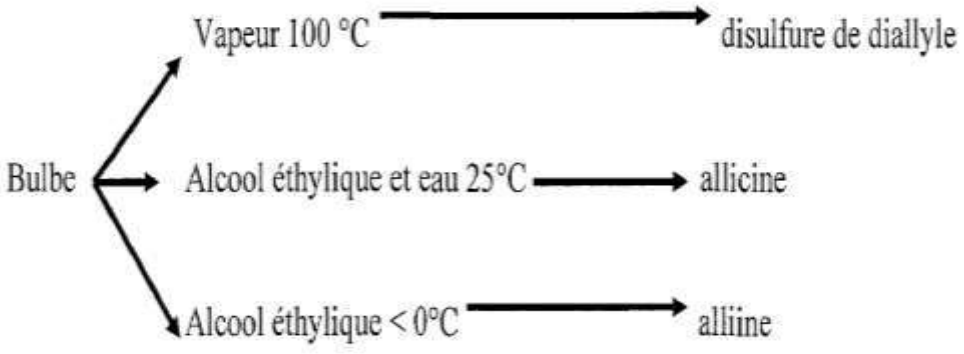


Figure I.5. Différents traitements appliqués à l'ail et produits obtenus.

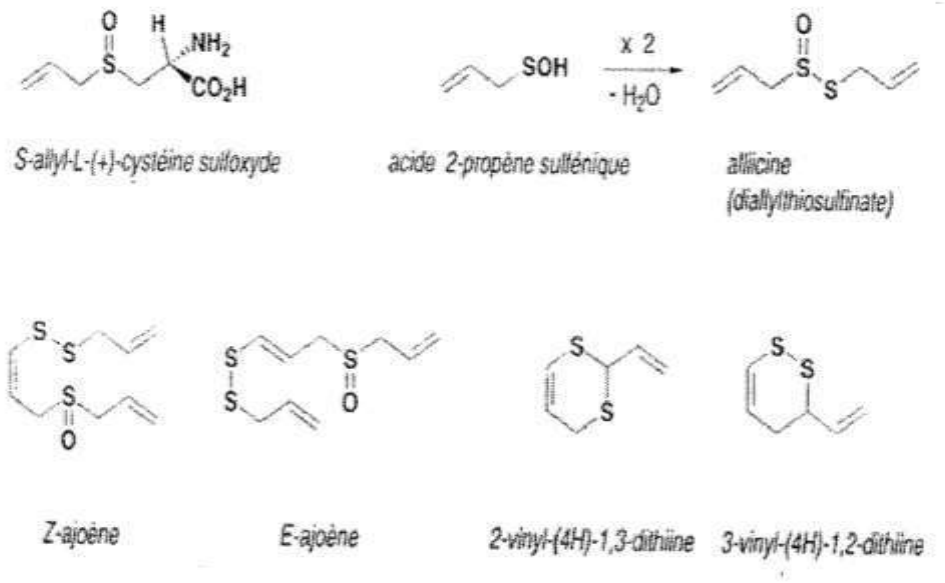


Figure I.6. Récapitulatif des principales molécules présentes dans l'ail *(d'après* **[Bruneton J., 1999]** *en biblio).*

L'ail contient également des biocatalyseurs : hormones sexuelles mâles et femelles, des lectines, des prostaglandines, oxydases, peroxydases (tyrosinase, catalase), des vitamines (vitamine A, vitamines BI, B2, B6, vitamine P et vitamine C), des acides gras, des glycolipides, des phospholipides, des anthocyanines, des flavonoïdes, de l'acide phénolique et des acides aminés essentiels ***[Bruneton J., 1987].*** On retrouve jusqu'à 127 mg de vitamine C pour 100 g de feuilles sèches **[Garnier G. et al., 1961].**

L'huile essentielle contient de l'allicine, des sulfides, des diallyles, divers ferments, de la vitamine Al, BI, B2 et du nicotylamide **[Schauenberg P., 1977].**

De plus, l'ail renfermerait une substance à réaction alcaloïdique.

I.2.3. Identification

Elle se fait par microscopie (présence d'un parenchyme à grandes cellules avec quelques vaisseaux spiralés et annelés) et au moyen de la chromatographie sur couche mince **[Khalili B. et al, 2003].**

Chromatographie sur Couche Mince:

- ✓ Support: gel de silice 60 F254.
- ✓ Solution à examiner: Mélanger 1,0 g de poudre d'ail avec 5 mL de méthanol, agiter environ 1 minute et filtrer. Le filtrat sert de solution à examiner.

- ✓ Solution de référence: dissoudre en chauffant 5 mg d'Alanine dans 5 mL de méthanol et avec quelques gouttes d'eau.
- ✓ Dépôts: 20 ul. de solution à examiner et 10ul, de solution de référence
- ✓ Solvants d'élution : Ethanol-isopropanol-eau-acide acétique glacial (8 : 4 : 4 :4)
- ✓ Développement: 8 cm Durée: 60 min environ
- ✓ Détection et interprétation: après évaporation complète du solvant, pulvériser une solution à 0,2 % de ninhydrine dans un mélange isopropanol-acide acétique glacial (95 : 5) et chauffer pendant 5 min à 120 °C.
- ✓ Solution de référence: Alanine (Rf 0,55 ; rouge-violet)
- ✓ Solution à examiner: Alliine (Rf environ 0,51) accompagnée d'autres zones rougeâtres, moins intenses
- ✓ Falsification: pratiquement inexistantes
- ✓ **Pharmacopée européenne:** Identification par CCM

Dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance utilisant le parahydroxybenzoate de butyle comme étalon interne

I.3.Etude pharmacologique

I.3.1. Historique et emplois

Depuis l'Antiquité et au Moyen-âge, l'ail est employé comme condiment cru ou cuit **[Paris R., et Moyse H., 1976-1981].** Il est connu depuis le plus haute Antiquité. Les constructeurs des pyramides consommaient beaucoup d'ail et l'avait élevé au rang de divinité! Les Hébreux l'introduisirent en Palestine. Les Grecs et les Romains en faisaient grand usage pour diminuer la fatigue **[Kasuga S. et al, 2001]** et les Croisés le ramenèrent en France. Dans les temps anciens, on l'utilisait comme remède pour les *désordres intestinaux, flatulences, les vers, les infections respiratoires***,** les *maladies de la peau***,** les *blessures* et les *symptômes de l'âge* **[Amagase H. et al, 2001].** Il a été également utilisé comme *antiseptique* contre diverses maladies (peste, choléra...), comme *diurétique et vermifuge.* Il a été employé dans le soin des blessures durant la deuxième Guerre Mondiale **[Amagase H. et al, 2001].**

De nos jours, il est employé comme *antiseptique pulmonaire et intestinal,* contre *les Oxyures* et comme *hypotenseur.* Différentes formes sont utilisées: 1'huile, les extraits, la macération, les poudres et les dragées **[Schauenberg P., 1977 ; Amagase H. et al, 2001].** En homéopathie, il est utilisé sous forme de teinture de bulbe frais **[Schauenberg P., 1977].**

I.3.2. Propriétés diverses

I.3.2.1. Propriétés antiseptiques, antibactériennes, antivirales, antifongiques, Antiparasitaires

L'ail est un *excellent antiseptique***,** il peut être utilisé comme antiseptique intestinal **[Daif N., 1993; Valnet J., 1982].** Il a des propriétés bactéricides (l'activité bactéricide a été découverte par *PASTEUR* en 1885 ***[*Grun-Thomas S., 1998]** et bactériostatiques **[Wichtl M. et Anton R., 2003].** Il a été montré que le jus d'ail dilué 125000 fois avait des propriétés inhibitrices sur le développement des *Staphylocoques,* de *Streptocoques,* des *Vibrio,* des *Bacillus* et une activité sur certains champignons zoopathogènes et de nombreuses levures **[Daif N., 1993].**

Il a prouvé son *activité antifongique* **[Wichtl M. et Anton R., 2003]** sur *Microsporum, Tricophyton, Condida, Cryptococcus* et *Aspergillus* **[Daif N., 1993].** Les études de l'Institut des Plantes Médicinales de Poznan (Pologne) ont montré son action importante sur les dermatophytes **[Grun-Thomas S., 1998].** En Chine, l'ail est utilisé depuis 1964 pour ses *propriétés antivirales* dans le traitement de la *méningite encéphalite virale aiguë* et de la *méningite* à *Cryptococcus* **[Grun-Thomas S., 1998].** Il a fait preuve de *propriétés antihelminthiques,* cette activité proviendrait du pouvoir de pénétration de l'essence d'ail à travers les téguments. Les principes volatils et excitants que répand l'ail dans le tube digestif semblent tuer tous les vers qui s'y trouvent et conduisent à leur ***expulsion*** **[Leclerc H., 1976 ; Schauenberg P., 1977 ; Wichtl M. et Anton R., 2003].**

Le principe actif antifongique et bactéricide serait *l'allicine.* Son pouvoir bactéricide est égal au centième de celui de la pénicilline.

Les ajoènes auraient une activité contre *Candida albicans* **[Matsuura H., 2001].**

Les saponines stéroïdiennes contenues dans l'ail aurait aussi un rôle antifongique et antibactérien **[Matsuura H., 2001].** L'éruboside B a une activité contre *Candida albicans* comparable à l'activité de l'allicine et des ajoènes **[Matsuura H., 2001].**

I.3.2.2. Modifications des sécrétions respiratoires

L'alcoolature d'ail a été utilisée dans les *tuberculoses pulmonaires.* L'ail peut aussi avoir des effets dans les gangrènes pulmonaires **[Leclerc H., 1976].** Il a également certaines propriétés curatives et préventives dans la *coqueluche* **[Leclerc H., 1976].** Il possède aussi des *propriétés expectorantes* **[Schauenberg P., 1977].**

I.3.2.3. Propriétés préventives vis-à-vis du cancer

La prise régulière d'ail dans l'alimentation quotidienne semble avoir un rôle dans la prévention des cancers. Le principe actif impliqué dans cette propriété serait *l'allicine,* qui a montré une *action inhibitrice sur des tumeurs.*

Lürand a émis l'hypothèse que l'ail augmenterait la sécrétion de suc gastrique et désinfecterait l'intestin **[Leclerc H., 1976].** La *S-allylcystéine* (composé stable et inodore) inhiberait le processus de cancérogénèse **[Amagase H. et al., 2001].** Les *saponines* ont également montré une activité antitumorale. Toutes les saponines dérivées du spirostanol et les sapogénines semblent avoir des effets inhibiteurs. L'éruboside aurait également une action cytotoxique. Le furostanol, quant à lui, n'a aucune activité **[Matsuura H., 2001].**

Une étude a été réalisée en Chine: des composés soufrés, notamment le disulfure d'allyle, diminue le taux de cancers gastriques quand ils sont consommés régulièrement. Les *composés soufrés inhibent la métabolisation de certains cancérogènes* comme les nitrosamines en agissant au niveau de certains cytochromes P450 **(Wichtl M. et Anton R., 2003].** Une *lectine de bulbes d'Allii sativum s'est révélée très cytotoxique pour les cellules tumorales humaines, induisant l'apoptose*, sans effet sur les cellules saines **[Wichtl M. et Anton R., 2003].**

En 2001, différentes préparations d'ail ont été testées chez des rats par *KASUGA* et ses *collaborateurs* pour leur activité antitumorale **[Amagase S. et al., 2001].** Ils ont utilisé du jus d'ail, du jus d'ail chauffé, de la poudre d'ail déshydraté et de l'extrait d'ail vieilli. Ils ont montré que le jus d'ail chauffé et l'extrait d'ail vieilli diminuaient la taille des tumeurs mais pas de façon significative. *L'extrait d'ail vieilli* inhibe la croissance des cellules tumorales et augmente les activités des cellules «killers». Le jus d'ail chauffé a aussi une petite activité. Les deux autres préparations sont sans effet.

I.3.2.3. Action hypoglycémiante

L'association de sulfures organiques avec un produit non sulfuré présente les caractères d'un alcaloïde. Ce principe actif dépourvu de soufre, est inactif par lui-même et n'acquiert son pouvoir hypoglycémiant que par l'association avec les composés sulfurés du suc d'ail ou la combinaison aux sulfures d'allyle ou de diallyle purs **[Daif N., 1993].** Il semblerait que l'éventuel pouvoir hypoglycémiant de l'ail soit dû à *l'allicine* et au *disulfure d'allylpropyle* **[Girre L., 2001].**

I.3.2.4. Propriétés cardiovasculaires

L'ail agirait comme *vasodilatateur des artérioles et des capillaires* ce qui produirait une hypotension (effet dû aux fructosanes et au disulfure d'allyle).

Il existe des différences significatives des veinules, des artérioles et des capillaires chez les patients qui reçoivent de l'ail par rapport aux patients n'en recevant pas **[Grun-Thomas S., 1998].**

La prise régulière d'ail a la capacité de *diminuer la pression artérielle* **[Valnet J., 1982 ; Yeh Y.Y et Liu L., 2001].** En 1992, MAC MAHON et JAIN ont administré à 9 patients souffrant d'hypertension artérielle sévère 2400 mg d'une poudre d'ail standardisée en une prise.

Ils ont constaté une diminution significative des pressions artérielles diastoliques et systoliques avec une diminution nette de la tension au bout de 4 heures et ce, pendant 8 heures sans effets indésirables. L'ail est surtout utile dans le cas de maladies légères, limitées et souvent à titre prophylactique chez les patients à haut risque. L'ail *inhiberait la libération des catécholamines* (thiocyanate d'allyle; Prostaglandines A, B, F) *et en diminuerait l'effet* **[Girre L., 2001].**

Il existe une spécialité à base d'ail qui agit en prévention ou en association avec le traitement de l'affection cardiovasculaire **[Daif N., 1993].**

L'huile essentielle d'ail a une *activité fibrinolytique* **[Yeh Y.Y et Liu L., 2001]** mais cette action est plus importante chez un sujet sain que chez le coronarien. Elle est encore plus faible si le coronanen a déjà fait un infarctus **[Daif N., 1993].** MAC NAMARA a également démontré les propriétés *antiagrégantes plaquettaires* in vivo et in vitro. L'effet antiagrégant plaquettaire serait dû aux **ajoènes [Grun-Thomas S., 1998 ; Amagase H. et al., 2001].** Les plaquettes libèrent un certain nombre de constituants granulaires et synthétisent du thromboxane, précurseur des prostaglandines. Les ajoènes inhibent la libération des granules intraplaquettaires et affectent la structure de la membrane des plaquettes. De plus, ils inhibent la synthèse de thromboxane **[Grun-Thomas S., 1998].** Le *disulfure d'allyle, le trisulfure d'allyle* et surtout le *trisulfure de méthylallyle* ont cette même propriété en inhibant la thromboxane-synthétase **[Girre L., 2001].**

L'allicine, quant à elle, a un rôle sur les plaquettes, les neutrophiles par un mécanisme faisant intervenir les ions calcium **[Grun-Thomas S., 1998].** Certaines saponines comme *l'isoéruboside B inhibe la coagulation sanguine* et a un effet promoteur sur la fibrinolyse (comme le protoisoéruboside B) **[Matsuura H., 2001].** L'ail augmente donc la fluidité sanguine. Il a donc un rôle non négligeable à tenir dans le traitement des maladies coronariennes, de l'infarctus et des thromboses veineuses et artérielles **[Daif N., 1993].**

I.3.2.5. Effet hypocholestérolémiant

Les composés sulfurés de l'ail ont un rôle dans cette activité. Différentes formes d'ail peuvent être utilisées dans les suppléments :

- ✓ **l'ail cru:** gousse d'ail lavée et débarrassée de son enveloppe. Il contient 0,8 % d'alliine **[Amagase H. et al, 2001].**
- ✓ **l'ail cuit:** gousse d'ail avec son enveloppe soumise à la vapeur pendant 15 min, refroidie à température ambiante, pelée puis hachée.
- ✓ **la poudre d'ail:** ail frais pulvérisé et séché immédiatement à environ 60 "C. Elle contient les mêmes composés que l'ail cru mais en proportion différente.

La poudre d'ail contient au plus 1 % d'alliine (il y a des pertes durant la déshydratation), environ 0,5 % à 2,5 % d'allicine et de petites quantités d'autres composés soufrés, comme la scordinine (thioglycoside) ainsi que l' alliinase intacte **[Wichtl M. et Anton R., 2003].** Il est en effet important de conserver le système «alliine-alliinase» et d'inhiber une transformation ultérieure de l'allicine déjà formée **[Wichtl M. et Anton R., 2003].** Certaines poudres ont la réputation de «générer de I'allicine » mais pas en quantité réellement appréciable. Les sucs gastriques et les sécrétions intestinales les altèrent **[Amagase H. et al, 2001].**

- ✓ **l'extrait sec d'ail:** on utilise des gousses d'ail non pelées soumises tout d'abord à un traitement de courte durée par les micro-ondes, ce qui inactive l'alliinase. Ainsi, lors de l'extraction hydro-alcoolique ultérieure, les composés soufrés odorants ne peuvent se développer et seuls les composés hydrophiles de l'ail sont extraits. Cet extrait est surtout constitué de polysaccharides, de saponosides stéroïdiques et tri terpéniques **[Wichtl M. et Anton R., 2003].**
- ✓ **l'extrait alcoolique:** poudre d'ail macérée au bain-marie à 60 "C, dans de l'éthanol pendant 20 minutes puis filtrée, le filtrat est ensuite évaporé 3 fois et les résidus d'évaporation sont réunis. Il contient principalement des composés hydrosolubles et quelques composés liposolubles: S-allylcystéine (SAC) et S-allylmercaptocystéine (SAMC). Durant le processus de vieillissement, les composés odorants et irritants sont convertis en composés sulfurés stables et neutres: SAMC et SAC surtout **[Amagase H. et al., 2001].**
- ✓ **l'huile essentielle:** la gousse est écrasée, le jus d'expression est récolté puis mélangé à de l'éther, la fraction éthérée est prélevée, l'éther est évaporé, l'huile essentielle est ensuite enfermée dans une capsule de gélatine **[Daif N., 1993].** L'huile essentielle « vraie» est obtenue par une macération aqueuse préalable pendant plusieurs heures, d'ail fraîchement fragmenté, suivie d'une distillation à la vapeur d'eau. On retrouve 0,02 à 0,5 % d'huile essentielle dans les gousses d'ail. Elle contient 50 à 60 % de sulfides comme le diallyldisulfide (DADS) et le diallyltrisulfide. L'allicine est éliminée de l'huile essentielle, tout comme les produits hydrophiles. Les capsules d'huile d'ail contiennent des huiles végétales et de l'huile essentielle d'ail en petite quantité [**Amagase H. et al., 2001].**
- ✓ **l'huile macérée:** elle est la plupart du temps utilisée à titre de condiment. Elle est obtenue en agitant pendant 48 heures l'ail fraîchement fragmenté dans de l'huile grasse **[Wichtl M et Anton R., 2003].** Elle contient de l'alliine qui est transformée en allicine, et des produits provenant de la dégradation de l'allicine: vinyldithiines, ajoènes et allyl-oligosulfides **[Amagase H. et al, 2001 ; Wichtl M. et Anton R., 2003].**

I.3.2.6. Etudes sur cultures cellulaires

En utilisant des *cultures cellulaires d'hépatocytes,* il a été trouvé des effets inhibiteurs de la synthèse du cholestérol dans la fraction d'ail frais extraite par l'eau, dans la fraction extraite par le méthanol et celle extraite par l'éther **[Yeh Y.Y et Liu L., 2001].** Cette étude a prouvé que les composés hydrophiles (S-allylcystéine SAC, S-éthylcystéine SEC, S-propylcystéine SPC) et lipophiles (Diallylsulfide DAS, diallyldisulfide DADS, diallyltrisulfide DATS, dipropylsulfide DPS, dipropyldisulfide DPDS) extraits de l'ail sont efficaces dans *l'inhibition de la production de cholestérol***.** Cependant ce sont les *composés hydrophiles qui sont le plus efficaces.*

De plus, il a été prouvé que les composés lipophiles sont cytotoxiques. L'inhibition maximale est retrouvée avec une action concertée de différents composés de l'ail. Les extraits d'ail diminuent la synthèse de triacylglycérol en diminuant la synthèse des acides gras. L'action des dérivés hydrophiles proviendrait de leur action sur la voie de synthèse du cholestérol tandis que l'action des dérivés lipophiles proviendrait plutôt de leur cytotoxicité **[Yeh Y.Y et Liu L., 2001].**

I.3.2.7. Etudes chez l'animal

BORDA a réalisé une étude chez le *lapin* **[Daif N., 1993].** Il a administré 0,5 g de cholestérol par jour à des lapins. La cholestérolémie a été multipliée par 10 en 4 mois. L'administration simultanée d'huile essentielle d'ail ou d'oignon a permis de limiter cette augmentation: la cholestérolémie a été multipliée par 7 avec l'ail. L'hypertriglycéridémie a été divisée par 2 avec l'administration simultanée d'huile essentielle d'ail. L'augmentation des P-lipoprotéines a aussi pu être limitée avec l'ail et l'oignon. L'ail aurait donc une *activité protectrice en évitant une chute importante des lipoprotéines et une augmentation des p-lipoprotéines.* L'ail augmenterait l'activité fibrinolytique par rapport à un régime à base de cholestérol sans ail.

KANAMA et CHANDRASEKARA ont utilisé des rats rendus hyperlipémiques pour leurs expériences **[Daif N., 1993].** Ils ont déterminé que la teneur optimale en poudre d'ail était de 2 % environ (6 à 7 % en ail frais). Ils ont montré que l'ail entraîne une *diminution des teneurs sériques et hépatiques en cholestérol.* Il permet aussi une diminution du taux de LDLcholestérol et une augmentation relative en HDL-cholestérol.

THIERSCH a nourri des lapins avec du cholestérol et il a montré que l'huile *essentielle d'ail s'oppose au développement de l'artériosclérose* **[Leclerc H., 1976].**

En 2000, *AOUDI* et ses *collaborateurs* étudièrent l'effet hypocholestérolémique de l'ail **[Aouadi R. et al., 2000].** Ils constituèrent 4 groupes de rats: le groupe « contrôle» reçu un régime alimentaire standard, le deuxième groupe un supplément avec 10 % d'ail frais, le troisième 2 % de cholestérol et le quatrième 2 % de cholestérol et 10 % d'ail frais. A la fin de l'étude, le cholestérol sanguin fut significativement plus faible dans le deuxième groupe par rapport au groupe «contrôle».

De plus, l'hypercholestérolémie induite par le cholestérol alimentaire fut réduite significativement par l'ail. *La supplémentation en ail augmente les HDLcholestérol et diminue les LDL-cholestérol chez les rats «normaux» et hypercholestérolémiques.* Ces résultats démontrent que l'ail exerce des effets hypocholestérolémiants quelque soit le régime alimentaire des rats.

Les *saponines* contenues dans l'ail auraient aussi un rôle hypocholestérolémiant **[Matsuura H., 2001].**

Des études sur des modèles animaux comme les rats ont été résumées en 2001. *Les saponines inhiberaient l'absorption intestinale du cholestérol* et entraîneraient donc une diminution du cholestérol sanguin. Chez les rats hyperlipémiques, les saponines stéroïdiennes, surtout les saponines dérivées du spirostanol, semblent être responsables de la diminution du cholestérol total. On constate dans tous les cas une *diminution du LDL-cholestérol* et parfois une *augmentation du HDL-cholestérol* **[Matsuura H., 2001].** Les saponmes agiraient par formation d'un complexe avec le cholestérol ou auraient un effet direct sur le métabolisme du cholestérol.

En 2001, *Yeh et Liu* ont nourri des rats avec un régime riche en graisses **[Yeh Y.Y et Liu L., 2001].** Les concentrations en cholestérol total et en triglycérides furent plus basses dans le groupe «rats supplémentés en ail» que dans le groupe «placebo». En blanc est représenté le groupe «placebo» et en noir, le groupe «intervention».

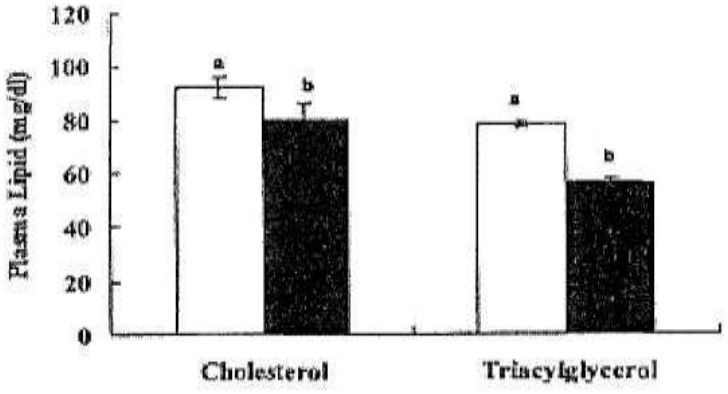


Figure I.7. Effet hypolipémiant de l'extrait d'ail âgé chez les rats *(d'après* **[Yeh Y.Y et Liu L., 2001]** *en biblio)*

I.3.2.8. Autres propriétés

Il a été également montré que l'huile essentielle d'ail dont le sulfure de diallyle a été converti en bromure d'allyle a des *effets carminatifs* **[Leclerc H., 1976].** L'ail est aussi *cholérétique* et cholagogue **[Schauenberg P., 1977].** Les fructosanes contenus dans l'ail ont aussi une certaine activité *diurétique.*

L' *allisatine* **[Daif N., 1993]** et les *saponines stéroïdiennes* de l'ail **[Matsuura H., 2001]** ont montré une activité *anti-inflammatoire***.**

L'ail a aussi une action sur les sécrétions internes: à faible dose, il entraîne une hyperactivité de la thyroïde et à forte dose, il est à l'origine d'une hypoactivité de celle-ci. L'ail aurait également un *pouvoir antigoutteux? Il stimulerait la fonction immunitaire* (en stimulant la fonction phagocytaire des macrophages et la prolifération des lymphocytes **[Yeh Y.Y et Liu L., 2001],** il entrerait en jeu dans des processus de détoxification, de *radioprotection* **[Amagase H. et al., 2001].** Il a également été prouvé que les produits à base d'ail ont des effets *protecteurs hépatiques* contre les toxines comme *l'alcool* **[Cui R. et al., 2003].** En effet, la toxicité de l'alcool est en partie due à l'acétaldéhyde, et l'extrait d'ail vieilli et la poudre d'ail déshydraté protègent contre l'intoxication à l'acétaldéhyde. Ils augmenteraient l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase.

I.3.3. Utilisation de l'ail

- **Posologie:** Dose journalière moyenne = 4 g de bulbe frais ou de préparations correspondantes
- **Mode d'administration:** Voie orale
- **Médicaments:**
    - Formes de gélules à 430 mg d'ail titré à 0,2 % d'alliine (3 gél/j)
    - Nombreuses préparations ont été utilisées: teinture, macéré, alcoolature, sirop et vinaigre
    - Spécialités: Arkogélules Inodail (posologie = 1 gélule gastrorésistante matin, midi et soir à prendre au cours du repas), Artérase, Elusanes ail, vermifuge LHF, Thirial etc.

De nouvelles autorisations ont été acceptées pour diverses formes d'administrations: drogue coupée, pulvérisée, macérat huileux et extrait sec. La forme la plus utilisée est le dragée gastro-résistant, mais des comprimés et gélules, voire des solutions orales sont proposées.

I.4. Toxicité de l'ail

I.4.1. Odeur de l'ail

Sa consommation entraîne une *odeur forte de l'haleine et de la peau,* reconnaissable et persistante **[Amagase H. et al., 2001 ; Wichtl M. et Anton R., 2003].** Des travaux ont été entrepris pour désodoriser l'ail ou pour masquer son odeur.

LECLERC a essayé de neutraliser son odeur. Il soutenait que 2 ou 3 grains de café à mâcher, la consommation de quelques grains d'anis ou de cumin, d'une pomme ou d'une branche de persil pouvaient masquer son odeur **[Valnet J., 1974 ; Valnet et J., 1982].** D'autres ont dit qu'une mastication longue de l'ail ne donnait pas une «mauvaise haleine».

Mais tous ces «trucs» sont faux: l'odeur de l'ail est *due au sulfure d'allyle,* contenu dans l'huile essentielle d'ail et dont on élimine l'excédent par voie pulmonaire.

I.4.2. Effets indésirables rencontrés lors de l'utilisation de l'ail

L'ail est parfois mal toléré car il est *peu digeste. Il* est aussi *très irritant pour les muqueuses.*

Il peut être à l'origine de *troubles digestifs* **[Wichtl M. et Anton R., 2003].** La consommation de bulbe frais, d'extraits ou d'essence peut être à l'origine de manifestations digestives (nausées, vomissements, diarrhées ...). L'ail cru et la poudre peuvent *diminuer le taux plasmatique des protéines et du calcium* **[Amagase H. et al., 2001].** Ils peuvent être à l'origine *d'anémies* et d'une *inhibition de la spermatogénèse* **[Amagase H. et al., 2001].**

On peut retrouver des *réactions allergiques* consécutives à l'inhalation de poudre d'ail. L'élimination de l'essence d'ail se fait par voie pulmonaire: elle peut entraîner une irritation des muqueuses bronchiques, à l'origine d'un bronchospasme. Après sa consommation, un goût et une odeur désagréables au niveau de la cavité buccale se développent.

Des manifestations allergiques peuvent être retrouvées : dermatites de contact, crise d'asthme sévère suite à l'inhalation de poudre d'ail. .. **[Wichtl M. et Anton R., 2003].**

Des *saignements* peuvent se produire lorsque les doses usuelles sont dépassées.

I.4.3. Toxicologie

Divers accidents consécutifs à une utilisation par voie externe (cataplasmes d'extraits d'ail par exemple) peuvent être rencontrés lors d'utilisations *à fortes concentrations: phlyctèmes étendus et nécroses* ...

Des accidents consécutifs à une utilisation par voie interne sont également possibles: 3 ou 4 têtes d'ail riches en principes soufrés agressifs pour les muqueuses peuvent entraîner des *brûlures d'estomac*, une *irritation des voies urinaires* qui peut aller jusqu'à une cystite accompagnée de fièvre **[Debelmas et Anne-Marie, 1983].** Des lavements à base d'ail (dans le but d'expulser des vers intestinaux) à fortes doses peuvent provoquer une *dysentérie.*

Attention!!! Les *composés organosulfurés lipophiles de l'ail,* actifs dans la diminution des lipides présentent à haute dose une *certaine cytotoxicité* (ce qui n'est pas le cas des composés organosulfurés hydrophiles) **[Amagase H. et al., 2001].** L'alliine est un des plus irritants et le DAS est le plus allergène **[Amagase H. et al., 2001].**

L'allicine peut se comporter comme un *agent oxydant* et entraîner des irritations de l'estomac et l'intestin **[Amagase H. et al., 2001].** L'extrait d'ail vieilli ne présente pas d'effets indésirables **[Amagase H. et al., 2001].** La S-allylcystéine est 30 fois plus toxique que l'allicine et le DADS **[Garnier G. et al., 1961].** En revanche, la cancérogénécité et la tératogénécité ne sont pas établies.

I.4.4. Contre-indications

Les *dermatoses***,** les *dartres*, les *irritations de l'estomac et des intestins* contreindiquent l'utilisation de l'ail **[Valnet J., 1974 ; Valnet J., 1982].** L'ail est également *contre-indiqué chez les femmes qui allaitent* car il altère le lait et donne des coliques aux nourrissons. Les *symptômes congestifs pulmonaires* (toux sanguinolente, toux sèche et forte, fièvre) empêchent son usage **[Valnet J., 1974 ; Valnet J., 1982].**

I.5. Techniques d'extraction

I.5.1. Procédés d'extraction traditionnels

I.5.1.1. Introduction

Les huiles essentielles sont composées par des molécules aromatiques d'origines végétales présentant une très grande diversité de structure. Cependant ces huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses. Ainsi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisant une forte demande toujours plus exigeante.

Basée sur différents phénomènes physiques : la distillation, l'extraction ou la séparation, ces techniques d'extraction seront présentées selon le principe sur lequel elles sont basées, et classées en deux catégories distinctes selon le produit final obtenu : une huile essentielle ou un extrait aromatique.

I.5.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydro-distillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille.

Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange «eau + huile essentielle».

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile.

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant.

Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange «vapeur d'eau – huile essentielle» dispersé dans la matière végétale **[Meyer-Warnod B. et *Perfumer & Flavorist,* 1984].** Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.

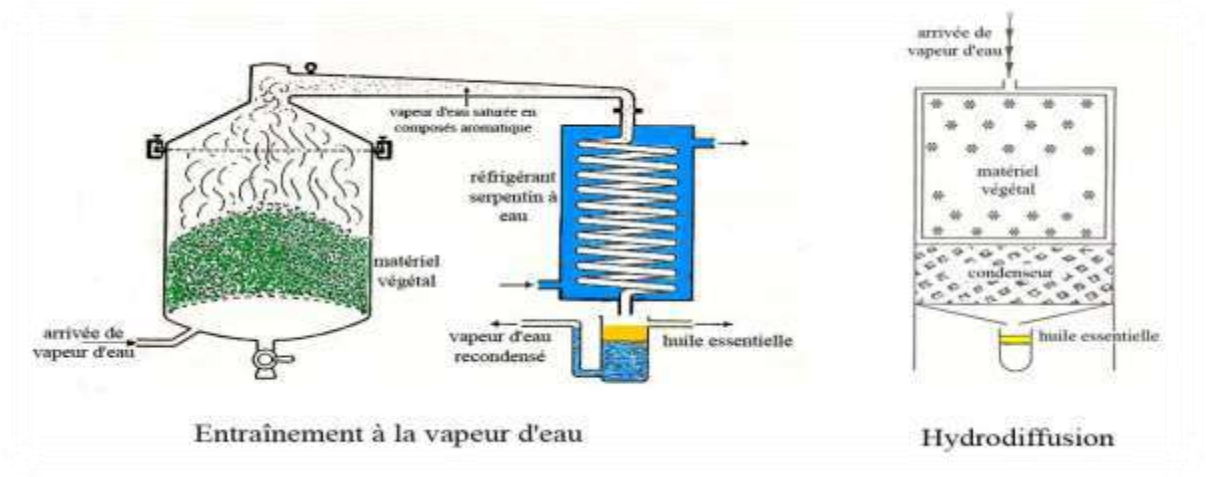


Figure I.8. Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.

I.5.1.3. Hydro distillation et ses variantes

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle **[AFNOR Paris, 1992]**, ainsi que pour le contrôle de qualité **[Pharmacopée Européenne1, 1996].** Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène.

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique «eau + huile essentielle» distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé dans un essencier ou vase florentin. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle.

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. En laboratoire le système équipé d'une cohobe qui est généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger **[Clevenger F. *American Perfumer & Essential Oil Review*, 1928].**

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

Afin de traiter des matières premières pour lesquelles il est difficile d'extraire l'huile essentielle ou pour les essences difficilement entraînables, l'hydrodistillation à pression élevée représente une bonne alternative. Cette technique est en outre utilisée pour le santal, le girofle ou les rhizomes de vétyver, de gingembre et d'iris **[Bocchio E., *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, 1985].** Cependant, bien que le travail sous pression conduise à une amélioration du rapport d'entraînement donc à des économies d'énergie, une température élevée peut emmener une modification voire une altération de l'huile essentielle obtenue. D'autre part, le prix et les contraintes des équipements à mettre en oeuvre contribuent à freiner cette technique **[Tournaire G., *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, 1980].**

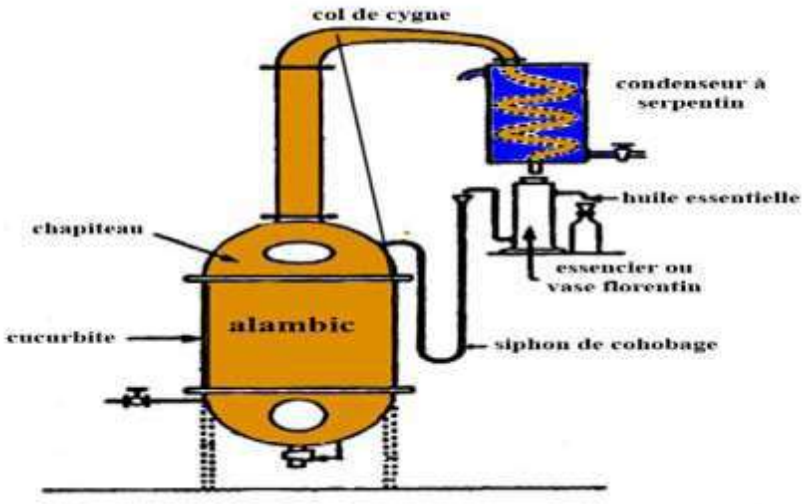


Figure I.9. Hydrodistillation traditionnelle.

La turbodistillation est un procédé d'hydrodistillation accélérée en discontinue développée en France par la société Aromaprocess **[Meyer-Warnod B. et *Perfumer & Flavorist*, 1984].** Cette technique est prédestinée aux matières premières végétales difficiles à traiter comme les racines, les ligneux ou les graines, comme cela a été le cas pour la badiane de Chine ou les graines de céleri. Elle représente une alternative à des hydrodistillations de longue durée ou en surpression.

Le réacteur contenant la matière végétale est équipé d'une turbine qui permet d'une part, la dilacération des matières végétales, d'autre part, une agitation turbulente, d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation. Outre le recyclage des eaux de cohabage, ce procédé permet la récupération des fractions les plus volatiles grâce à un système de condensation secondaire.

La présence d'une colonne à plateaux contribue à l'enrichissement des vapeurs en huile essentielle, d'où une amélioration du rapport d'entraînement. **[Périneau F. et al., 1989/1990 ; Cu J.Q. et al., 1990]**

I.5.2.4. Expression à froid [Dugo G., Di Giacomo A., 2002 ; Martini M.C., Seiller M., 1999]

Les huiles essentielles de fruits d'hespéridés ou encore d'agrumes ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid. Le principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois.

Alors que jusqu'à une époque récente, l'huile essentielle constituait le produit majeur obtenu à partir des fruits de *Citrus*, désormais c'est le jus qui représente le produit le plus important, l'huile essentielle étant devenue un sous-produit de la production de jus de fruits d'agrumes. De plus l'expression de type manuel dite «à l'éponge» a laissé place à des procédés beaucoup plus industrialisés et mécanisés afin de diminuer les coûts, d'augmenter les rendements et de préserver le fruit en vue de l'extraction de son jus. Parmi ces nouveaux procédés se trouvent l'extracteur de l'Institut des Fruits et Agrumes Coloniaux (IFAC), la sfumatrice, la pélatrice, l'extracteur « in line » ou la machine polycitrus. Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans la majeure partie de ces procédés peut altérer les qualités des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de micro-organismes. C'est pourquoi les constructeurs cherchent en permanence à s'affranchir de l'utilisation de l'eau lors de telle extraction.

L'extracteur de l'IFAC devenu depuis l'Institut de recherche agronomiques tropicales et des cultures vivrières a mis au point en 1952 une machine permettant l'expression à froid de l'huile essentielle des hespéridés sans emploi d'eau, ce qui évite ainsi des altérations telles les hydrolyses ou les solubilisations des certaines classes de composés aromatiques. Le principe de cette machine est basé sur l'ouverture des sacs oléifères par éclatement sous l'effet d'une dépression.

La sfumatrice provoque la libération de l'huile essentielle des sacs oléifères au moyen de zones de vibrations ce qui a pour effet de restituer de façon intacte l'écorce de fruit (sans traces de blessures). L'huile essentielle est ensuite entraînée par un jet d'eau avant d'être séparée de la phase aqueuse par centrifugation. La pélatrice est constituée par une série de cylindres transversaux munis de pointes abrasives au travers desquels passent les fruits.

La machine d'extraction « in line », relativement complexe, permet à la fois l'extraction du jus et de l'huile essentielle du fruit sans que ces deux produits soient en contact. Pendant la compression du fruit entre deux moules lacérants pour en extraire l'huile essentielle, un cylindre pénètre le fruit pour en extraire le jus, qui est ainsi récupéré dans le cylindre alors qu'un jet d'eau entraîne l'huile essentielle. La machine polycitrus est une des plus récentes sur le marché. Elle est constituée de la combinaison d'un extracteur d'huile essentielle et d'un extracteur de jus. Pour l'extraction de l'essence on utilise le principe de l'abrasion des sacs oléifères et pour l'obtention du jus, le principe du pressage de la moitié du fruit.

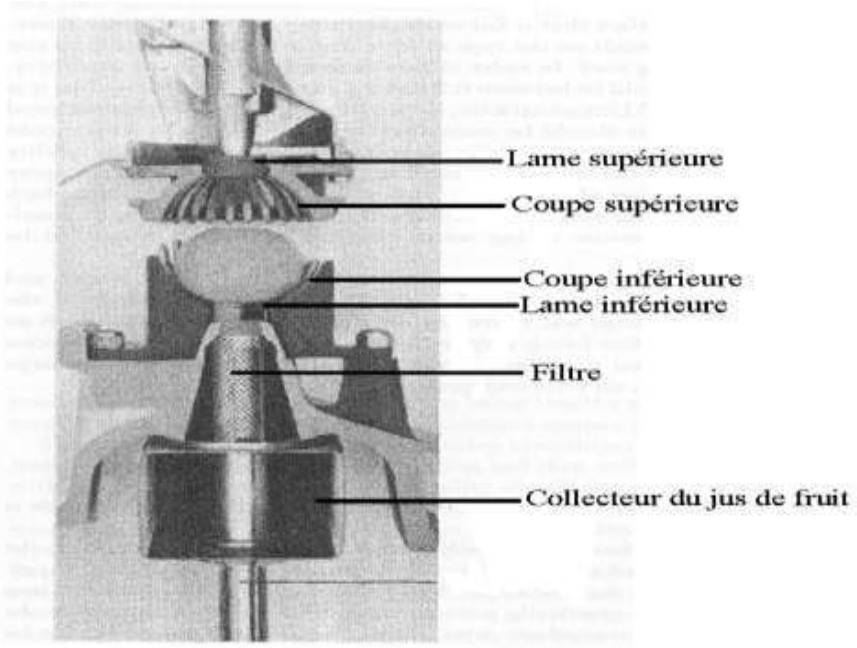


Figure I.10. Extraction «in-line». [**Dugo G., Di Giacomo A., 2002]**

I.5.2.5. Distillation à vapeur saturée

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales.

En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition d'eau. Son avantage est que les altérations de l'huile essentielle recueillie sont minimisées.

I.5.2.6. Hydro diffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie.

I.5.2.7. Distillation «sèche»

La distillation «sèche», aussi appelée distillation destructive, est utilisée pour la séparation des produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. On peut ainsi obtenir, à partir du bois, par calcination, de la créosote (mélange de phénols), de l'alcool méthylique et de nombreux autres produits. En revanche, rares sont les documents se rapportant à la distillation sèche en tant que méthode d'extraction de composés aromatiques volatils. Pourtant, il s'agit d'une méthode d'extraction des huiles essentielles caractéristique des végétaux fragiles tels que les pétales de rose. Dans le domaine de l'extraction végétale, la distillation sèche consiste à chauffer de façon très modérée les plantes ou parties de plantes sans ajout d'eau ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles.

L'avantage de cette méthode est la température à laquelle se déroule l'extraction : inférieure à 100°C, ce qui évite la dénaturation de certaines molécules thermosensibles. La figure I.11 représente les montages de distillation sèche utilisés pour l'isolement de l'huile essentielle de rose par distillation sèche **[Kapetanovic S. et al., 1984]**. Mais si cette technique présente un avantage certain au niveau de la qualité, elle aboutit cependant à des rendements extrêmement faibles en huile essentielle.

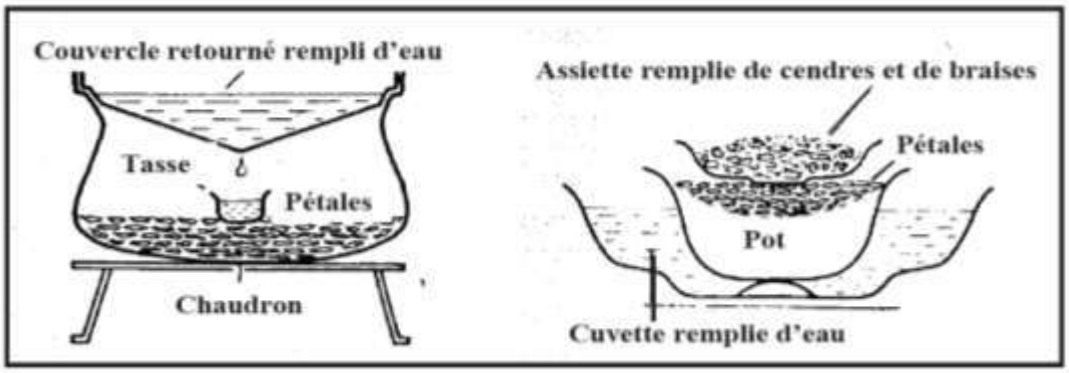


Figure I.11 : Schéma de préparation de l'extrait de rose en Herzégovine.

I.5.2.8. Extraction par solvants volatils

La technique d'extraction «classique» par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé «concrète». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une «absolue». Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau. Du fait de l'utilisation de solvants organiques, cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de noter.

En effet, l'intervention de solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer. Le choix du solvant d'extraction va s'avérer très délicat, d'autant que la législation sur les produits à destination de l'industrie agro-alimentaire est extrêmement rigoureuse. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants les plus utilisés, on recense : le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane. Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations. L'hydrodistillation-extraction simultanée et l'extraction par Soxhlet en sont les principales.

L'hydrodistillation-extraction simultanée (Simultaneous Distillation Extraction : SDE) a été décrite en 1964 pour la première fois par Lickens et Nickerson **[Nickerson G.B. et al., 1966].**

Le nom des concepteurs de la technique sera par la suite donné à l'appareillage utilisé pour ce type d'extraction. L'originalité et le principe de cette technique résident dans la rencontre de la vapeur d'eau chargée de molécules aromatiques provenants de l'hydrodistillation et des vapeurs de solvant, entraînant l'extraction des composés aromatiques de la phase aqueuse vers la phase organique. Le passage des deux phases dans la partie réfrigérante va permettre la condensation et la séparation des deux phases dans la partie en U de l'appareil. La conception du procédé assure le recyclage des deux phases.

La SDE est une technique actuellement très utilisée dans l'extraction de molécules aromatiques d'origines végétales **[Peng F. et al., 2004]** mais aussi dans l'agro-alimentaire pour la détermination qualitative et quantitative de molécules aromatiques présentes dans certains produits alimentaires**[Siano F. et al., 2003].** Plus récemment, la SDE a été réalisée sous pression réduite, ce qui permet de réduire les phénomènes d'artéfact comme cela a été mis en évidence en étudiant l'acétate de lynalyle **[Maignal L. et al., 1992].**

L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle. Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale **[Vagi E. et al., 2005].** Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides **[Zarnowski R. et al., 2004]**, ou de divers autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction a été récemment combinée aux micro-ondes **[Luque-Garcia J.L. et al., 2004]** et aux ultra-sons**[Luque-Garcia J.L. et al., 2004].**

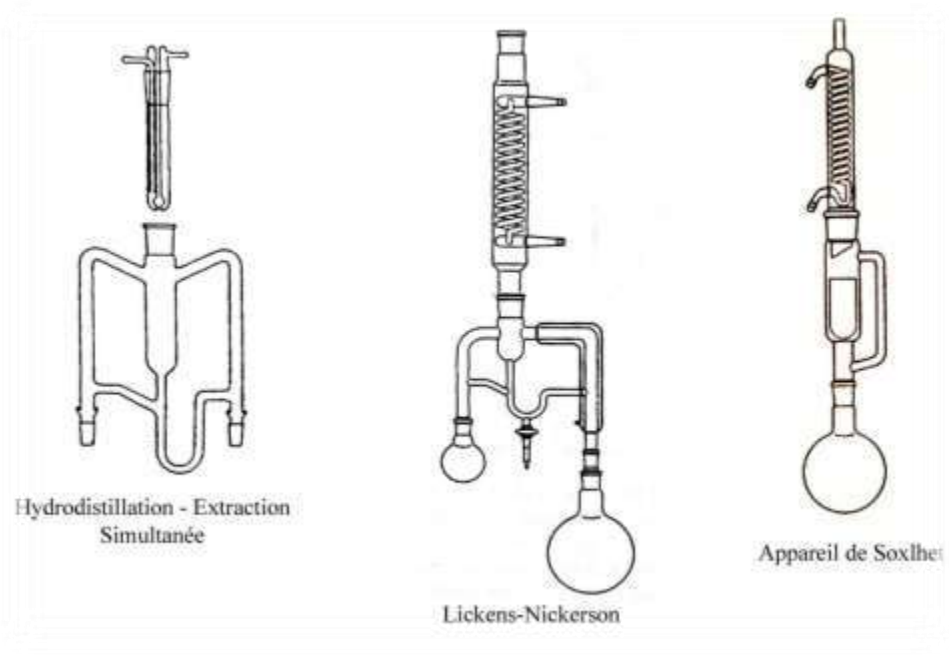


Figure I.12. Différents types d'extraction par solvants volatils.

I.5.2. Procédés d'extraction moderne

I.5.2.1. Extraction par fluides supercritiques (FSC) [Hyptis S. et al., 2004]

I.5.2.1.1. Définition

Les fluides supercritiques sont définis comme étant des gaz sous pression dont le pouvoir solvant est ajustable. Alors qu'ils peuvent se trouver sous la forme liquide et gazeuse à une température et à une pression inférieure à la température Tc (= température critique) et à la pression Pc (= pression critique), une seule phase existe lorsque la pression et la température sont supérieures à ces coordonnées : c'est l'état supercritique où le corps n'est ni liquide, ni gazeux.

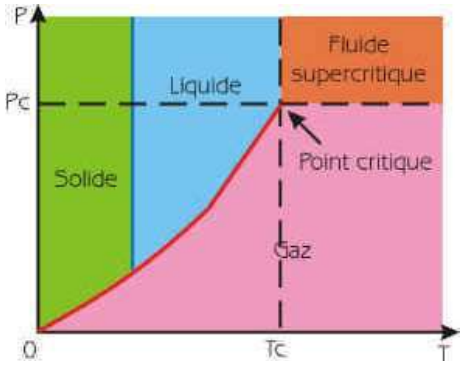


Figure I.13. Différents états d'une molécule.

I.5.2.1.2. Propriétés des fluides supercritiques

Une des propriétés fondamentales des FSC réside dans le fait que leurs constantes physiques sont intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui permet de les utiliser comme solvant d'extraction.

I.5.2.1.3. Extraction par CO2 supercritique

Actuellement le fluide le plus utilisé est le CO2 naturel, non toxique et peu coûteux. Il apparaît comme un solvant idéal car il présente des caractéristiques parfaitement adaptées à l'usage industriel et aux nouvelles contraintes législatives. Le CO2 supercritique permet d'extraire totalement ou sélectivement les composés peu polaires et de faible masse moléculaire.

Tableau I.1. Avantage et inconvénients de L'extraction par CO2 supercritique

Avantages	***Inconvénients***
✓ Capacité d'extraction est intéressante grâce à la facilité de pénétration de la matière supérieure à celle des solvants habituels. ✓ CO2 est bon marché, abondant, ininflammable et chimiquement inerte. ✓ Pression et température critique des solvants peu élevée. ✓ produits de qualité alimentaire, ✓ Coût de séparation et d'extraction faibles. ✓ Pas d'altération liée à la chaleur. ✓ Pas d'hydrolyse. ✓ Pas de réaction avec les autres solvants.	✓ Appareillage coûteux. ✓ Pas de substitution entre l'extrait classique et les nouveaux produits.

En conséquence, le CO_2 supercritique devrait permettre de satisfaire la demande croissante d'arômes naturels de «qualité supérieure». En effet, plus qu'une technologie de pointe, l'extraction par CO_2 supercritique est une source de nouveaux ingrédients qui ne se substituent pas en général à des extraits classiques mais permettent d'imaginer des formules innovantes.

Les industriels se voient proposer de nouvelles opportunités dans ce secteur et dans le même temps, de nouvelles contraintes réglementaires sur les extraits traditionnellement utilisés.

Il reste fort à parier que les extraits CO_2 vont continuer à gagner des places dans un marché demandeur de naturel.

I.5.3.2. L'extraction assistée par micro-ondes

En 1986, Ganzler *et al*, furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique **[Ganzler et al., 1986]** Cette technique permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie par rapport à une méthode conventionnelle. En 1990, Paré *et al.,* ont déposé un premier brevet européen, sur «l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes» [**Paré et al., 1990]**. Ils proposaient d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane. Ainsi les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal.

Depuis différentes techniques d'extraction par micro-ondes ont été développées et de nombreux brevets ont été déposés :

- le procédé d'hydrodistillation par micro-ondes est basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique.
- Extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE (Microwave Assisted Extraction) et MAP™ (Microwave Assisted Process). Cette méthode est la plus utilisée. Si sa rapidité de mise en oeuvre en fait une technique de choix pour l'extraction et plus particulièrement pour l'extraction de composés aromatiques d'origine végétale, le produit obtenu ne peut réglementairement être considéré comme une huile essentielle. De plus l'utilisation de solvant organique présente certains inconvénients : contamination du produit fini, problème pour son élimination totale. Rappelons que l'industrie agro-alimentaire applique des lois très strictes sur l'origine des produits utilisés.

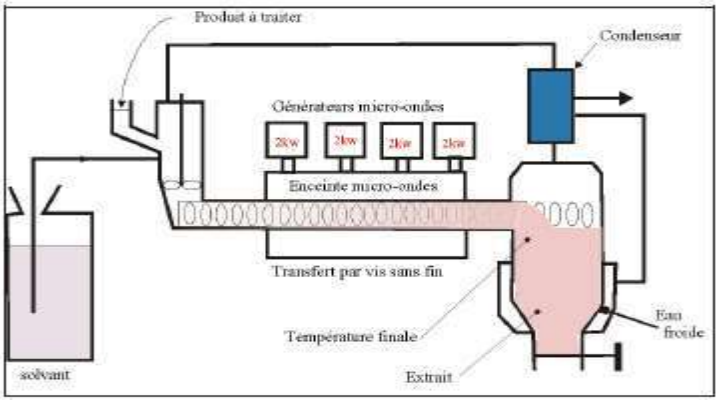


Figure I.14. Schéma d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE (Microwave Assisted Extraction) et MAP™ (Microwave Assisted Process) selon la thèse de **M. Lucchesi**.

- le «VMHD» (Vaccum Microwave Hydro Distillation) ou hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé. Cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. D'après les concepteurs du VMHD l'extraction serait dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique. Les composés responsables des notes «crues» les plus thermosensibles semblent être conservées après une extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique.
- SFME (Solvant Free Extraction Microwave) est le mode d'extraction le plus récent et a été, en particulier, développée par le groupe Chemat-Smadja à l'Université de la Réunion. Cette technique a été rebaptisée «Dry-Dist» et est commercialisée à travers le monde par la société Milestone (Bergame-Italie). Elle associe un four micro-ondes et une distillation sèche.

L'extraction est réalisée à la pression atmosphérique, en l'absence de solvant et d'eau ajoutée.

Les principaux avantages de cette technique résident dans l'augmentation de la cinétique d'extraction ainsi que son caractère plus respectueux de l'environnement (absence de solvant) qui constitue un des exemples de chimie verte.

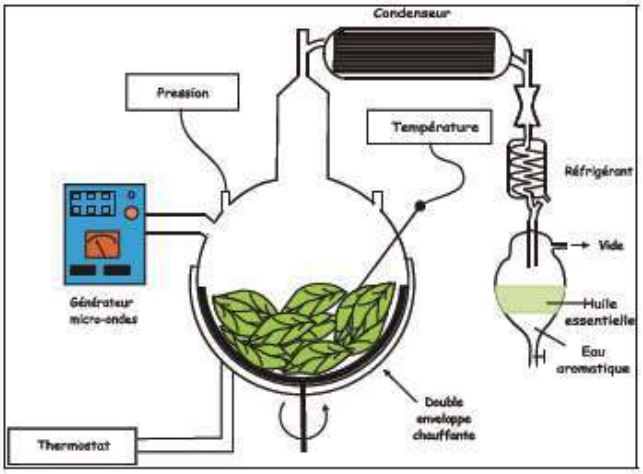


Figure I.15. Schéma du montage d'extraction selon le principe « VMHD » (Vaccum Microwave HydroDistillation) selon la thèse de **M. Lucchesi.**

Le mécanisme de chauffage par micro-ondes repose sur le fait que certaines molécules telles que l'eau présentent des excès et des défauts de charges dus à la différence d'électronégativité entre les atomes d'oxygène et d'hydrogène. Ces molécules polaires présentent alors un moment dipolaire ou dipôle. Les dipôles sont susceptibles de s'orienter lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique et génèrent alors un moment dipolaire induit. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif, les dipôles s'orientent dans la direction du champ, puis se désorientent à la disparition du champ et enfin se réorientent dans l'autre sens.

Il s'agit de la rotation dipolaire. Cependant, l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par l'existence de liaisons hydrogène et de liaisons de Van der Waals qui freinent la libre rotation et conduisent à un dégagement de chaleur. L'énergie cinétique est alors transformée partiellement en chaleur. Le chauffage de l'eau présente dans la plante provoque l'éclatement des glandes contenant l'huile essentielle. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par la vapeur d'eau contenue elle aussi dans la matière végétale.

Un essencier de type Clévenger permet de condenser le distillat et de récupérer l'huile essentielle par simple décantation en tenant compte la différence de densité.

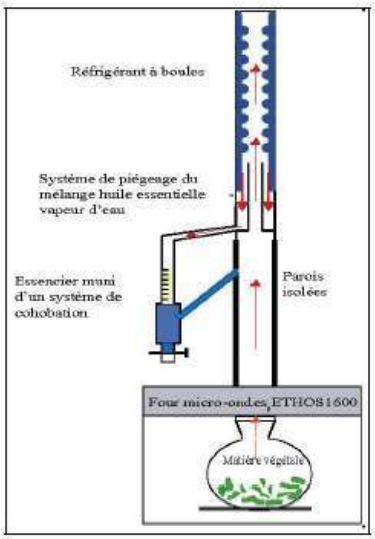


Figure I.16. Schéma d'extraction selon le principe SFME (Solvant Free Extraction Microwave)
Selon la thèse de **M. Lucchesi**.

Malgré l'utilisation d'un essencier de type Clévenger pour condenser et refroidir les vapeurs issues du chauffage du végétal par les micro-ondes, l'échantillon obtenu par SFME ne peut en toute rigueur être considéré comme une huile essentielle. En effet, le terme « huile essentielle » nécessite l'utilisation du principe de l'hydrodistillation, de l'entrainement à la vapeur ou de l'expression à froid. Les deux modes d'extraction, bien que voisins, diffèrent cependant par la nature du chauffage. Or les phénomènes de solubilité des composés organiques dans l'eau sont particulièrement importants dans une hydrodistillation ou encore dans un entraînement à la vapeur.

Dans la très grande majorité des cas, les rendements de l'extraction par micro-ondes sont proches voire supérieurs à ceux obtenus par hydrodistillation, le temps d'extraction est plus court, de l'ordre de 30 minutes alors qu'une hydrodistillation nécessite classiquement trois heures au minimum. A rendement équivalent, il est constaté une augmentation de la proportion des composés oxygénés dans les extraits obtenues par SFME **[Fehrat *et al.*, 2006 ; Lucchesi *et al.*, 2007].** Plusieurs explications sont avancées pour expliquer ces différences :

- l'observation des végétaux par Microscopie Electronique à Balayage montre des différences en termes d'altération des glandes à huile essentielle. Celles-ci semblent totalement détruites sous l'effet des micro-ondes ;
- les composés oxygénés plus polaires et plus solubles dans l'eau seraient distillés en priorité par rapport aux hydrocarbures terpéniques dont la température d'ébullition est pourtant plus faible.
- Dans une huile essentielle obtenue par hydrodistillation, les composés oxygénés ont une plus grande affinité que les hydrocarbures pour la phase aqueuse et se retrouve donc l'hydrolat. Lors d'une extraction micro-onde, il est ainsi possible qu'étant donné le faible volume de la phase aqueuse, les composés oxygénés qui sont souvent assez solubles dans l'eau, demeurent dans l'extrait obtenu par SFME.

I.6. Méthodes d'analyse

Les propriétés antibactériennes de l'extrait de l'ail frais ont été reconnus par Pasteur en 1858 et même dès 1892 Semmler avait réussi à obtenir 0,1% - 0,2% de rendement d'huile volatile de gousses d'ail par distillation à la vapeur. En 1935, Platenius développé une méthode d'évaluation de saveur par laquelle les sulfures dans les distillats de pétrole pourraient être oxydé en sulfate dans l'eau de brome, le brome en excès chassés par chauffage et le sulfate se précipite avec le chlorure de baryum **[Platenius H., 1935].** Dix ans plus tard, cette méthode a été améliorée par Currier qui a utilisé des températures de réaction plus basses et converti le soufre au bleu de méthylène, effectuant ainsi un dosage colorimétrique **[Currier H. B., 1945].** Bien que l'utilisation du soufre total comme une mesure de l'ail piquant a été développée par Kohman et Farber, Cavallito et al., sont les premiers a avoir déterminé la structure chimique de l'allicine et sa réaction avec la cystéine **[Kohman E. F., 1947 ;Farber L., 1957 ; Cavalitto, C. J. et al., 1944]**.

$$2HSCH_2–CHNH_2–COOH + R–S(O)S–R' \rightarrow R–S–S–CH_2CHNH_2COOH + R'–S–S–CH_2CHNH_2COOH$$

La découverte et la caractérisation de l'alliinase par Stoll et Seebeck **[Stoll A. et Seebeck E., 1949]** a ouvert la voie de la chimie de l'espèce Allium dans les cinquante dernières années.

$$RS\ (O)\ CH2CHNH2COOH + H2O \rightarrow\ [RSOH] + NH_3 + CH_3COCOOH\ (acide\ pyruvique)$$

I.6.2. Méthode colorimétrique pour la détection des thiosulfinates

Les premières études faites au Japon dans la formation des thiosulfinates de l'ail ont conduit à l'élaboration d'une technique de chromatographie (papier) qui s'appuie sur le développement d'une couleur rouge-orangé formé par une réaction avec le nitroprussiate de sodium alcalin. Cette réaction colorée a été limitée par son incapacité à distinguer entre thiosulphonates et THIOSULFINATES et que le développement de la couleur n'est pas permanente. À peu près au même moment, aux Etats-Unis, d'expériences ont été effectuées avec des peptides homocystéine.ces expériences montrèrent que, lorsque les produits d'une réaction entre la N-éthylmaléimide et les thiols sont alcalins, une couleur rouge se développe.

Dans de bonnes conditions, la réaction a été jugée très sensible et la stabilité de la couleur fait adapter à la visualisation des thiols ou des esters de thiols séparés par chromatographie sur papier et pour la détermination colorimétrique. Bien que cette réaction colorée était extrêmement sensible, il a été constaté des interférences à partir de disulfures et il a été ensuite modifié en utilisant le N-éthylmaléimide dans l'alcool isopropylique puis de l'hydroxyde de potassium dans le même solvant. Cette combinaison donne une modification de couleur de rose aux rouges avec thiosulfinates tout les disulfures restent incolores. D'autres améliorations dans les procédures d'extraction (avec l'éther diéthylique) et la stabilité de la couleur (avec l'acide ascorbique) ont produit une méthode fiable pour la détermination colorimétrique de thiosulfinates.

I.6.3. Techniques chromatographiques

Les techniques de chromatographie sur couche mince ont été développées plus loin, ces méthodes de détermination du pyruvate impliquant la résolution, la sensibilité et la quantification réalisables par l'utilisation des techniques modernes telles que GC et la méthodologie HPLC.

I.6.3.1. Chromatographie en phase gazeuse(CPG)

La première référence à la chromatographie gazeuse (GC) est utilisé dans le domaine de la recherche de l'ail ou de l'allium était en 1961 quand Carson utilisé cette technique pour séparer alkyle di-et tri-sulfures **[Carson, J. F. et Wong, F. F., 1961;Lawson, L. D. et al., 1990**].

La méthode GC à été utilisé tout au long des années 1960, probablement parce qu'elle s'agissait d'une nouvelle technique et la disponibilité des équipements fut limitée, mais dès 1964 Saghir et al avait averti que la plupart des composés d'espèces d'allium détectés par GC peuvent être du aux «artefacts de analyse».

En raison de leur excellente résolution et des capacités d'identification de masse, la GC et le couplage GC-MS ont continué à figurer en bonne place dans les efforts visant à caractériser les composés volatiles d'allium, mais bien que ces outils sont d'une grande valeur dans l'étude des composés de la stabilité thermique modérée tels que ceux trouvés dans des huiles distillées, thiosulfinates des espèces d'Allium sont connues pour se décomposer en chauffage **[Saghir A. R. *et al*.,1964].**

L'allicine est très réactive et instable, l'hydrolyse par chauffage dans l'eau pour donner le disulfure de diallyle, diallyle trisulfure et les polysulfures. Brodnitz et al en 1971 ont déterminé l'allicine par GC-MS qui a également fourni des preuves pour un mode inhabituel de décomposition; ils ont indiqué que la GC cause la décomposition du thiosulphinate diallyle (allicine) déshydraté (Fig.I.17.), ce qui donne un mélange de deux composés 3-vinyl-4H-1 ,2-dithiine, et 3-vinyl-6H-1, 2-dithiine **[Brodnitz M. H. et al.,1971].**

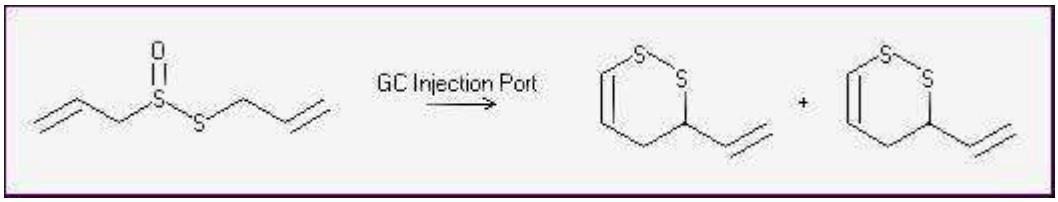


Figure I.17. Décomposition thermique de l'allicine **[Brodnitz M. H., 1971].**

Malgré cela, et d'autres études contemporaines, de nombreux auteurs ont continué à tirer des conclusions basées sur des produits formés par analyse GC des préparations d'Allium utilisant des températures de ports d'injection aussi haut que 280 °C. Poursuite des travaux sur la décomposition de l'allicine a confirmé la formation de deux isomères $C_6H_8S_2$, 3-vinyl-6H-1 ,2-dithiine qui ont été correctement identifié plus tard comme la 2-vinyl-4H-1 ,3-dithiine (figure I.18.).

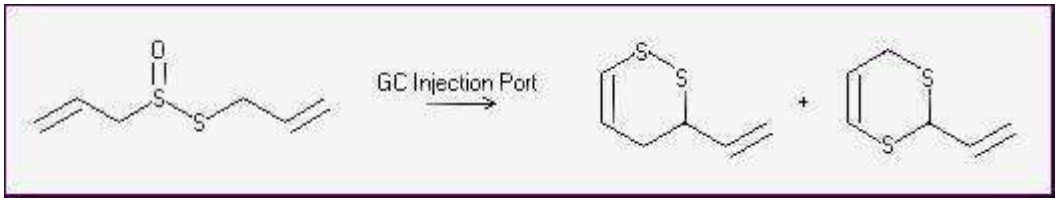


Figure I.18. Décomposition thermique de l'allicine **[Block E. et al., 1986].**

Lors d'un chauffage, le disulfure de diallyle subit une série de réactions complexes qui conduisant à la fois aux polysulfures de diallyle ainsi qu'à une série de composés acycliques et hétérocycliques résultant de la production de la réaction de thioacrolein et des espèces radicalaires $CH_2 = CHCH_2Sn$ avec polysulfures de diallyle précurseur. Comme la plupart de ces composés ont été identifiés dans l'huile d'ail distillée, ils peuvent être supposés provenant de la décomposition thermique du disulfure de diallyle.

Une comparaison des résultats des analyses par HPLC et GC a conduit cependant à une observation inhabituelle: tout simplement parce que le produit a été distillé ne garantit pas qu'elle survivra à l'analyse par GC. Dans une analyse exhaustive GC-MS comparative de deux huiles essentielles de l'ail **[Vernin G. et al., 1986].** Comme on le verra plus tard, tous les composés identifiés sont des produits de dégradation des composés aromatiques primaires (thiosulfinates) d'ail et sont typiques aux résultats de l'analyse par GC à la fois de l'huile d'ail et des extraits qui subissent une décomposition thermique lors de l'analyse.

I.6.3.2. Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC)

A la fin des années 1980 et au début des années 1990 quand les résultats de la GC-MS ont été soumis à une surveillance accrue, les techniques de la HPLC capables d'identifier les composés aromatiques primaires des extraits d'ail sans dégradation thermique ont été mis au point. Bien que certaines lacunes existent avec la méthodes de séparation par HPLC, la variation de temps de rétention pouvant conduire à une mauvaise interprétation des pics et des composés. les techniques sont maintenant très développées et capables de présenter une image fidèle des composés aromatiques primaires des espèces d'Allium.

L'analyse par HPLC des extraits d'ail en allicine a été faite la première fois en 1985 par Miething, qui a analysé des extraits éthérés de produits de l'ail et l'ail en phase normale (Si) HPLC **[Miething H. 1985].** Cette méthode souffre du fait que l'allicine est très instable dans l'éther et dans les autres solvants organiques qui sont nécessaires pour la Si-HPLC et en 1987, Jansen et al ont été les premiers à effectuer l'analyse de l'allicine dans l'extrait aqueux d'ail par HPLC sur une colonne C18 en phase inverse **[Jansen H. et al., 1987].**

I.6.3. 3. HPLC en phase inverse (C18-HPLC)

La séparation, la quantification et la variation dans les compositions de tous les thiosulfinates détectables présents dans l'ail a d'abord été signalée en 1990 avec une méthode standard pour la quantification de l'allicine à l'aide d'un étalon externe. Dans ce rapport, toutes les combinaisons possibles thiosulphinate ont été synthétisées.

La séparation des paires de l'allyle de méthyle / méthyle allylique et de méthyle 1-propenyl/1-propenyl à été si pauvre, mais cela a ensuite été amélioré par HPLC en phase normale. Avec cette méthode de préparation de l'échantillon était relativement simple et filtré, homogénat aqueux a été injecté directement dans la HPLC.

La phase mobile pour la HPLC C18 se composait d'un mélange 50/50 de méthanol et d'eau et les injections directes de méthanol ont été fréquemment utilisées pour prolonger la vie de colonne de garde. Hexane / isopropanol (95:5) a été utilisé pour HPLC en phase normale. Bien que la présence du groupe propyle ait été suggérée que cette étude a été l'un des premiers à confirmer son absence à partir de l'étude d'homogénats de gousse d'ail. Aussi bien qu'il ait été connu que l'allyle propyle thiosulphinate est élue conjointement avec le thiosulphinate allyle 1-propényle, son existence a été écartée en raison de son isomère, propyle allyle thiosulphinate, n'a pas pu être détecté et aucun signal RMN-H caractéristiques des groupes propyle n'a pu être trouvé.

Le seul thiosulphinate prévu, mais pas trouvé, était le di-1-propényl thiosulphinate. Ce composé a été très instable et il a été montré qu'il se forme rapidement et spontanément deux dithiabicyclohexane diméthyle oxydes appelés zwiebelanes. Cette méthode a été complétée par Lawson et al pour identifier et quantifier un certain nombre de produits de dégradation thiosulphinate y compris les sulfures, dithiins vinyle et l'ajoène **[Lawson, L. et al., 1990]**.

I.6.3.4. HPLC en phase normale

A la suite des études comparatives, Block et al ont conclu que les meilleures résolutions maximales ont été obtenues par HPLC en phase normale avec des gradients 2-propanol/hexane **[Block E. et al., 1986].**

Conscient de l'instabilité de thiosulfinates, le travail organique de Block et al a été concentrés sur les procédures d'extraction et de distillation et d'évaluations comparatives **[Block E. et al., 1992].** Par une planification minutieuse de la préparation des échantillons, l'extraction et l'analyse rapide, il a été en mesure de présenter une méthode comparable à la stabilité des méthodes HPLC- C18, mais avec la haute résolution de Si-HPLC.

La préparation des extraits frais de Si-HPLC peut présenter un certain nombre de problèmes, notamment avec la formation d'émulsion et la présence de pigments végétaux et des matériaux cireux. Ce travail a été expérimenté avec des procédés de distillation et d'extraction et a été en mesure de fournir des méthodes avec un excellent accord quantitatif et qualitatif. La distillation a été réalisée avec un vide poussé à la température ambiante et de condensats aqueux ont été recueillies à -196 °C.

Il a été constaté que l'analyse HPLC et RMN spectroscopique du CH_2Cl_2 condensat, extrait du sel saturée a donné de bons profils de composition qualitative du thiosulphinate. On croit que cette méthode de «distillation température ambiante» a connu un succès à cause de l'effet stabilisateur de l'eau, par liaison hydrogène, des thiosulfinates. Toutes les analyses ont été effectuées dans les 30 minutes de l'extraction et de la reproductibilité était excellente.

Les deux methodes Si-HPLC et Cl8-HPLC peuvent être utilisées pour l'identification précise et la quantification des composés individuels. Les Thiosulfinates symétriques peuvent être synthétisés à partir des disulfures par oxydation avec l'acide 3-chloroperbenzoïque.

Les thiosulfinates asymétriques sont préparés d'une manière similaire à partir de leurs précurseurs disulfures asymétriques pour donner des isomères thiosulphinate: allyl-méthyle / méthyle allyle, 1-propényle allyle / l d'allyle-propényle, et le méthyle 1-propenyl/1-propenyl de méthyle.

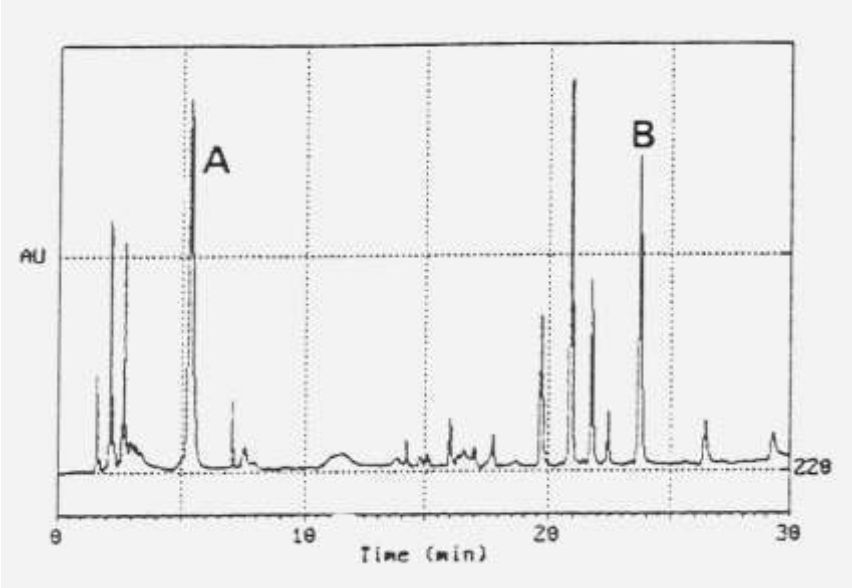
La préparation des disulfures dissymétriques est détaillé dans un certain nombre de publications et implique chlorure de methoxycarbonylsulphinyl, préparé à partir du chlorure de chlorocarbonylsulphinyl et le méthanol, on fait réagir avec un thiol pour donner un intermédiaire disulfane méthoxycarbonyl alkyle. Ce produit intermédiaire est à son tour mis à réagir avec un thiol en présence de triéthylamine pour donner le disulfure. Après distillation suivie par CCM donne des produits purs. Dans les applications commerciales, la quantification de la thiosulphinate, l'allicine et ses principaux alliine précurseur qui est important à cette fin, un certain nombre de méthodes pour la préparation des étalons purs de ces deux composés ont été publiés.

Mayeux et al décrivent un procédé simple permettant la synthèse de l'allicine par oxydation de disulfure du diallyle avec le peroxyde d'hydrogène acide et purifié en utilisant une plaque de Si-CCM développé dans un mélange hexane / acétate d'éthyle immergé dans l'eau glacée **[Mayeux P. et al., 1988].** En variante l'allicine pur peut être isolé par Si-CCM de l'extrait d'acétate d'éthyle d'une solution aqueuse d'une poudre d'ail de qualité commerciale ou d'un homogénat de l'ail frais. (Si l'ail frais est utilisé, la C18-TLC est nécessaire pour séparer la thiosulphinate 1-propényle allyle qui sont co-élue avec l'allicine sur Si-TLC) Des travaux récents ont conduit à l'élaboration d'une méthode pour la détermination simultanée de l'alliine et l'allicine par échange d'ions en phase inverse LC.

La préparation implique le séchage des tranches d'ail fraîches suivi d'une extraction avec du méthanol à 80%. Le méthanol est ensuite concentré à l'évaporateur rotatif, puis partagé avec de l'éther diéthylique.

La couche d'éther diéthylique est éliminé et la phase aqueuse chargée sur une résine pré-équilibrée échangeuse d'ions et on les laisse égoutter. La résine est lavée avec de l'eau jusqu'à ce que les lavages soient neutres au papier de tournesol et l'alliine retenue sur la résine est éluée avec de l'hydroxyde d'ammonium. Après lyophilisation, l'alliine est cristallisé dans l'éthanol à 70% et une recristallisation répétée donne des aiguilles blanches de l'alliine pure. Alliinase est extraite à partir d'homogénats d'ail frais et de son action sur l'alliine donne l'allicine pur.

À la fois l'alliine et l'allicine préparé de cette manière sont utilisés comme standards externes pour la quantification simultanée des composés dans les échantillons de l'ail. Des extraits aqueux des échantillons étudiés ont été injectés dans une colonne TSK-gel (150 x 4,7 mm), la phase mobile étant un tampon phosphate 0,01 M (pH 2,5) + 5 mM d'acide heptanesulphonic (A) et 0,01 M de tampon phosphate (pH 2,5) + acétonitrile (50:50) (B). Le gradient d'élution et le contrôle de la température (40 °C) ont été utilisés avec cette méthode, qui prévoit un examen rapide et simple quantitatif des échantillons d'ail.



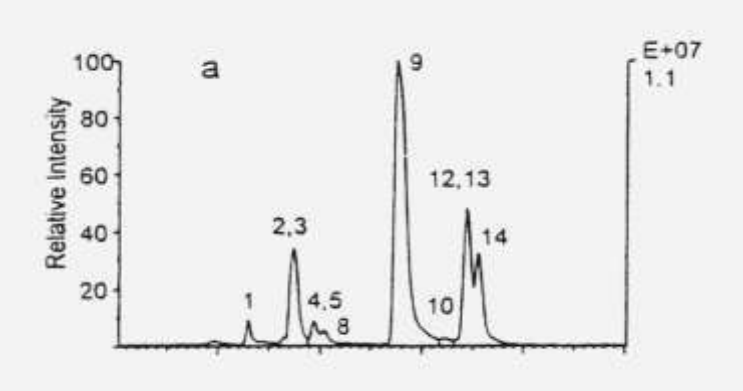
La figure I.19. Chromatogramme de l'extrait au méthanol de l'ail frais: Un alliine,, B, l'allicine

I.6.3.5. Couplage LC-MS

Au cours des huit dernières années, de grands efforts ont été faits pour combiner la séparation par HPLC avec les capacités d'identifications puissantes de la spectrométrie de masses(MS). Alors que les premiers travaux ont donné des résultats prometteurs, Ferary et al ont utilisé LC-MS pour examiner les odeurs allium et déterminer si oui ou non ils contenaient des composés de dégradation de thiosulfinates **[Ferary S. et al., 1996].** En utilisant une technique cryopiégeage de CLHP équipé d'un détecteur UV et couplé à un spectromètre de masse.

Un certain nombre de couplages commerciaux différents et des systèmes d'ionisation ont été testés, de meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), une certaine dégradation de thiosulfinates a été observée, Calvey et al ont récemment fait état d'une amélioration de la méthode ci-dessus en utilisant phase inverse LC-MS et LC MS en tandem (LC-MS-MS) avec un couplage APCI **[Calvey E. M. et al., 1994].**

Tous les thiosulfinates majeurs ont étaient facilement caractérisés par cette technique et pour la première quantité des traces de temps de composés propylés ont été trouvés dans l'ail. (Faible absorbance UV, faible concentration).



La figure I.20. Chromatographe ionique total de l'extrait d'ail typique **[Shafiur et al., 2010]**

I.7. Propriété antimicrobienne

I.7.1. Propriété antibactérienne de l'ail

Les propriétés antibactériennes de l'ail écrasé ont été connues depuis longtemps. Diverses préparations d'ail ont été montrées à large spectre antibactérien de l'activité contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives y compris les espèces Escherichia, Salmonella, Staphylococcus, Streptococcus, Klebsiella, Proteus, Bacillus, et Clostridium. Même les bactéries acido-résistants tels que Mycobacterium la tuberculose sont sensibles à l'ail **[**Uchida Y. et al., 1975**].** Les extraits d'ail sont également efficaces contre Helicobacter pylori, provoquer des ulcères gastriques **[Cellini L. et al., 1996].**

Extraits d'ail peut également empêcher la formation de Staphylococcus entérotoxines A, B, et C1 et également thermonucléase **[Gonzalez-Fandos E. et al., 1994].** D'autre part, il semble que l'ail n'est pas efficace contre la formation de toxines de Clostridium botulinum **[Gimenez MA. Et al., 1988].** Cavallito et Bailey **[Bloc E., 1985]** ont été les premiers à démontrer que l'action antibactérienne de l'ail est due principalement à l'allicine **[Cavallito C.et Bailey JH., 1944].**

La sensibilité de différents isolats bactériens cliniques et à des préparations pures de l'allicine **[Rabinkov A. et al., 1998]** est très importante. Comme le montre le tableau I (Mirelman et al., Résultats non publiés) le spectre de l'effet antibactérien de l'allicine est large. Dans la plupart des cas, 50% des concentrations étaient un peu plus élevés que celles requises pour certains des antibiotiques les plus récents.

Les diverses souches bactériennes résistantes aux antibiotiques tels que Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline ainsi que d'autres souches multirésistantes enterotoxicogenic Escherichia coli, Enterococcus, Shigella dysenteriae, S. flexneri et S. sonnei cellules se sont tous révélés être sensibles. L'allicine a également eu une activité antibactérien in vivo contre S. flexneri Y lors d'un essai chez un modèle de lapin shigellose **[Chowdhury AK. et al., 1991].**

D'autres souches bactériennes, telles que les souches Mucoïdes de Pseudomonas Aeruginosa, Streptococcus, Hemolyticus et Enterococcus faecium ont été trouvés pour être résistant à l'action de l'allicine. Les raisons de cette résistance ne sont pas claires. Il suppose que les couches capsulaires hydrophiles ou mucoïde empêchent la pénétration de l'allicine dans la bactérie, mais cela doit être étudié plus en détail. Un effet synergique de l'allicine contre M. tuberculosis a également été trouvé avec des antibiotiques tels que la streptomycine ou chloramphénicol **[Gupta KC. et Viswanathan R., 1955].** Un aspect très intéressant de l'ail.

Tableau I.2. Sensibilité des différentes espèces bactériennes à l'allicine.

souche bactérienne	**concentration allicine (DL50 mg / mL)**	**commentaires**
Escherichia coli Escherichia coli	15	sensible aux antibiotiques
multirésistante	15	résistante (MDR)
Staphylococcus aureus	12	sensible
Staphylococcus aureus	12	résistant à la méthicilline
Streptococcus pyogenes	3	Sensible
Streptococcus? Hemolyticus	> 100	souche MDR clinique
Proteus mirabilis	15	sensible
Proteus mirabilis	> 30	souche MDR clinique
Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas	15	sensible à cefprozil
aeruginosa	> 100	souche mucoïde MDR
Acinetobacter baumanii Klebsiella	15	Isolat clinique
pneumoniae Enterococcus faecium	8	Isolat clinique
	> 100 souche MDR clinique	souche MDR clinique

DL50: dose létale 50%.

L'activité antibactérienne de l'allicine est l'apparente incapacité des la plupart des bactéries à développer une résistance à ce parce que le mode d'action est complètement différente de celle des autres substances antibiotiques. Le développement de la résistance aux bêta-lactamines est 1000 fois plus facile que le développement de la résistance à l'allicine **[Gupta KC. et Viswanathan R., 1955].**

I.7.2. Activité antifongique de l'ail

Extraits d'ail ont également un fort effet antifongique et inhiber la formation de mycotoxines comme l'aflatoxine de Aspergillus parasiticus **[Lawson LD., 1996].** L'allicine est supposé être le composant principal responsable de l'inhibition de la croissance des champignons. Un extrait d'ail concentré contenant 34% d'allicine, 44% de thiosulfinates total et 20% de vinyldithiins, possédent une activité fongistatique et fongicide contre trois isolats différents de Cryptococcus neoformans.

La concentration minimale inhibitrice de l'extrait d'ail concentré contre 1 × 105 organismes de C. neoformans varie de 6 à 12 g / ml. En outre, en vitro une activité synergique fongistatique avec l'amphotéricine B a été démontrée contre toutes les souches de C. neoformans **[Davis LE. Et al., 1994].** L'allicine pur a été trouvé pour avoir une grande activité anticandidal avec une concentration inhibitrice minimale de 7 g / mL **[Hughes BG. et Lawson LD., 1991].** Yamada et Azuma **[Yamada Y. et Azuma K., 1997]** suppose que l'allicine pur est efficace in vitro contre les espèces de Candida, Cryptococcus, Trichophyton, Epidermophyton et Microsporum à faible concentration (concentrations minimales inhibitrices de l'allicine est entre 1,57 et 6,25 g / ml). L'allicine inhibe la germination des spores et la croissance d'hyphes **[Yamada Y. et Azuma K., 1997].** Les sensibilités des différents levures à une préparation pure de l'allicine ont été déterminées et s'est révélé être très important **[Mirelman et al., résultats non publiés].** Le mode d'action de l'allicine sur la cellule fongique n'a pas encore été élucidé mais il est supposé qu'il fonctionne sur les enzymes thiols comme dans d'autres microorganismes.

Tableau I.3. Effet de l'allicine sur divers fongiques pathogènes.

souche fongique	Concentration de L'allicine (MIC mg / ml)	commentaires
Candida albicans	0,3	
Candida albicans	0,8	isolats cliniques
Candida Neoformans	0,3	
Candida parapsilosis	0,15	
Candida tropicalis	0,3	
Candida krusei	0,3	
Torulopsis glabrata	0,3	
Torulopsis glabrata	1,9	isolats cliniques

I.8. Propriété anti oxydation de L'ail

Le stress oxydatif est documenté comme étant impliqués dans la pathogenèse des maladies chroniques, y compris cardiovasculaires troubles et le cancer. Par conséquent, des composés avec des propriétés antioxydants peuvent être utilisés pour prévenir le stress oxydatif médie maladies **[Mayne ST., 2003].** De nombreuses études ont démontré que l'ail et ces organo- composés peuvent être des antioxydants puissants.

Extrait d'ail vieilli et SAC a été démontré qu'il protège l'endothélium cellulaire **[Ide N. et Lau BH., 1997],** et de défendre les cellules neuronales des dommages causés par l'hydrogène de peroxyde [**Ray B. et al., 2011].** L'extrait d'ail a été prouvée pour être aussi efficace comme la N-acétylcystéine dans la réduction de la formation de ROS et RSH, L'épuisement induite par l'acétaminophène dans les hépatocytes primaires de rat **[Anoush M. et al., 2009].** Le prétraitement à l'ail avec 1 g / kg pendant 5 semaines réduit la peroxydation des lipides catalysée par le fer en abaissant le niveaux malondialdéhyde dans le foie du rat et du côlon, ainsi que l'amélioration du statut des antioxydants **[Un Nahdi et al., 2010].** De même, l'ail réduit le fer induite par la cellule de prolifération de l'autophagie et protège le membranes mitochondrial en abaissant le stockage du fer dans le foie **[Un Nahdi et al., 2010].**

L'huile d'ail est efficace dans la réduction de tributylétain induite par les dommages oxydatifs dans les souris et les cellules amniotiques humaines **[Liu HG. et Xu LH., 2007],** ainsi que diminuer le nitrite de sodium neurotoxicité induite chez le rat **[Hassan HA. et al ., 2010].** La protection contre les dommages de l'ail susmentionné peuvent être attribués à une augmentation de l'activités de la superoxyde dismutase, glutathion réductase, g-glutamate ligase cystéine, et aussi à la production de GSH **[Hassan HA. et al ., 2010 ; Wu CC. et al., 2001].** L'ail joue un rôle clé dans l'amélioration à la fois de la capacité de défense antioxydant et aux enzymes du métabolisme des médicaments, tel que décrit ci-dessus **[Kay HY. et al., 2011].**

Les propriétés antioxydantes de l'ail ont été constatées dans des modèles animaux malades. l'extrait aqueux d'ail atténue le stress oxydatif et prévient le remodelage vasculaire par suppression de NAD (P) H oxydase **[Vazquez-Prieto MA. et al., 2010].**

Dans un modèle des souris malades de diabète type 2, la consommation de 5% d'ail noir lyophilisé vieilli pendant 7 semaines a soulevé la superoxyde dismutase, la catalase, et l'activité de la glutathion peroxydase et de lipides amoindrie la peroxydation dans le foie **[Lee YM. et al., 2011].** Chez les rats avec diabète induite par streptozotocine, l'huile d'ail aide à normaliser le statut anti-oxydant **[138].**

Moins des dommages de neurone accompagné des niveaux accrus de synaptophysine présynaptiques et SNAP25, ces effets ont été observés dans la maladie d'Alzheimer APP transgéniques des souris traitées avec un régime contenant 2% d'extrait d'ail et de son composant actif SAC (20 mg / kg d'aliments) **[Ray B. et al., 2011].** SAC permet également de réduire la peroxydation des lipides et de la superoxyde, la production des radicaux est élève en Cu-Zn-superoxyde dismutase activité en 1-méthyl-4-phénylpyridinium induite parkinsonisme chez la souris **[Rojas P. et al., 2011].**

Ces dernières années, plusieurs études d'intervention humaine ont examiné le pouvoir antioxydant de l'ail chez les humains. Deux mois de traitement avec l'huile d'ail (250 mg / j) réduit la supplémentation fortement oxLDL (LDL oxydé) et 8-iso-prostaglandine F2 niveaux alpha, accompagnée d'une baisse significative de la tension artérielle systolique et la pression artérielle diastolique, chez les patients hypertendus **[Dhawan V., Jain S., 2004].** Une baisse similaire de la production oxLDL a été rapporté par dosage fait sur 70 adultes hypertendus avec 1620 mg / j de macérat huileux d'ail **[Duda G. et al., 2008].** Les niveaux de plasma oxLDL fortement diminué dans ceux administrés (200 mg / j) d'extrait d'ail combiné avec multi-micronutriments (acide folique, vitamines B6 et B12, et L-arginine) pour 1 an, par rapport à un témoins **[Budoff MJ. et al., 2009].**

Ces résultats suggèrent que l'ail a une activité antioxydante puissante pour retarder l'apparition et le développement des maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète et les maladies neurodégénératives liées à un déséquilibre entre production de radicaux libres et de défense antioxydant.

I.9. Fermentation

I.9.1. Définition

Une fermentation est la transformation de substances organiques (ici les légumes) sous l'action d'enzymes (encore appelées " ferments ") produites par des micro-organismes. Il en existe de différentes natures (alcoolique, lactique, acétique...) selon le produit obtenu (alcool, acide lactique, acide acétique...).

Les micro-organismes intervenant dans les fermentations sont de deux types. Les *bactéries* sont des êtres vivants unicellulaires indispensables à la vie, elles participent à tous les processus de décomposition de la matière organique et jouent un rôle prépondérant dans la fermentation lactique.

Les *champignons microscopiques* regroupent les levures et les moisissures. Les levures interviennent notamment dans les fermentations alcooliques. Les moisissures altèrent très souvent les aliments mais il en existe de "bonnes" utilisées par exemple dans la fabrication des fromages (roquefort, camembert...). Dans un milieu favorable, ces micro-organismes se multiplient très rapidement. Ils sont détruits par la chaleur mais simplement inhibés par le froid.

I.9.2. Processus de fermentation

Le processus de fermentation se déclenche quand les conditions de température, d'acidité, d'oxygène et de nutriments favorables aux micro-organismes sont réunies. Ceux-ci synthétisent alors les enzymes nécessaires à la décomposition des grosses molécules (telles les glucides qui leur fournissent l'énergie) en molécules plus petites qu'ils peuvent assimiler. Il s'ensuit une succession complexe de réactions chimiques qui conduisent au produit final.

I.9.3. Différentes types de fermentations

- La *fermentation alcoolique* transforme les sucres en alcool et en gaz carbonique essentiellement sous l'action de levures. C'est une fermentation anaérobie (en l'absence d'oxygène). Elle est utilisée, par exemple, dans la confection des boissons (vin, bière) et du pain.
- La *fermentation lactique*, également anaérobie, transforme les sucres en acide lactique. Elle est principalement réalisée par l'action de bactéries lactiques et intervient dans la transformation de nombreux aliments (produits laitiers, charcuterie, conservation des légumes...)
- La *fermentation acétique* se fait en présence d'oxygène (fermentation aérobie), elle est réalisée par des bactéries acétiques qui transforment l'alcool en acide acétique principal constituant du vinaigre.
- Il existe d'autres types fermentations (*propionique*, *butyrique*...)

Lors d'un processus de fermentation, les différentes espèces de micro-organismes (et donc les différents types de fermentation) entrent en concurrence. Le produit final est donc toujours le résultat de plusieurs types de fermentation.

I.9.4. Fermentation d'ail

L'ail vieilli correspond à un processus de fermentation utilisant certaines bactéries de type lactique (*Streptococcus*, Lacto*bacillus* et certains *Bacillus*...). C'est ainsi que par exemple dans la choucroute on a pu dénombrer vingt-sept souches de bactéries lactiques.

Cette fermentation permet de conserver les aliments grâce à l'acidité ce qui empêche la prolifération des autres micro-organismes, comme les moisissures. En outre, ce milieu concentre les vitamines et les minéraux dans les aliments que l'on veut conserver.

La réaction chimique est la suivante:

$$C6\ H12\ O6 + 2\ ADP + 2\ P > 2\ C3\ H6\ O3 + 2\ ATP$$

Sucre + adénosine + phosphore > acide lactique + énergie

III .1. Qualité de l'extrait obtenu

Deux types d'extrait d'ail sont préparés dans ce travail:

III.1.1. Extrait aqueux d'ail

Dans ce cas on utilise l'eau distillé comme solvant pour l'obtention d'un extrait aqueux d'ail frais (Figure III.1).



Figure III.1. Extrait aqueux d'ail frais.

III.1.1.1. Caractéristiques organoleptiques de l'extrait aqueux d'ail

Les caractéristiques organoleptiques de l'extrait aqueux d'ail sont exposées dans le tableau suivant :

Tableau III.1. Caractéristiques organoleptiques de l'extrait aqueux d'ail

Couleur	Jaune clair
Odeur	Piquante
Aspect	Homogène

III.1.2. Extrait méthanolique d'ail:

Pour l'obtention d'un extrait méthanolique d'ail frais on utilise le méthanol comme solvant d'extraction (Figure III.2).



Figure III.2. Extrait méthanolique d'ail frais.

III.1.2.1. Caractéristiques organoleptique de l'extrait méthanolique d'ail

Les caractéristiques organoleptiques de l'extrait méthanolique d'ail sont exposées dans le tableau suivant :

Tableau III.2. Caractéristiques organoleptiques de l'extrait méthanolique d'ail

Couleur	Jaune foncé
Odeur	Piquante
Aspect	Homogène

III.2. Détermination approximative de taux d'humidité de l'ail frais utilisé

Le taux d'humidité obtenu dans 30g d'ail frais après le séchage dans une étuve de 100°C est : 63,33% (19g d'eau dans 30g d'ail frais).

Tableau III.3 : masse de l'ail en fonction de temps à T=100°C

t (heure)	0	4	5	6	7
La masse(g)	30	12	11	11	11

Les étapes de vaporisation de l'eau contenue dans l'ail frais est représenté dans la figure suivante :



Figure III.3. Ail en fonction de temps à T=100°C ;(a)l'ail frais à t=0 ; (b) t=4heurs ; (c) t=6heurs ; (d) t=7heurs.

III.3.Etude physico-chimique de l'extrait d'ail

On utilise trois techniques d'analyses pour caractérisé l'extrait aqueux d'ail frais. Pour UV-visible (voir l'annexe).

III.3.1. Spectroscopie infrarouge (IR)

On résume les principaux pics des spectres infrarouges dans le tableau suivant :

Tableau III.4. Résultats de l'absorbance dans l'IR.

Liaisons chimiques	***Nombres d'ondes (cm-1)***
C-S-O-S-C	1080- 1150
C=C	1625-1680
CH_3	2900-3100
CH_3	2345,71
C-H	1400,07
C-H	910-985
C-H aromatique disubstitué méta	800-860

Le spectre IR de l'extrait aqueux de l'ail frais est donné dans la **figure III.4**

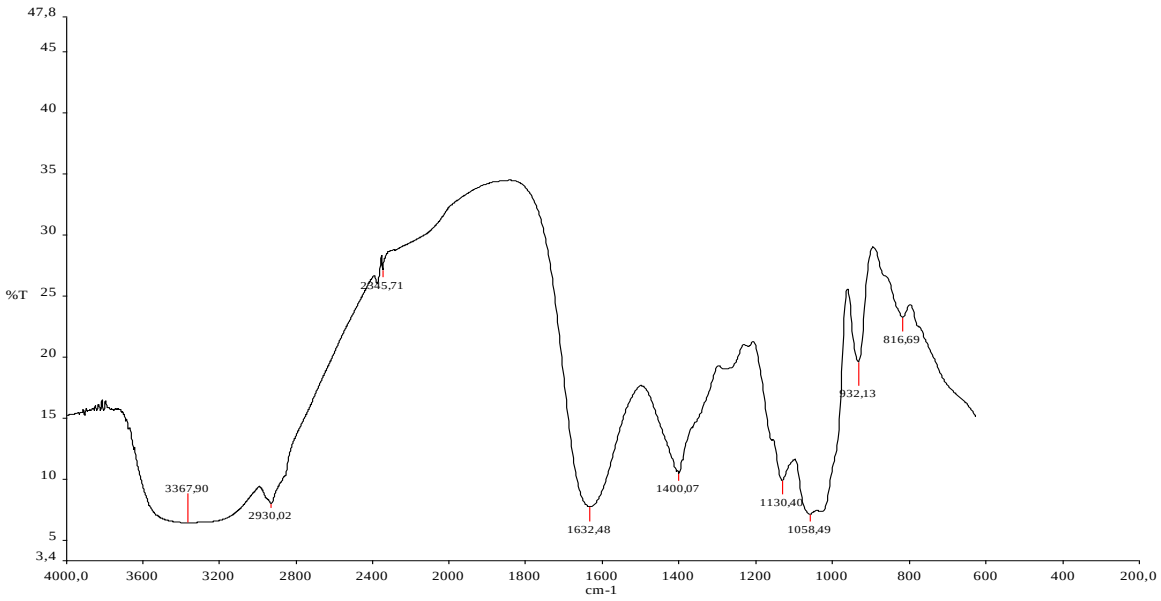


Figure III.4. Spectre IR de l'extrait aqueux d'ail.

III.3.1.1. Discussion

La figure III.4.Montre le spectre IR de l'extrait aqueux d'ail. On observe une bande d'absorption comprise entre 1080 et 1150 cm^{-1}, caractéristique du groupe C-S-O-S-C spécifique d'un composé soufré. Une forte absorption est signalée entre 1625et1680cm^{-1}. Cette dernière est une bande caractéristique de la liaison C=C.la bande d'absorption entre 800et 950cm-1 caractérisant le groupe S-C a également remarquée sur le spectre. Nous signalons aussi la présence de radicale CH3 dans la région du spectre comprise entre 2900et3100cm-1.

III.3.2. Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC)

- **Conditions d'analyse :** Les conditions utilisées l'or de l'analyse par HPLC sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau III.5. Conditions d'analyses par HPLC **[SAIDAL].**

Langueur d'onde	254nm
Colonne	C18
Phase mobile	Acétonitrile /eau 50/50
Température de travail	25°c
Volume injecté	20 µl

III.3.2.1. Le standard :

- **Produit analysé** : alanine.

La figure III.5. représente le spectre d'alanine**(acide aminé)**par l'analyse de HPLC .

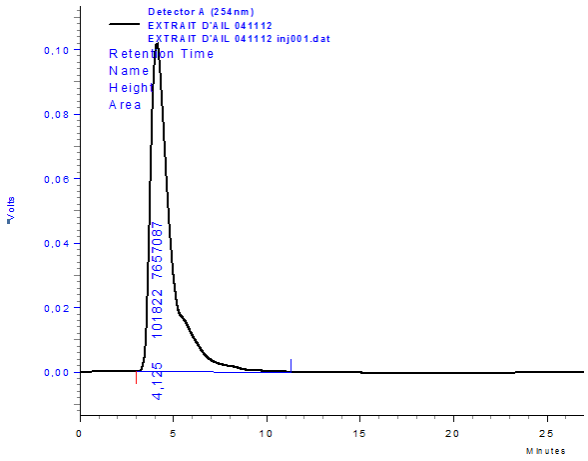


Figure III.5. Présentation graphique d'analyse par HPLC d'alanine (le premier pic correspond à l'alanine)

III.3.2.2.L'échantillon :

- **Produit analysé** : extrait d'ail.

Le chromatogramme de l'extrait aqueux d'ail est représenté par la figure suivante :

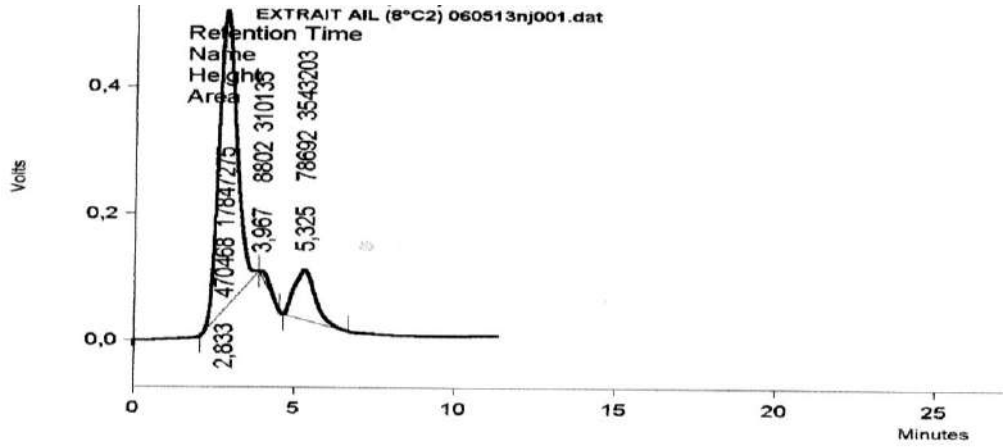


Figure III.6. Chromatogramme de l'extrait aqueux d'ail.

III.3.2.3. Stabilité thermique de l'extrait d'ail

Dans le tableau suivant on donne la variation de la hauteur de2ème pic et de 3ème pic de spectre de l'extrait d'ail en fonction de la température

Tableau III.6. Hauteur des pics dans l'extrait aqueux d'ail en fonction de la température de conservation (analyse HPLC).

Température de conservation	*La hauteur de 2ème pic*	*La hauteur de 3ème pic*
8°C	8802	78693
25°C	16612	73630
35°C	16167	72130
100°C	0	0

La figure III.7. Représente les spectres d'analyse par HPLC de l'extrait aqueux d'ail à déférentes températures.

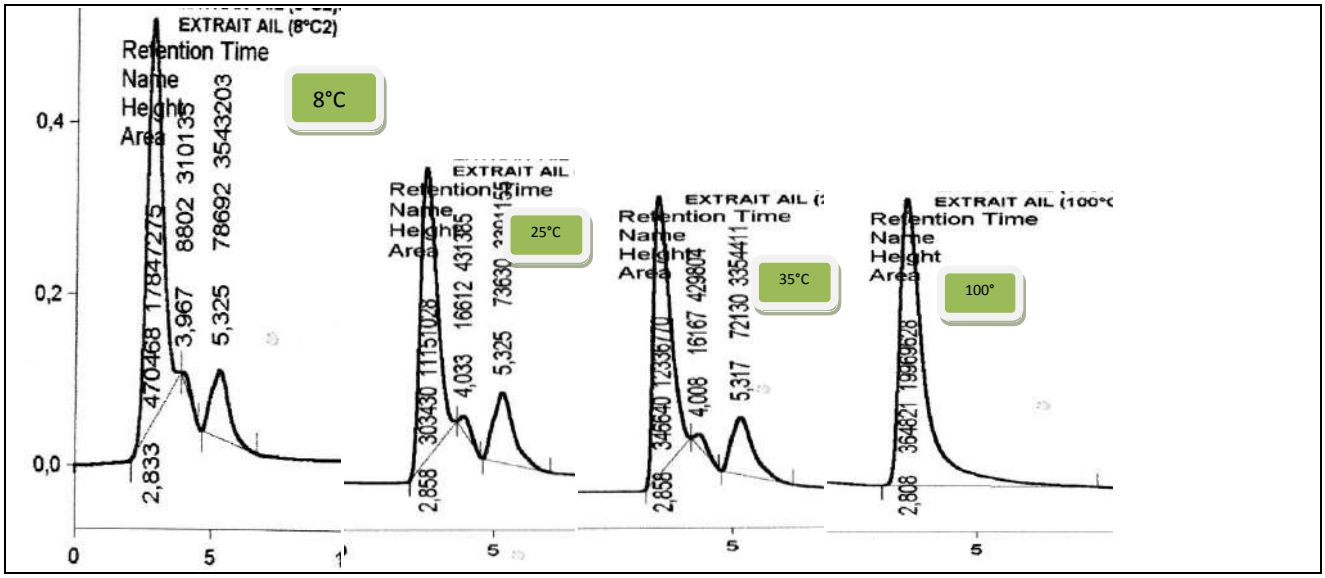


Figure III.7. Spectres d'analyse par HPLC de l'extrait aqueux d'ail à déférentes températures.

III.3.2.2.1. Discussion

D'après l'étude de la stabilité de notre extrait aqueux d'ail par HPLC, nous signalons la présence d'une instabilité thermique, vu que le deuxième et le troisième pic de spectre disparaissent progressivement au fur et à mesure que la température croit, une disparaissions complète des pics à 100°C. En comparant ces résultats avec celle obtenus avec le produit standard (figure III.5.) nous pouvant dire que le deuxième pic de spectre correspond à l'alliine***(3-(2-propénylsulfinyl) alanine*)**.

La température de 8°C est celle qui donne une grande stabilité de l'extrait aqueux d'ail.

III.4.Activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'ail

III.4.1. Activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail

Les résultats de l'effet antibactérien de l'extrait d'ail vis-à-vis des trois souches bactériennes utilisées dans cette étude sont représentés comme suite :

III.4.1.1. Diamètre des zones d'inhibitions

Le tableau suivant représente les diamètres des zones d'inhibitions des trois souches bactériennes étudiées.

Tableau III.7. Résultats des diamètres des zones d'inhibition (aromatogramme).

souches	***Diamètre d'inhibition (cm)***
s.aureus	3, 3
bacilus	3,9
E.coli	3,2

La figure suivante représente les aromatogrammes de l'extrait aqueux d'ail pour les trois souches bactériennes



Figure III.8. Aromatogramme de l'extrait aqueux d'ail (a) *E. Coli* ;(b) *bacillus subtilis*; (c) *Stphy-Aureus*.

III.4.1.2.Détermination de la CMI :

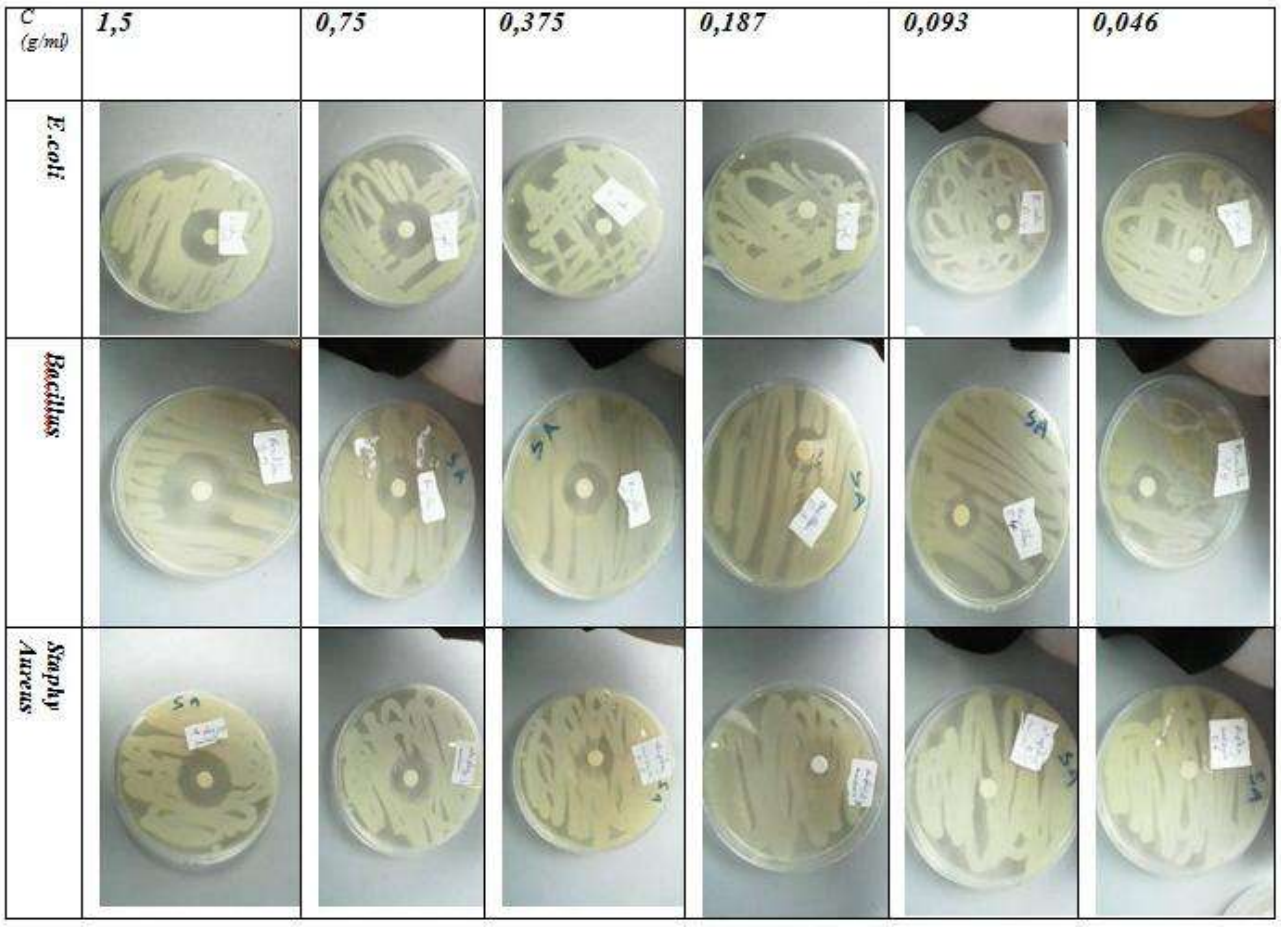
Pour la détermination de la CMI nous utilisons la méthode de diffusion sur gélose en milieu solide. Les résultats obtenus à partir de 9 concentrations déférentes de l'extrait aqueux d'ail sont résumés dans le tableau suivant :

Tableaux III.8. Diamètres des zones d'inhibition à différentes concentrations de l'extrait d'ail.

concentration en extrait d'ail(g/ml)	***Diamètre d'inhibition (cm)***		
	Staphy.aureus	***Bacillus***	***E.coli***
1,5	3,3	3,9	3,2
0,75	2,7	2,9	3
0,375	2,1	2,6	2,5
0,187	1,9	2,1	2,3
0,093	1,7	2	1,8
0,046	0,9	1,9	1
0,023	-	1,1	-
0,0115	-	0,9	-
0,0057	-	-	-

Les zones d'inhibition de l'extrait aqueux d'ail pour déférentes concentrations sont présentées dans le tableau ci- dessous

Tableaux III.9. Zones l'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait aqueux d'ail



Pour la souche bactérienne *E .coli*. Le résultat de l'influence de la concentration sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail est représenté par la figure suivante :

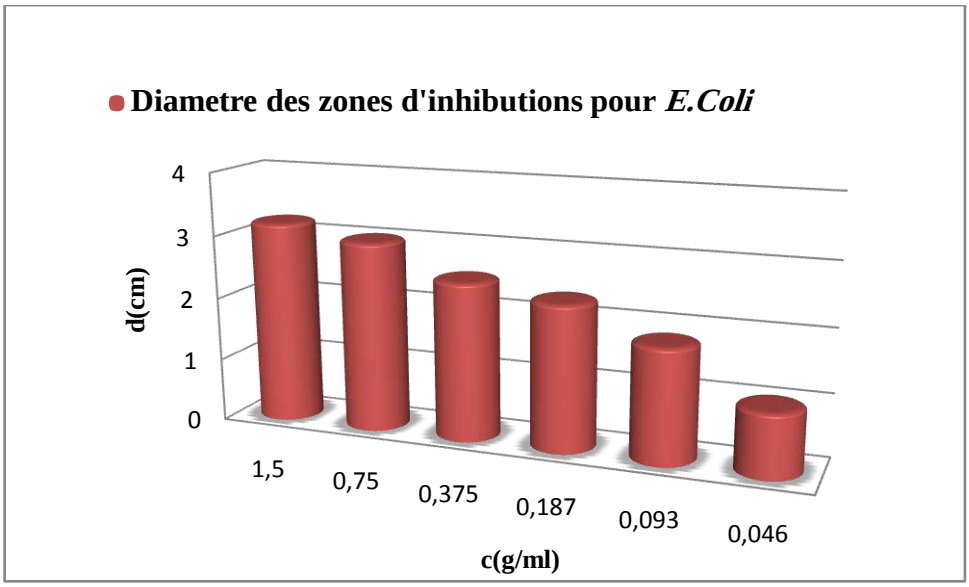


Figure III.9. Influence de la concentration sur le diamètre d'inhibition pour l'*E .coli*.

Le résultat de l'influence de la concentration sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail pour la souche bactérienne *bacillus* est exposé dans la figure suivante :

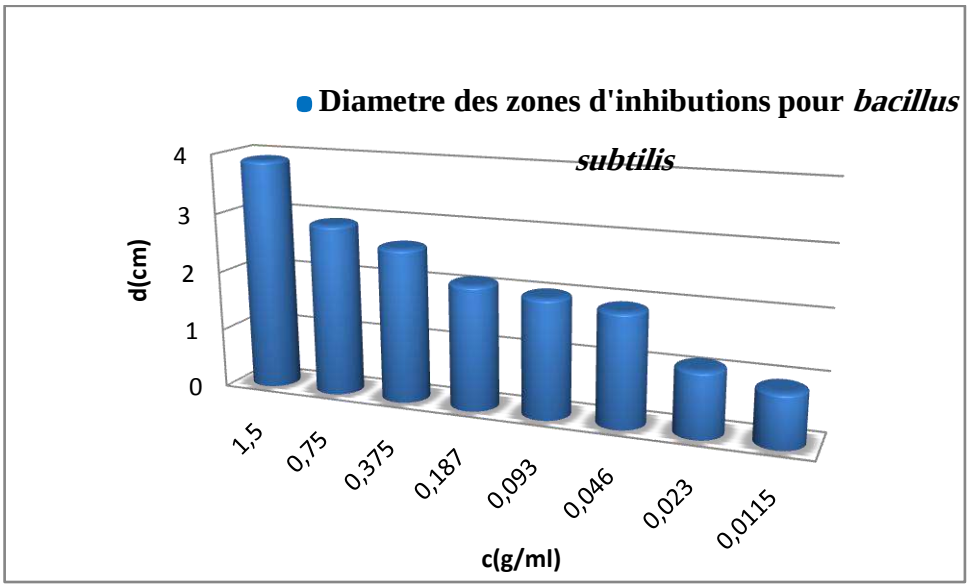


Figure III.10. Influence de la concentration sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail pour *bacillus*.

Pour la souche bactérienne *staphy-aureus*, l'effet de la concentration sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail est exposé dans l'histogramme suivant :

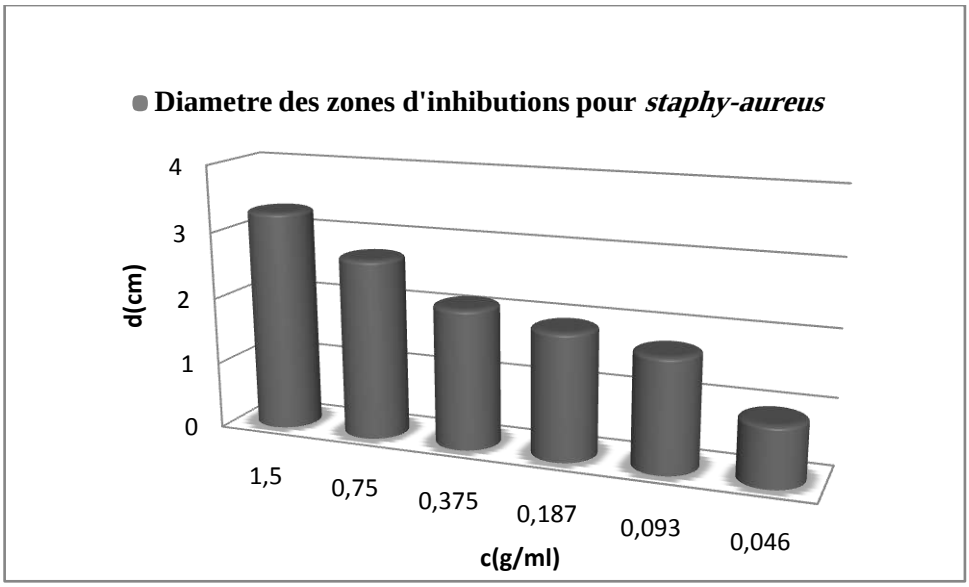


Figure III.11. Influence de la concentration sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail pour *staphy-aureus*.

La figure suivante représente la variation de l'activité antibactérienne en fonction de la concentration de l'extrait aqueux d'ail pour les trois souches bactériennes.

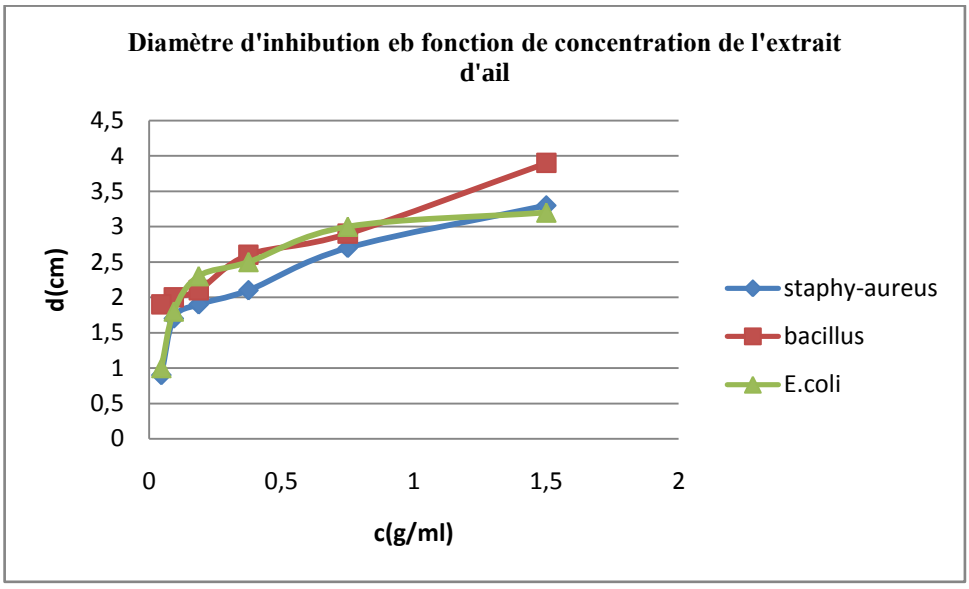


Figure III.12. Diamètre d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait aqueux d'ail pour les trois souches.

L'incubation à été faite à température ambiante pour éviter la volatilité des extraits.les résultats obtenus révèlent que le diamètre d'inhibition diminue avec la diminution de la concentration de l'extrait. La valeur de la CMI pour chaque souche bactérienne est donnée dans le tableau suivant :

Tableaux III.10. CMI pour chaque bactérie en (cm).

souche	*Staphy-aureus*	*bacillus*	*E.coli*
CMI(g /ml)	0.046	0.0115	0.046

III.4.1.3. Discussion

D'après les résultats obtenus, on peut dire que :

- L'extrait aqueux d'ail est actif sur les trois souches étudié: *staphy-aureus, bacillus subtilis, Escherichia coli.*
- Plus que les concentrations le l'extrait aqueux d'ail augmentent, plus les diamètres d'inhibition augmentent, l'activité antibactériennes est importante.
- Ce pouvoir antibactérien de l'extrait d'ail est dû à la présence de l'allicine (**allyl-2 propènethiosulfate**), le composé soufré responsable de cette activité antibactérienne **[Block E., 1992].** L'activité antibactérienne de l'ail est plus significatif pour *bacillus* et *staphy-aureus* par rapport à *E. coli* qui présente une certain résistance. Nous pouvons dire que les souches à gram (-) sont moins sensibles que celle à gram (+). cette déférence est due à la composition chimique de la paroi des bactéries à gram (-) qui présentent des structures spéciales: les LPS (lypopolysaccharides), qui empêchent la pénétration des molécules hydrophiles.**[Boulahbal F., 1993;Rahal K. et un groupe de collaborateurs, 2003 ;Janssen AM et Scheffer JJC and Baerhein Svendsen A., 1987;Benjilali B., et al., 198].**

III.4.1.4. Effet de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail

Les figures suivantes donnent la variation des zones d'inhibition pour *E. coli*, *Staphyloccoucs aureus, Bacillus subtilis* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé aux différentes températures (8,25, 35 et 100°C).

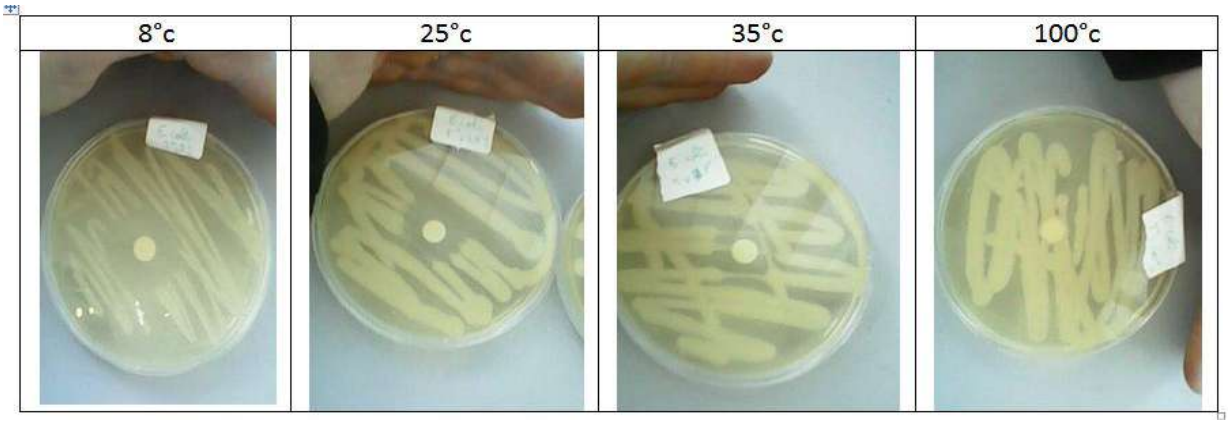


Figure III.13. Zones d'inhibition pour *E.coli* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé aux différentes températures (8-100°C).

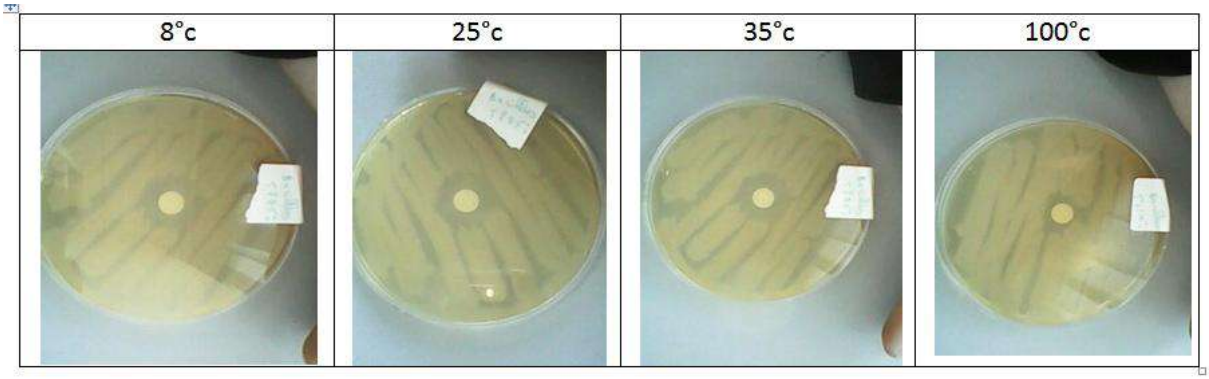


Figure III.14. Zones d'inhibition pour *Bacillus subtilis* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé aux différentes températures (8-100°C).

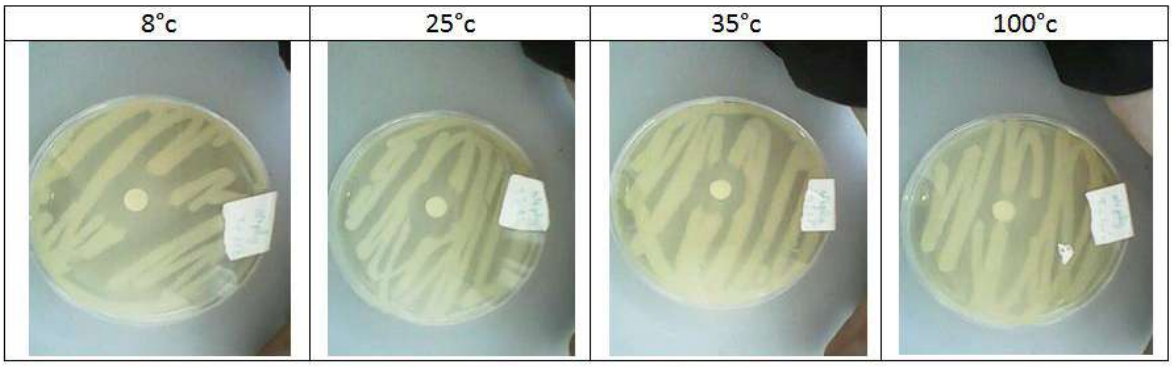


Figure III.15. Zones d'inhibition pour *Staphyloccoucs aureus* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé aux différentes températures (8-100°C).

L'influence de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour *l'E.coli* est représenté par l'histogramme suivant :

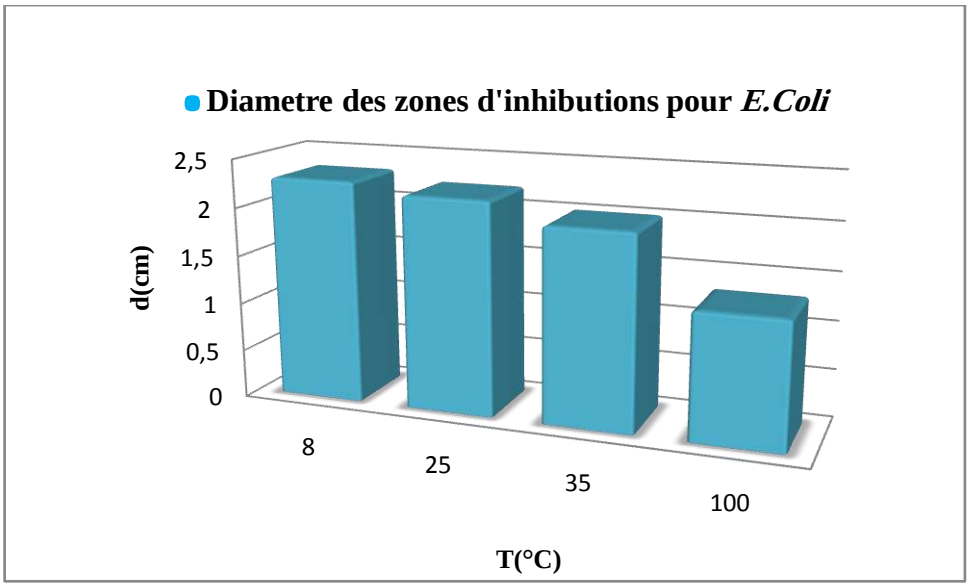


Figure III.16. Influence de température sur l'activité antibactérienne d'extrait aqueux d'ail pour *l'E.Coli.*

Pour *bacillus* l'influence de température sur l'activité antibactérienne d'extrait aqueux d'ail est représenté par l'histogramme suivant :

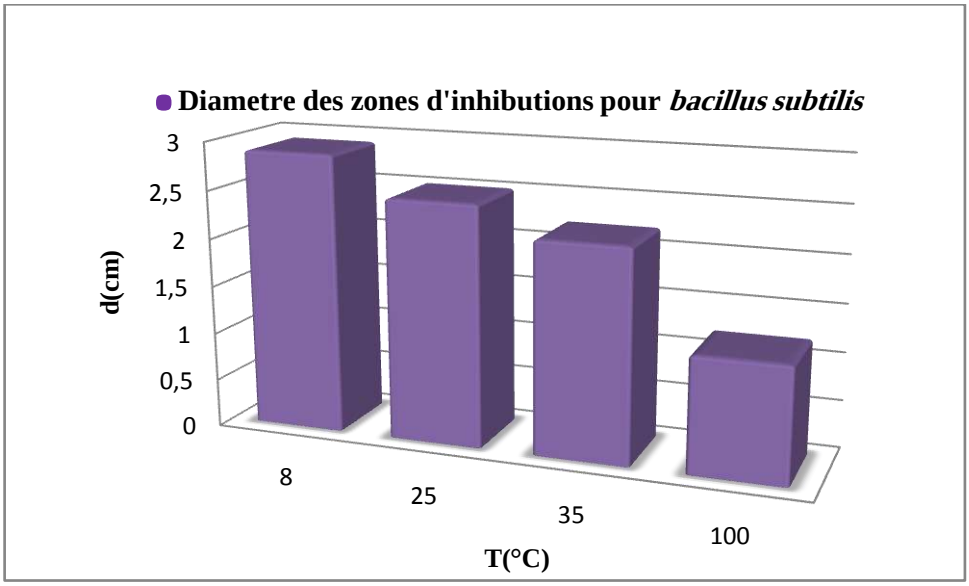


Figure III.17. Influence de température sur l'activité antibactérienne d'extrait aqueux d'ail pour *bacillus.*

Pour *staphy-aureus* l'effet de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail est représenté dans la figure suivante :

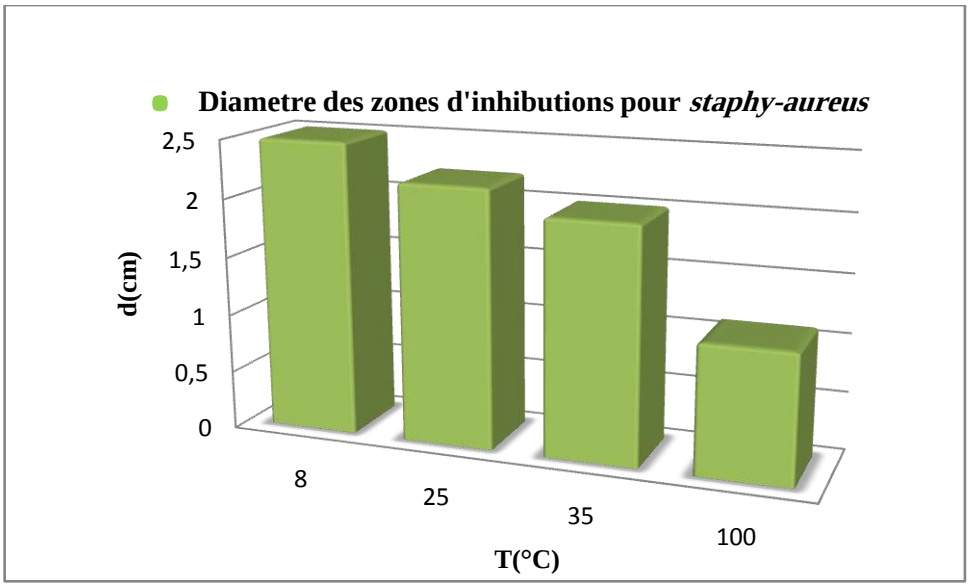


Figure III.18. Influence de température sur l'activité antibactérienne d'extrait aqueux d'ail pour *staphy-aureus*.

La figure suivante représente l'influence de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour les trois souches.

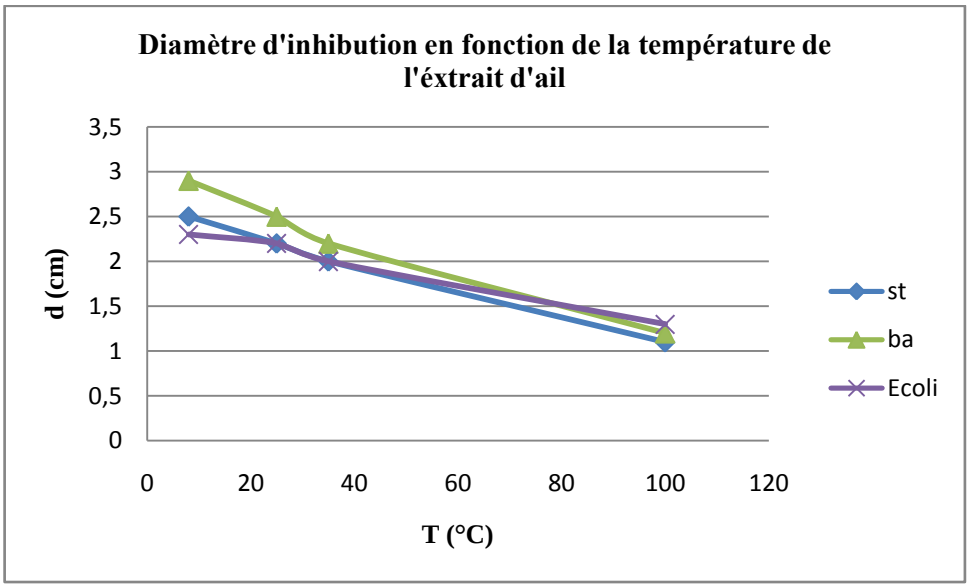


Figure III.19. Influence de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour les trois souches (st : staphy-aureus et ba : bacillus et E. Coli).

III.4.1.5.Discussion

Dans cette étude de l'effet de la température sur l'activité antibactérienne nous avons enregistré une diminution progressive des diamètres d'inhibitions pour toutes les souches bactériennes. Cette diminution est plus significative au de la 25°C par rapport à celle obtenu entre 8°Cet 25°C.

Comme le composé responsable de l'activité antibactérien de l'extrait aqueux d'ail est l'allicine**[Grun-Thomas S., 1998]**et nous avons trouvé que l'élévation de la température diminue cette activité de l'extrait aqueux d'ail vis-à-vis d'*E.coli, staphy-aureus, bacillus subtilis* et d'après les résultats d'analyses par HPLC nous pouvons dire que la 3ème pic de spectre est probablement l'allicine.

III.4.2. Effet antifongique de l'extrait aqueux d'ail

III.5.1. Choix de la souche

Cette étude a été réalisée sur une seule souche de levure disponible au complexe antibiotique SAIDAL : ***candida albicans*** **(pathogène).**

III.4.2.1.Diamètre des zones d'inhibitions

Le diamètre de la zone d'inhibition pour *candida albicans* est de 4,5cm

La figure suivante représente l'aromatogramme de l'extrait aqueux d'ail pour *candida albicans*



Figure III.20. Aromatogramme de l'extrait aqueux d'ail pour *candida albicans.*

Nous remarquons une grande sensibilité de candida albicans vis-à-vis de l'extrait aqueux d'ail (une zone d'inhibition 4,5 cm pour une concentration de 1,5g/ml), donc une grande activité antifongique,

III.4.2.2. Détermination de la CMI :

La méthode de diffusion sur gélose en milieu solide pour 8concentrations de l'extrait aqueux d'ail déférente allons de 1.5g /ml jusqu'à 0.0057g /ml est utilisé pour la détermination de la CMI. Le résultat de la variation des diamètres des zones d'inhibition en fonction des concentrations sont enregistrés dans le tableau suivant :

Tableaux III.11. Diamètres des zones d'inhibition pour différentes concentrations de l'extrait aqueux d'ail.

concentration en extrait d'ail (g/ml)	*Diamètre d'inhibition(cm) Pour candida albicans*
1,5	4,5
0,75	3,7
0,375	3,6
0,187	3,2
0,093	2,9
0,046	1,2
0,023	1
0,0115	0,9
0,0057	-

La figure ci- dessous représente l'influence de la concentration de l'extrait aqueux d'ail sur l'activité antifongique.

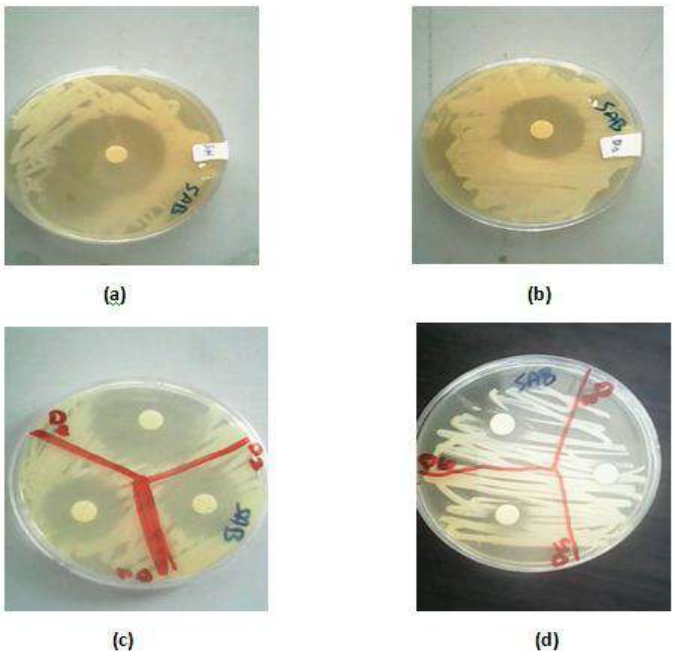


Figure III.21. Influence de la concentration de l'extrait aqueux d'ail sur l'activité antifongique, (a) la zone d'inhibition à **1.5 g/ml ;(b)** la zone d'inhibition à **0.75g /ml ;(c)** les zones d'inhibition à **0.375, 0.187 et 0.093 g/ml ; (d)** les zones d'inhibition à **0.046, 0.023, 0.0115 g/ml.**

La figure suivante représente la variation des diamètres d'inhibitions en fonction de la concentration

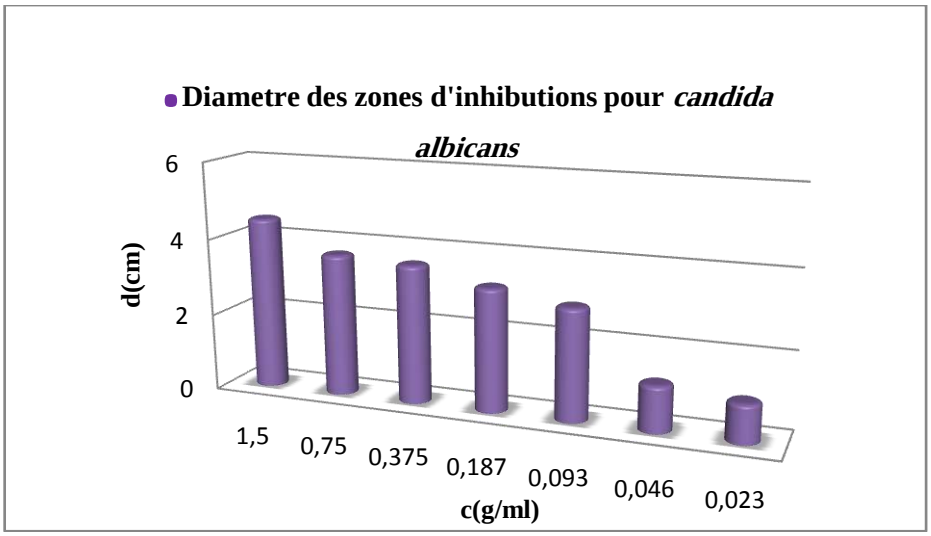


Figure III.22. Influence de la concentration de l'extrait d'ail sur l'activité antifongique.

III.4.2.3.Discussion

Les résultats de l'étude antifongique montre que :

- L'extrait aqueux d'ail est très actif sur la souche : *candida albicans.*
- Plus que les concentrations le l'extrait aqueux d'ail augmentent, plus les diamètres des zones d'inhibitions augmentent. Donc une importante activité antifongique.

III.4.2.4.Influence de la température sur l'activité antifongique

L'effet de la température sur l'activité antifongique a été étudié à partir des prélèvements faits sur l'extrait aqueux d'ail exposés à différentes températures (8°c,25°c,35°c,100°c).

La figure ci- dessous représente l'influence de la température de l'extrait aqueux d'ail sur l'activité antifongique.

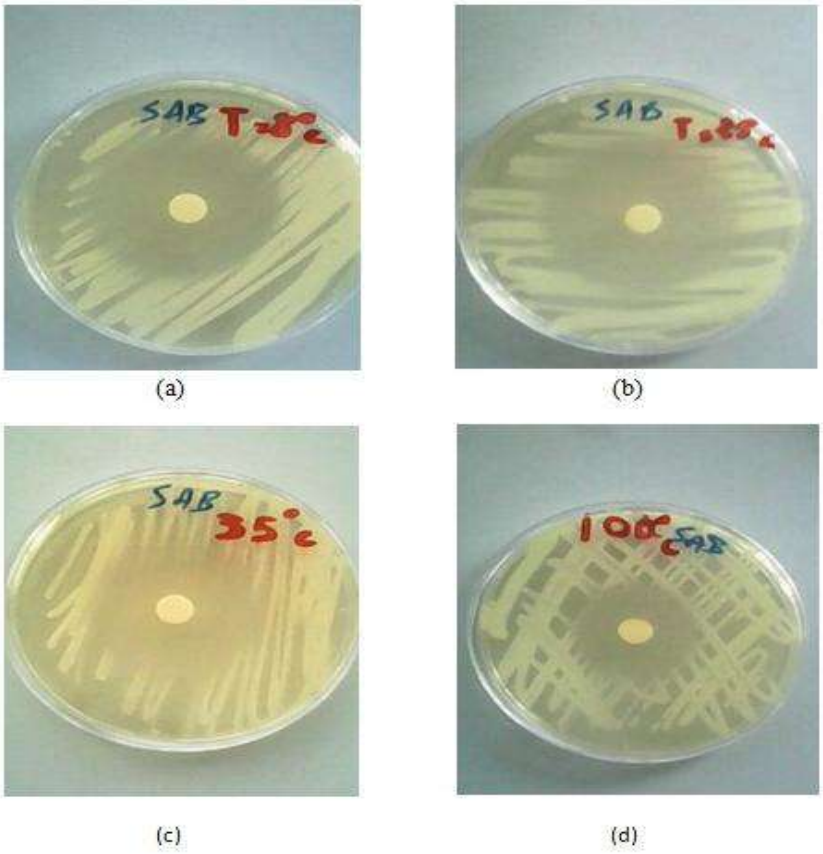


Figure III.23. Influence de la température de l'extrait aqueux d'ail sur l'activité antifongique.(a) à T=8°C ;(b) à T=25°C ;(c) à T=35°C ;(d) à T=100°C.

L'influence de la température sur l'activité antifongique pour candida albicans est représenté dans la figure suivante :

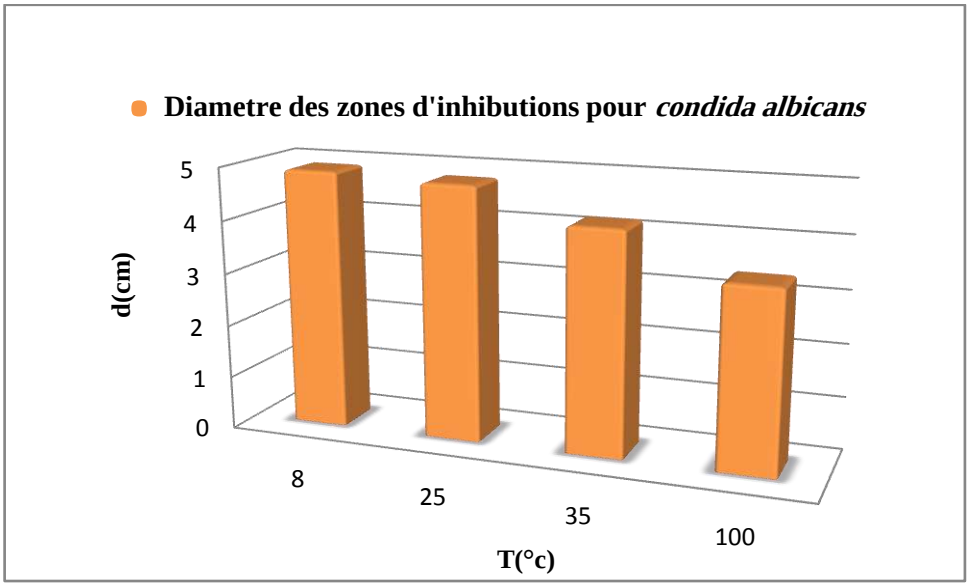


Figure III.24. Influence de la température de l'extrait d'ail sur l'activité antifongique pour *candida albicans*.

III.4.2.5.Discussion

Les résultats trouvés montrent que La température n'a pas une influence significative sur l'activité antifongique par rapport l'activité antibactérienne.

Le diamètre d'inhibition varie de 49mm pour T= 8°C à 34mm pour T=100°C.

Cette légère variation montre que l'activité antifongique est due probablement à un autre composé soufré autre que l'allicine. Sachant que selon l'étude faite par HPLC sur l'extrait d'ail à 100°C, l'allicine se dégrade complètement à cette température.

III.5.Activité antioxydante de l'extrait méthanolique d'ail

La détermination du pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail (0,46g/ml) est réalisée selon la méthode d'OKTAY *et al*, (2003).Les résultats obtenus sont enregistrés dans le tableau suivant :

Tableau III.12. Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail frais

Solution	***DO***
l'extrait méthanolique	2,2097
Témoin	0,223

La figure suivante représente le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail frais :

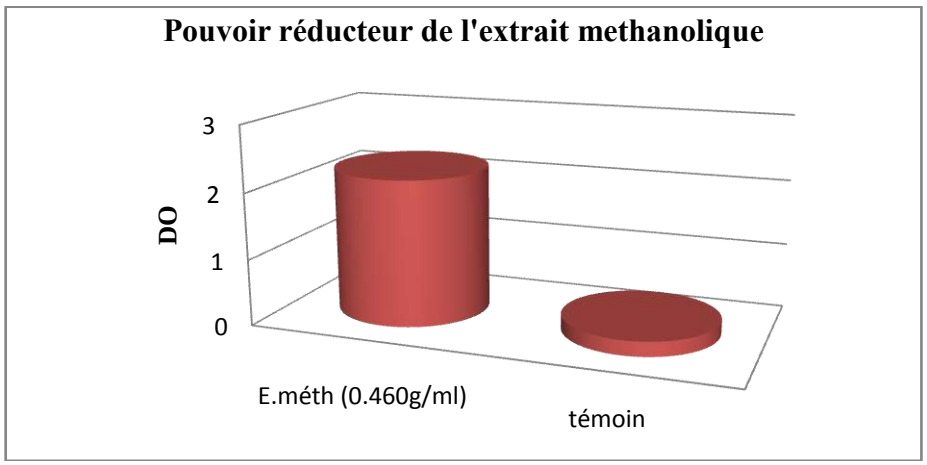


Figure III.25. Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail frais.

Par la suite, une comparaison à été faite entre le pouvoir réducteur de l'extrait méthanoïque d'ail et un antioxydant utilisé en industrie alimentaire, c'est l'acide ascorbique (Vitamine C).les résultats sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau III.13. Résultats de comparaison entre le pouvoir réducteur de l'extrait méthanoïque d'ail et l'acide ascorbique.

Solution	**DO**
l'extrait méthanolique (0,460g/ml)	2,2097
Témoin	0,223
Acide ascorbique (0,46 g/ml)	2,64

La figure suivante explique bien cette comparaison

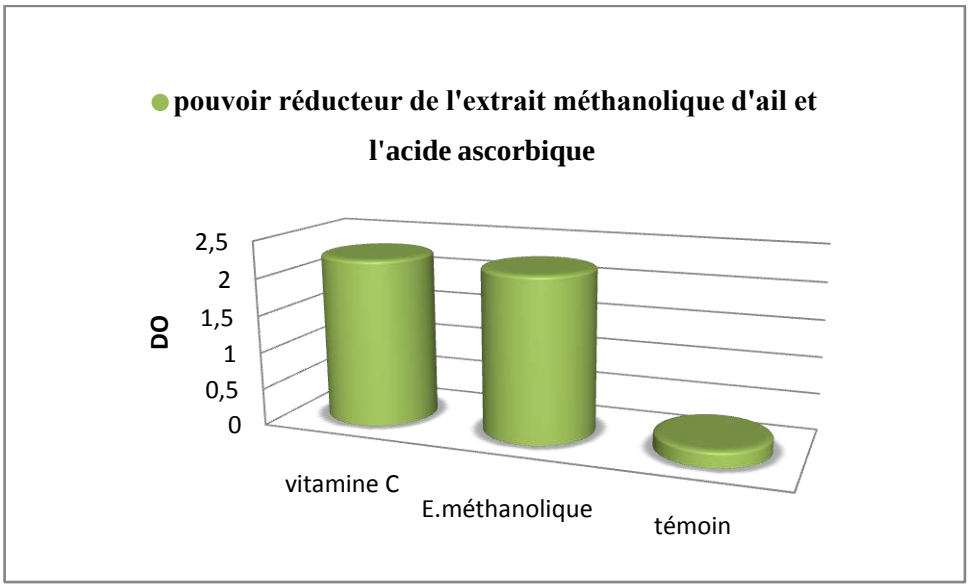


Figure III.26. Comparaison entre le Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail frais et l'acide ascorbique.

III.5.1.Influence de la concentration de l'extrait méthanolique sur l'activité antioxydante

Dans la figure suivante on expose la variation de l'absorbance (pouvoir réducteur) en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique d'ail.

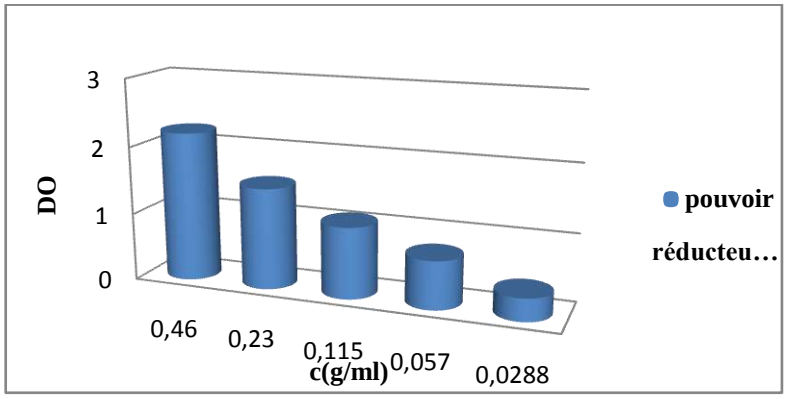


Figure III.27. : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'ail pour différentes concentrations.

III.5.2. Influence de la concentration de l'acide ascorbique sur l'activité antioxydante

La variation du pouvoir réducteur pour différentes concentration de l'acide ascorbique est Représenté par la figure suivante :

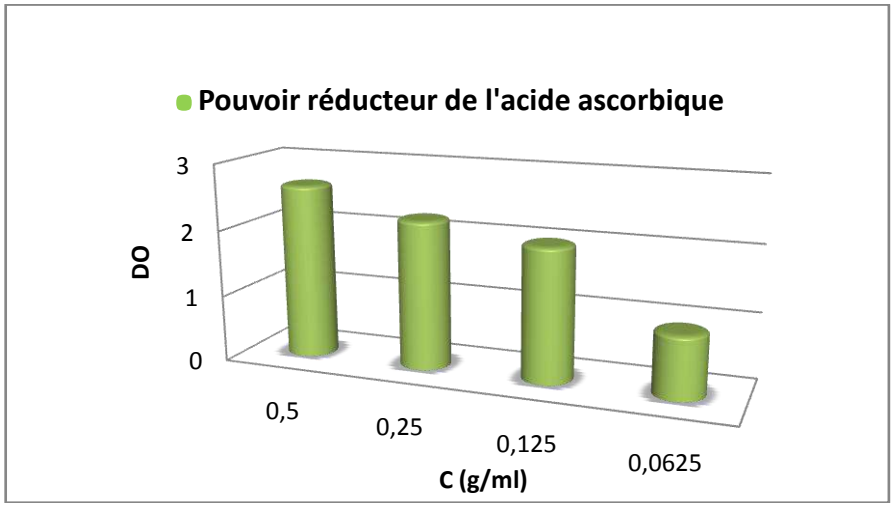


Figure III.28. : Pouvoir réducteur pour différentes concentrations de l'acide ascorbique.

III.5.3. Discussion

Les résultats trouvé révèles que :

- L'extrait méthanolique l'ail frais à une concentration de 0,46 g/ml a donné une absorbance égale à 2,2097, cette valeur 10 fois supérieur que celle trouvé pour le témoin qui à une absorbance égale à 0,223**(figure III.25).** Par conséquent nous pouvons dire que l'ail frais présente une forte activité réductrice.

- L'activité réductrice de l'ail est presque la même que celle trouvé pour l'acide ascorbique **(figure III.26.).**

- L'activité antioxydante décroit avec la diminution de la concentration de l'extrait méthanoïque d'ail frais. pour une concentration de 0,46g/ml l'absorbance est égale à 2,2097 par contre pour une concentration plus dilué (0.0288 g/ml) l'absorbance est de0.3335**(figure III.27).**

III.5.4. Influence de la température sur l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique d'ail frais.

L'influence de la température de l'extrait méthanolique d'ail frais sur l'activité antioxydante peut être illustrée par la figure suivante :

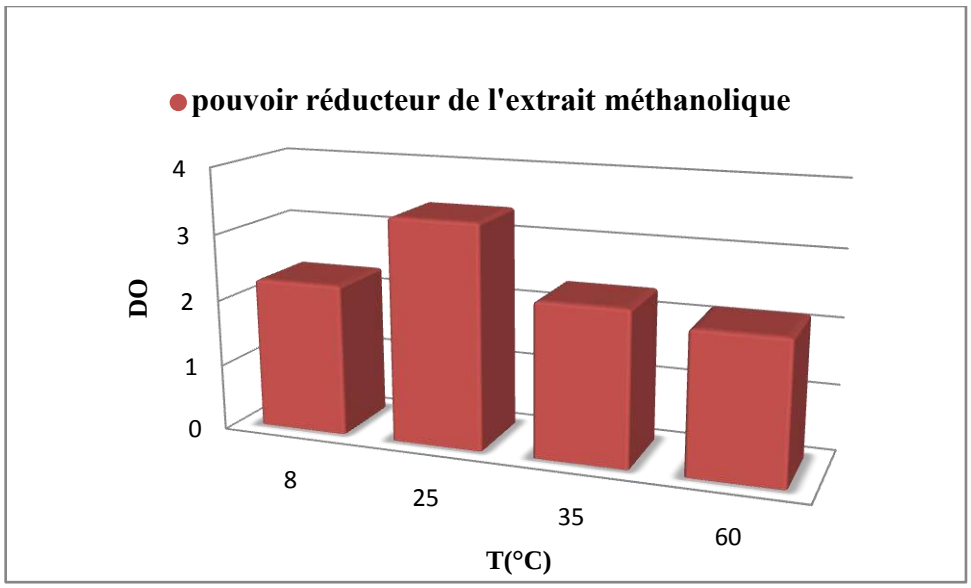


Figure III.29. Influence de la température de l'extrait méthanolique d'ail frais sur l'activité antioxydante.

III.5.5. Discussion

Les résultats trouvé montre que :

- L'activité antioxydante de l'extrait méthanoïque d'ail frais est optimale à une température de 25°C, il atteint une absorbance de3.3750. on enregistre une valeur d'absorbance voisine de 2.2878à une température de8°C. au-delà de 25°C l'absorbance diminue progressivement jusqu'à une valeur d'absorbance égale 2.1317 à une température de 60°C.

III.6. Fermentation de l'ail

III.6.1.Caractéristiques de l'ail avant et après la fermentation

Nous remarquons que notre extrait change d'aspect, de couleur et d'odeur après sa fermentation, les résultats obtenus sont enregistrés dans le tableau suivant :

Tableau III.14. Caractéristiques de l'ail avant et après la fermentation

	Avant la fermentation	***Après fermentation***
Couleur	blanche	Jaune clair
Odeur	forte	Très forte

La figure suivant représente l'état de la matière végétale (l'ail) avant et après la fermentation

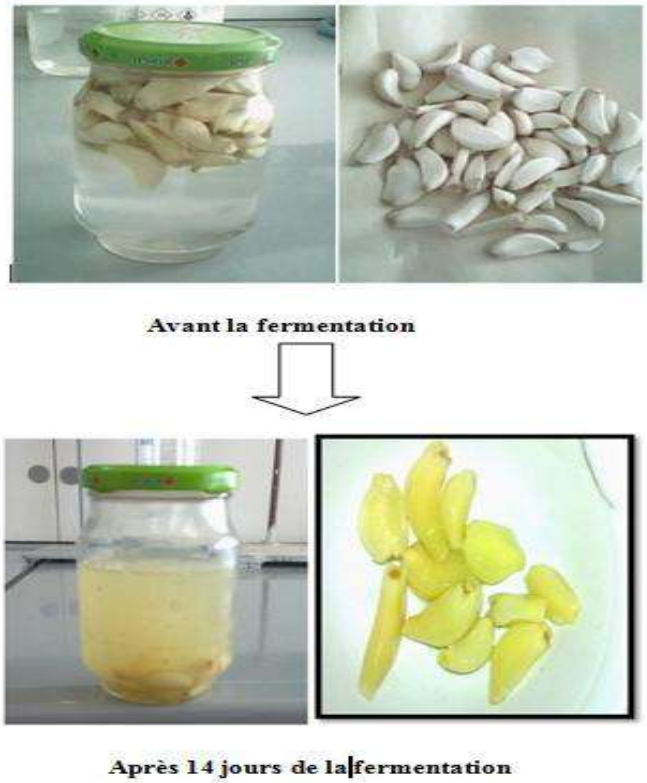


Figure III.30. Caractéristiques de l'ail avant et après la fermentation .

III.6.1. Effet de la fermentation sur l'activité antibactérienne

La figure ci- dessous représente la variation des zones d'inhibitions en fonction de temps de fermentation de l'ail pour *E.coli.*

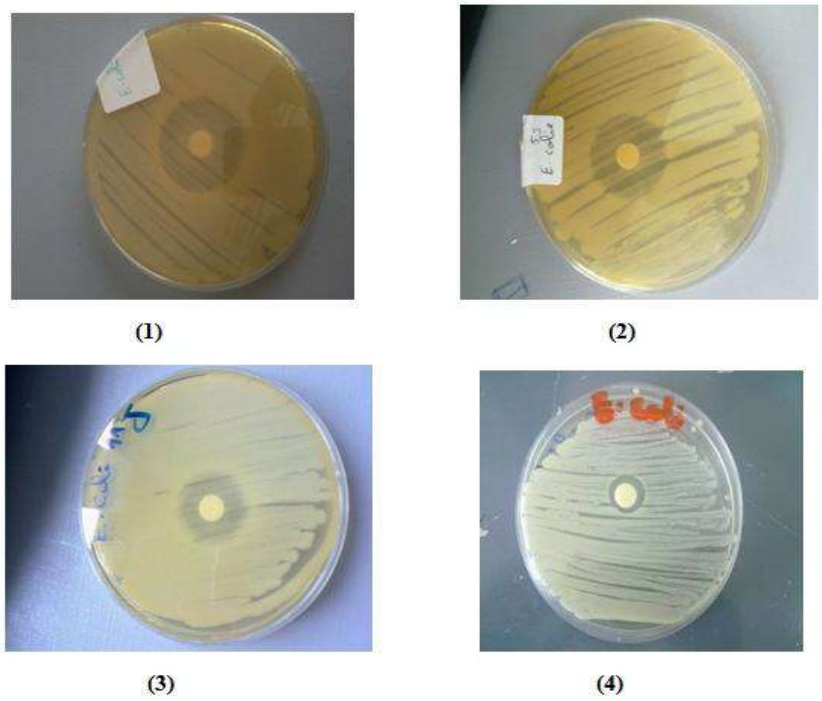


Figure III.31. Zones d'inhibition d'E.coli obtenus pour l'extrait aqueux d'ail fermenté pendant (1) 3 jours, (2) 5jours, (3) 11jours,(4) 14 jours.

Pour la souche bactérienne *bacillus* nous obtenons les résultats représentés par la figure suivante :

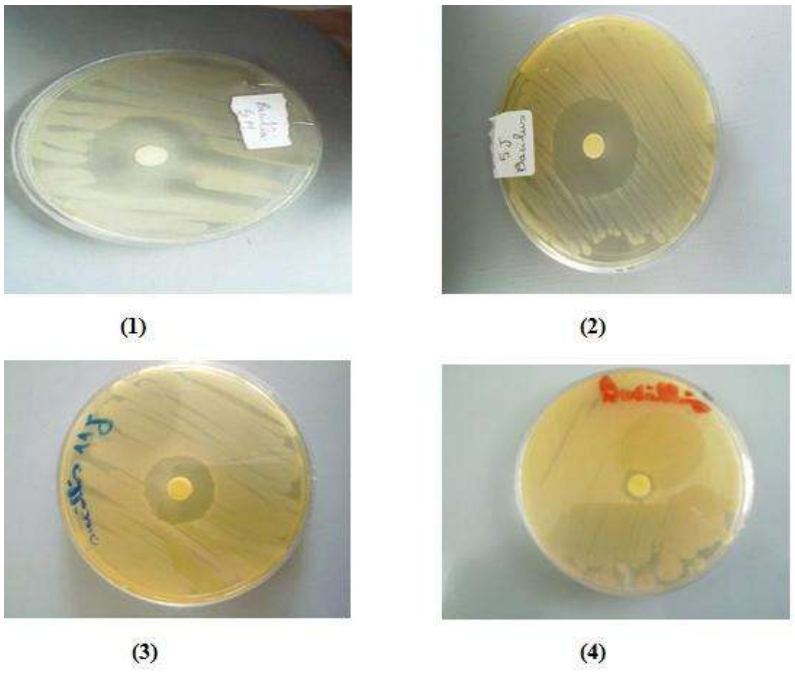


Figure III.32. Zones d'inhibition de l'extrait aqueux d'ail fermenté pendant (1) 3,(2) 5, (3) 11, (4) 14 jours Pour *bacillus subtilis*.

Pour la souche bactérienne *Staphy-aureus* nous obtenons les résultats représentés par la figure suivante :

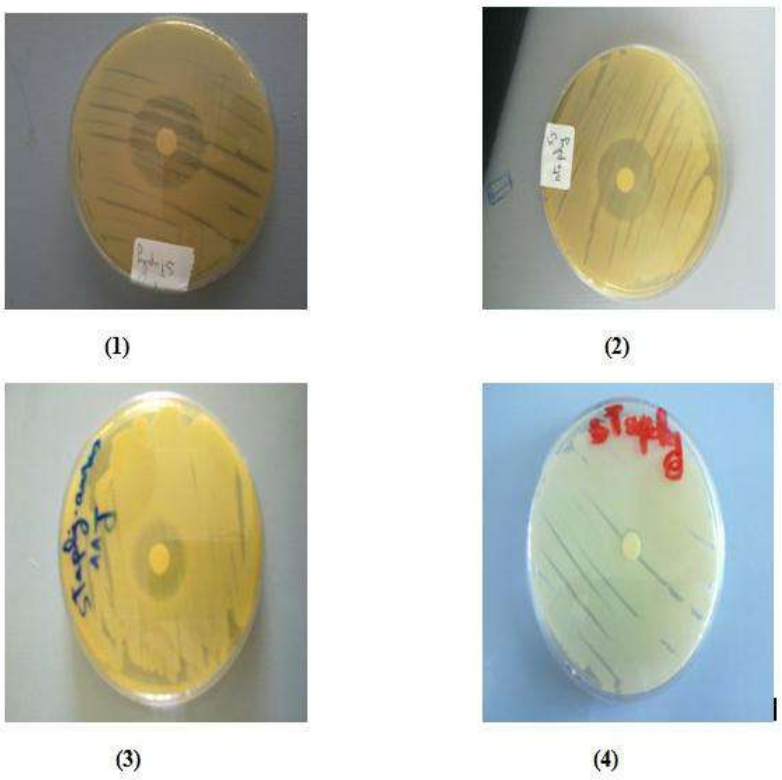


Figure III.33. Zones d'inhibitions de *Staphy-auraus* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail fermenté pendant (1) 3, (2) 5, (3) 11,(4) 14 jours).

La figure suivante illustre bien l'effet de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail fermenté pour *staphy-aureus* :

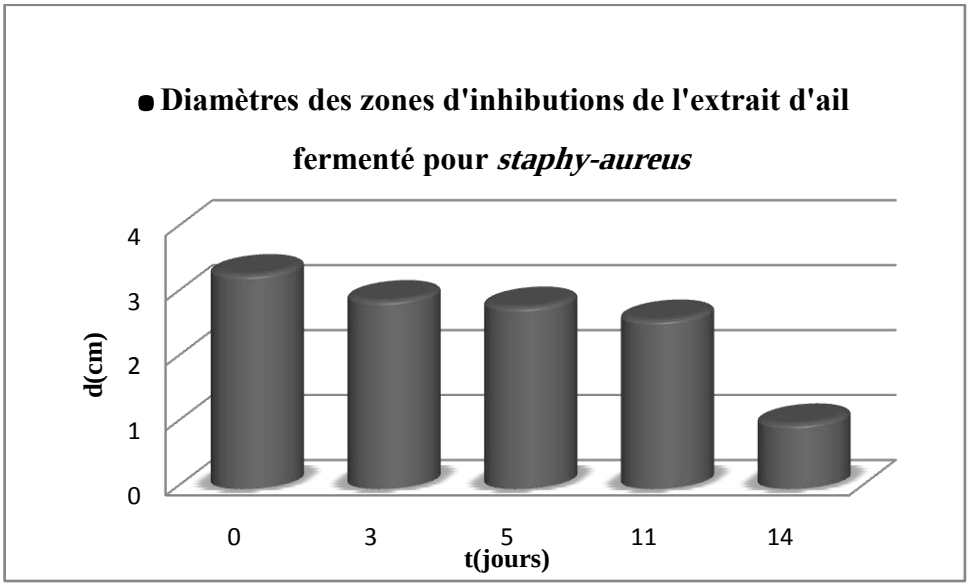


Figure III.34. Influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour *staphy- aureus.*

Pour la souche bactérienne *bacillus subtilis* l'influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail est représente par la figure suivante :

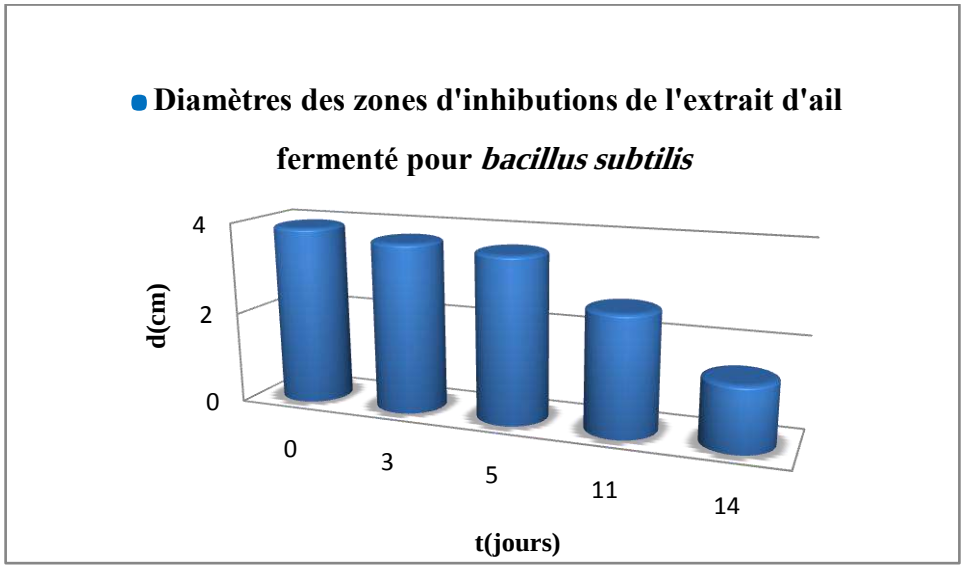


Figure III.35. Influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour *bacillus subtilis*.

L'influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour *E.coli* est représente par la figure suivante :

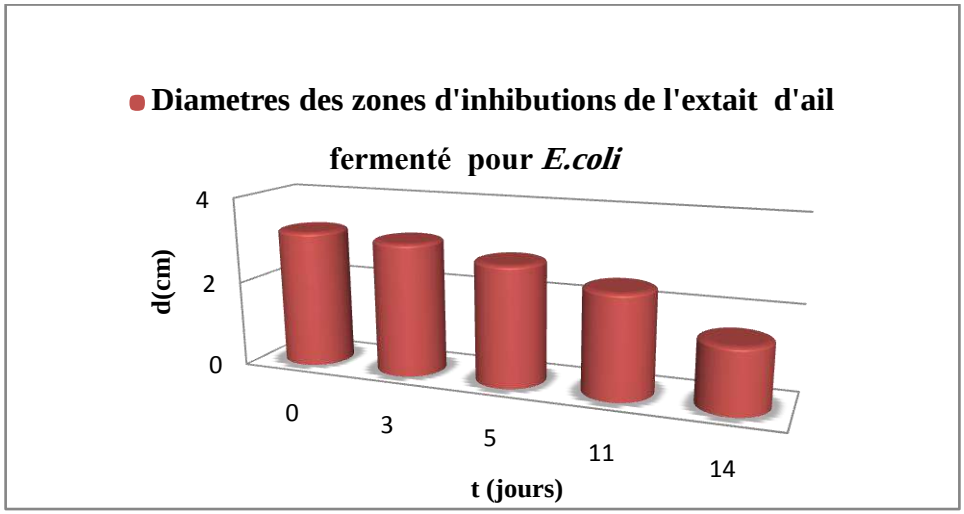


Figure III.36. Influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour *E.coli*.

La figure suivante représente l'influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour les trois souches bactériennes.

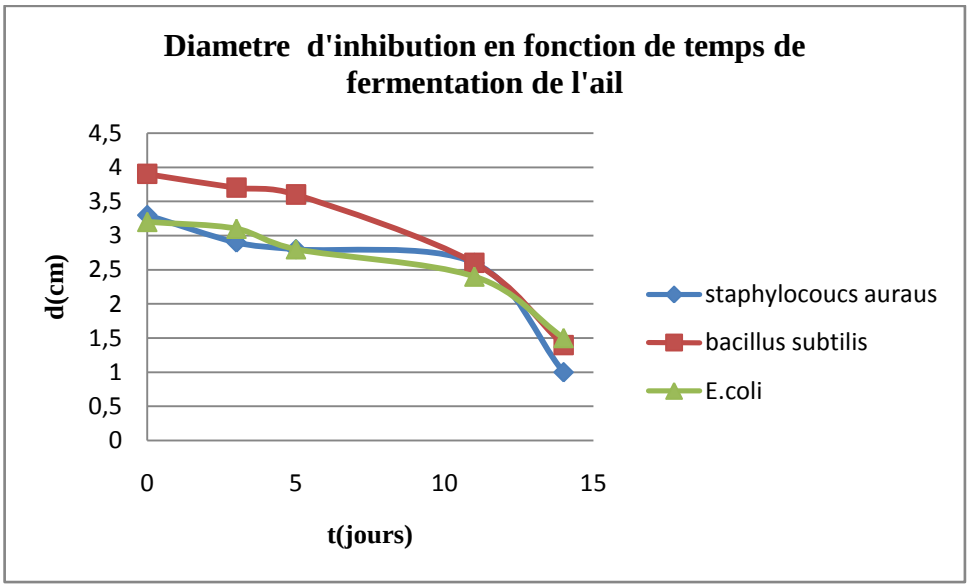


Figure III.37. Influence de la fermentation sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'ail pour les trois souches bactériennes.

III.6.2. Discussion

D'après les résultats obtenus nous remarquons que :

La fermentation influe d'une manière progressive selon la duré de fermentation sur l'activité antibactérienne de l'ail. Cette variation est plus remarquée à partir de 11jours de fermentation.

La fermentation décompose la matière organique dans l'absence d'oxygène **[Young-Mi J.et al. 2011].**

III.6.3. Effet de la fermentation sur l'activité antifongique

L'étude à été faite sur une seul levure *candida albicans*, on note la variation des diamètres d'inhibitions obtenus pour l'extrait aqueux d'ail fermenté pendant (0, 3, 5, 11, 14 jours).

La figure suivante représente bien l'influence de la fermentation de l'ail sur l'activité antifongique de l'extrait aqueux d'ail pour la levure *candida albicans*, pendant (3, 5, 11, 14 jours).

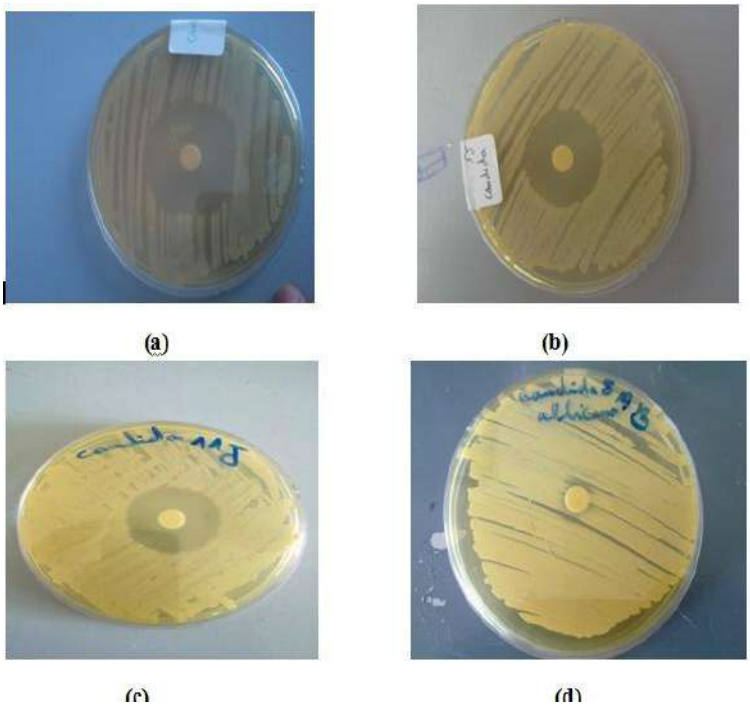


Figure III.38. Zones d'inhibitions de l'extrait aqueux d'ail fermenté pendant (3, 5, 11, 14 jours)pour *candida albicans*.

L'influence de la fermentation de l'ail sur l'activité antifongique de l'extrait d'ail est illustrée dans l'histogramme suivant :

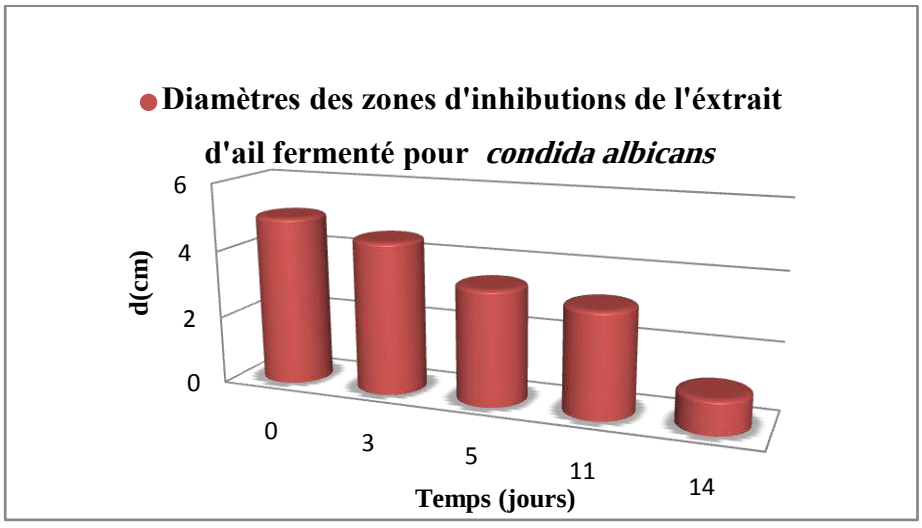


Figure III. 39. Influence de la fermentation sur l'activité antifongique de l'extrait aqueux d'ail.

III.6.4.Discussion

D'après les résultats obtenus nous remarquons que La fermentation influe d'une manière significative sur l'activité antifongique de l'ail frais. La plus grande variation est remarquée à partir de 11emejours de la fermentation.

Cette diminution de l'activité antifongique peut être due à la dégradation par fermentation des composés responsables de cette activité **[Young-Mi Jung a et al. 2011].**

III.6.5. Influence de la fermentation sur l'effet antioxydant

La figure suivante représente l'influence de la fermentation de l'ail sur l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique d'ail.

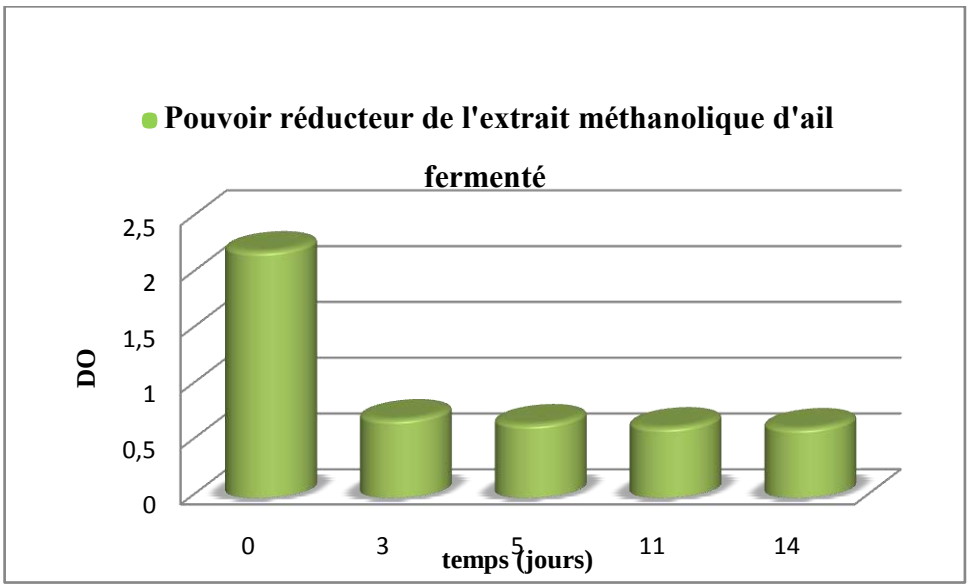


Figure III.40. Influence de la fermentation de l'ail sur l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique d'ail.

III.6.5. Discussion

A partir des résultats obtenus nous pouvons remarqué:

- Une chute significative de l'effet antioxydant de l'ail dés que l'ail commence à se fermenté (les 3premiers jours)
- L'activité antioxydante prend une allure constante pendant les autres jours de fermentation.

III.7. Conclusion

Ces résultats obtenus révèlent que la concentration de l'extrait, la température et la fermentation influent d'une manière significative sur les activités : antibactérienne, antifongique et antioxydante de l'ail frais. Ces paramètres agissent probablement sur les composés actifs responsables de ces activités, en modifiant ou en dégradant probablement les structures chimiques de ces composés**.**

Notre projet avait un double objectif, à savoir : confirmer par l'expérience quelques propriétés connues de l'ail et essayer d'expliquer expérimentalement certains paramètres qui influent sur ces propriétés que l'on attribue traditionnellement à cette plante.

Les travaux menés par notre étude ont permet de mettre en évidence les activités antimicrobienne et antioxydante de l'ail.

Dans ce travail, nous avons utilisé l'eau distillée pour l'obtention d'un extrait aqueux d'ail frais et ce par procédé de macération d'une quantité d'ail frais locale.

Dans la première partie, on utilise les outils d'analyses modernes comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et l'infra rouge, ce qui montre l'existence des composés soufrés dans l'extrait d'ail ainsi que les composés supposés prépondérant de l'ail dont l'allicine et l'alliine. Ses composé majoritaire s'est révélé être en partie responsable des activités antimicrobienne et antioxydante de l'ail. Cet effet se traduit suite à l'utilisation du standard ou par une comparaison avec des travaux antérieurement mis en évidence. Nous avons étudié par la suite la stabilité thermique de l'extrait d'ail. Plusieurs extraits conservés à différentes températures ont été utilisés. Les résultats obtenus à l'aide de la HPLC nous ont permis de constater que certains composés de l'extrait de l'ail sont d'autant plus stable que la température est très basse. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour des températures varient entre 8°C et 25°C.

Dans la deuxième partie, l'étude de l'effet microbiologique révèle une activité antibactérienne hautement significative de l'extrait aqueux d'ail pour les souches bactériennes utilisées, *E.coli*, *Staphy-aureus* et *Bacillussubtilis*et *Candida albicans* pour l'activité antifongique. Des tests sur l'effet de la température sur les activitésantibactérienneset antifongiques de l'ail ont confirmé les résultats de la stabilité thermique d'une part etle fait que l'allicine soit le principal constituant doué d'une activité thérapeutique d'autre part.

Il ressort clairement de ce travail qu'en plus de l'activité antimicrobienne, l'extrait de l'ail est pourvu d'un pouvoir antiradicalaire et antioxydant remarquable. Pour les résultats de l'influence de la température sur cette activité on a observé une diminution non significative de celle-ci.

En plus nous avons évalué l'effet de la fermentation de l'ail sur les activités antimicrobienne et antioxydant de l'extrait d'ail. Les résultats obtenus ont révélé que la fermentation réduit complètement les activités antibactériennes et antifongiques. Concernant l'activité antioxydante, les résultats ont montré que la fermentation de l'ail réduit de manière progressive l'effet antioxydant de l'ail.

Finalement, nous pensons que le premier objectif de ce projet a été atteint puisque tous les résultats obtenus mettent bien en évidence le potentiel microbiologique et antioxydant de l'ail ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir.

Synthèse bibliographique

1. **A**NONYMET. : toujours d'actualité: l'Ail ; Monit. Pharm. Lab., 1991, 1942,23-24.
2. **A**nderson J.W., Davidson M.H., Blonde L., et al.Long-term cholesterol-lowering effects ofPsyllium as an adjunct to diet therapy in thetreatment of hypercholesterolemia; Am. J. Clin. Nutr., 2000,11, 6,1433-1438
3. **A**magase H., Petesch B.L, Matsura H., et al.Intake of garlic and its bioactive components; J. Nutr., 2001, 131, 3S, 955S-962S
4. **A**noush M , Eghbal MA, Fathiazad F, H Hamzeiy, Kouzehkonani NS. Les effets protecteurs de l'extrait d'ail contre l'acétaminophène induite par le stress oxydatif et déplétion en glutathion. J BiolSciPak 2009; 12:765 e71.
5. **A**nwar MM, Meki AR. Le stress oxydatif dans streptozotocininducedrats diabétiques: les effets de l'huile d'ail et de la mélatonine. CompPhysiolBiochem Mol Un IntégrPhysiol 2003; 135: 539e47.
6. **A**ouadi R., Aouidet A., Elkadhi A, et al.Effect offresh garlic *(Allium sativum)* on lipid metabolism in male rats; Nutr. Res., 2000, 20, 2, 273-280
7. **B**lock, E., Ahmad, S., *et al*. (1986) *J. Am. Chem. Soc*., **108**, 7045-7055
8. Block, E., Iyer, R., Saha, C., *et al*. (1988) *J. Am. Chem. Soc*., **110**, 7813-7827.;Brodnitz, M. H., Pascale, J. V., Van
9. **B**lock, E., Putman, D., Zhao, S-H. (1992) *J. Agric. Food Chem*., **40**. 2431-2438.
10. **B**lock. E., Naganathan, S., Putman, D., Zhao, S-H. (1992) *J. Agric. Food Chem*., **40**, 2418-2430.
11. **B**loc E., La chimie del'ailet l'oignon, Sci. Am. 252(1985) 94-99.
12. Bocchio E., ***Parfums, Cosmétiques, Arômes***, 1985, **63**, 61-62.Hydrodistillation des huiles essentielles – Théorie et applications.
13. **B**runeton J. ; Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales ; Paris: Tec&Doc; Cachan: EM inter, 1999.- 1120 p.
14. **B**runeton, J. ; Eléments de phytochimie et de pharmacognosie ; Paris: Technique et Documentation-Lavoisier, 1987.- 585 p.
15. **B**udoff MJ, Ahmadi N, GulKM, Liu ST, Flores FR, Tiano J, et al. Extrait d'ail vieilli complétés avec des vitamines B, l'acide folique et la L-arginine retarde la progression de l'athérosclérose subclinique: un essai clinique randomisé. Précédent Med 2009; 49:101 e7.
16. **C**alvey, E. M., Roach, J. A. G., Block, E. (1994) *J.Chrom. Sci*.**32,** 93.
17. **C**arson, J. F.,Wong, F. F. (1961) *J.Agr.Food Chem*., **9**, 140.
18. **C**avalitto, C. J., Buck, J. S., Suter, C. M. (1944) *J. Am. Chem. Soc*., **66**, 1952
19. **C**avallito C.,BaileyJ H, l'allicine, le principe antibactérien ;deAllium sativum. L'isolement,les propriétés physiques etaction antibactérienne, J. Am. Chem. Chem. Soc. 66(1944)1944-1952. **C**ellini L., E. Di Campli, Masulli M., S. Di Bartolomeo, Allocati N., inhibition de Helicobacterpylori par l'extrait d'ail (Allium sativum), FEMS Immunol. Med. Micrbiol. 13 (1996) 273-277.
20. **C**howdhury A., M. Ahsan, l'islam SN, ZU Ahmed, L'efficacité de l'extrait aqueux de l'ail et l'allicine dans experimenta shigellose chez les lapins, Indiana J. Med. Rés. 93 (1991) 33-36.
21. **C**laude A., les aliments fermentés traditionnels - - édition Terre Vivante.
22. **C**levenger J.F., ***American Perfumer & Essential Oil Review***, 1928, 467-503.Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type
23. **C**ui r, Huang L., Zhao A., et al ; Guggulsterone is a Farnesoid X Receptor antagonist in coactivator association assaysbut acts to enhance transcription of bile salt export pump; l Biol. Chem., 2003, 278,12,10214-10220
24. **C**u J.Q. , H. Ziouani, J.P. Martel, F. Périneau, ***Parfums, Cosmétiques, Arômes***, 1990, **93**, 67-74Production d'huile essentielle de. Badiane de Chine par turbo-distillateur
25. **C**urrier, H. B., (1945) *Food Research*,**10**, 177.
26. **D**aif N. ; L'ail, *Allium sativum 1.* (Liliacées) : de la tradition à ses perspectives en thérapeutique Modern; Th. : Pharm. : Nancy 1 : 1993 ; 12., 104 f.
27. **D**avis L , J. Shen, Royer RE, in vitro la synergie des concentrée Allium sativum extrait et l'amphotéricine B contre Cryptococcusneoformans, Planta Med. 60 (1994) 546-549.
28. **D**ebelmas, Anne-Marie ; Guide des plantes dangereuses - 2e éd. ; Paris: Maloine, 1983.- 200 p.
29. Delaveau p. ; Ail: *Allium sativum L.* (Liliacées) ; Actual. Pharm., 1982, 184, 67-68
30. **D**hawan V, S. Jain Effet de la supplémentation sur l'ail lipoprotéines de basse densité oxydées et la peroxydation des lipides dans patients de l'hypertension artérielle essentielle. Mol CellBiochem 2004; 266:109 e15.
31. **D**uda G, J, SuliburskaPupek-Musialik D. Les effets de court terme supplémentation ail sur le métabolisme des lipides et le statut antioxydant chez les adultes hypertendus. PharmacolRep2008; 60:163 e70.
32. **D**ugo G., A. Di Giacomo, Taylor & Francis Publishing, London, 2002.The genus Citrus.
33. **F**arber, L., (1957) *Food Technol*., **11**, 621.
34. **F**ehrat*et al*, 2006 ; Lucchesi*et al*, 2007.
35. Ferary, S., Thibout, E., Auger, J. (1996) *Rap. Comm. Mass Spec*., **10**, 1327-1332.

36. **G**ARNIER G., BEZANGER-BEAUQUESNE L., DEBRAUX G. ; Ressources médicinales de la flore française 1 ; Paris: Vigot, 1961.-1511 p.
37. **G**imenez MA., Solanes RE, Gimenez DF, la croissance de Clostridium botulinum dans les médias avec l'ail, le révérend argent. Microbiol. 20 (1988)
38. **G**irre L. ; Connaître et reconnaître les plantes médicinalesRennes: Ouest France, 1980.- 333.
39. **G**irre L. ; Les plantes et les médicaments: l'origine végétale de nos médicaments ; Paris: Delachaux et Niestlé, 2001.- 253 p.
40. **G**onzalez-Fandos E., Garcia-Lopez ML, ML Sierra, OteroA., la croissance staphylocoques et entérotoxines (AD) et thermonucléase synthèse en présence d'déshydraté ail, J. Appl. Bacteriol. 77 (1994) 549-552.
41. **G**run-Thomas, S. ; Etude de trois plantes médicinales et condimentaires : l'ail, le safran, le romarin ; Th: Pharm. : Nancy 1 : 1998 ; 63, 137 f.
42. **G**upta K, Viswanathan R., l'action combinée de la streptomycine et le chloramphénicol avec des antibiotiques végétaux contre les bacille de la tuberculose. I. La streptomycine et le chloramphénicol avec cépharanthine. II. La streptomycine et l'allicine, Antibiot. Chimiothérapie. (Washington DC) 5 (1955) 24-27.
43. **H**assan HA, Hafez HS, Zeghebar FE. L'huile d'ail que un agent de modulation du stress oxydatif et la neurotoxicitnduite par le nitrite de sodium chez des rats albinos. Food ChemToxicol 2010; 48:1980 e5.
44. **H**ughes BG., Lawson LD, effets antimicrobiens de Allium sativum L. (ail) Alliumampeloprasum (ail éléphant) et Allium cepa L. (oignon) composés d'ail et commerciales produits de suppléments d'ail, Phytother. Rés. 5 (1991) 154-158.
45. **H**yptisSpicigera, PlucheaOvalis et LaggeraAurita ; *par* Justin KABERA NZEYUMWAMI : Caracterisation des huiles essentielles de trois plantes aromatiques : Universite de Lome- Togo - DEA 2004.
46. Ide N, Lau BH. Composés d'ail protéger vasculaire cellules endothéliales de faible densité oxydées lipoproteininducedblessures. J PharmPharmacol 1997; 49:908 e11.
47. **I**nternational Research Institute of the TibetanMedicine (page consultée le 5 avril2005). Tibetanmedicine encyc1opedia, [En ligne]. Adresse URL:http://www.doctorgarma.com/rst/allium sativum/.
48. **J**ansen, H., Müller, B., Knobloch, K (1987) *Planta Med.*, **53**, 559-562.
49. **K**apetanovic S., S. Djugumovic, R. Ramic, ***Parfums, Cosmétiques et Arômes***, 1984, **56**, 77-78.Isolement de l'huile essentielle de rose par distillation sèche.
50. **K**asuga S., Uda N., Kyo E., et al.Pharmacologie activities of Aged Garlic Extract in comparison with other GarlicPreparations; J. Nutr., 2001, 131, 3S, 1080S-1084S
51. **K**ay HY, Won Yang J, Kim TH, Lee da Y, B Kang, Ryu JH, et al. Ajoène, une pointe d'ail stable par produit, a un effet antioxydant Nrf2 par induction à médiation ligase glutamate-cystéine dans les cellules HepG2 et les hépatocytes primaires. J Nutr 2010; 140: 1211e9.
52. Khalili B., Bardana EJ., Yunginger J.W.; Psyllium-associated anaphylaxis and death : a case report and review of the literature; Ann. Allergy Asthma Immunol., 2003,21,579-584
53. **K**ohman, E. F., (1947) *Science*, **106**, 625.
54. **L**awson, L., Wang, Z-Y. J., Hughes, B. G. (1990) *Planta Med*., **56**, 363
55. **L**awson, L. D., Wood, S. G., Hughes, B. G. (1990) *Planta Med.*, **57**, 263-270.
56. **L**awson LD., la composition et la chimie de l'ail gousses d'ail et transformés. dans: Koch H.P., Lawson L.D. (Eds.), L'ail: la science et l'application thérapeutique de Alliumsativum L. Williams andWilkins, Baltimore, 1996, pp 37-108.
57. **L**ee YM, Gweon OC, Seo YJ, Im J, MJ Kang, Kim MJ, et al. Effet antioxydant de l'ail et l'ail vieilli noir chez l'animal modèle de diabète de type 2. NutrResPract 2009; 3: 156e61.
58. **L**eclerc H.; Précis de phytothérapie: essai de thérapeutique par les plantes françaises ; Paris: Masson, 1976.- 363 p
59. **L**iu HG, Xu LH. L'huile d'ail empêche tributylétain induite dommage oxydatif in vivo et in vitro. J Food Prot 2007; 70: 716e21.
60. **L**uque-Garcia J.L., M.D. Luque de Castro, ***Talanta***, 2004, **64**, 571-577.Focused microwave-assisted Soxhlet extraction : devices and applications
61. **L**uque-Garcia J.L., M.D. Luque de Castro, ***Journal of Chromatography A***, 2004, **1034**, 237-242:Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Applicationto the extraction of total fat from oleaginous seed
62. **M**atsuura H.Saponins in Garlic as modifiers of the risk cardiovascular disease; r. Nutr., 2D01, 131, 3S, 1000S-1005S
63. **M**artini M.C., M. Seiller, Editions Tec & Doc, Paris, 1999.Actifs et additifs en cosmétologie.
64. **M**aignal L., P. Pibarot, G. Bonetti, A. Chaintreau, J.P. Marion, ***Journal of Chromatography A***, 1992,**606**, 87-94.Simultaneous distillation-extraction under static vacuum : isolation of volatile compounds at room temperature
65. **M**ayeux, P. R., Agrawal, K. C., Tou, J-S, H., *et al* (1988) *Agents and Actions*, **25**, 182-190.
66. **M**ayne ST., Nutriments antioxydants et les maladies chroniques: l'utilisation de biomarqueurs d'exposition et l'état de stress oxydatif dans la recherche épidémiologique. J Nutr 2003; 133 (Suppl. 3): 933Se40S
67. **M**eyer-Warnod B., ***Perfumer &Flavorist***, 1984, **9**, 93-103.Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils.

68. Miething, H. (1985) *Dtsch. Apoth,.Ztg*., **125**, 2049-2050
69. **N**ahdi U, je Hammami, Kouidhi W, A Chargui, Ben Ammar A, Hamdaoui MH, et al. Les effets protecteurs de l'ail brut par la réduction du fer à médiation par le stress oxydatif, la prolifération et autophagie chez le rat. J Mol Histol 2010; 41:233 e45.
70. **N**ickerson G.B., S.T. Lickens, ***Journal of Chromatography***, 1966, **21**, 1-3.Gas Chromatographic evidence for the occurence of hop oil in beer.
71. **N**ormes AFNOR ;Recueil des normes françaises. Huiles essentielles. AFNOR, Paris, 1992.
72. **P**aris René R., Moyse H. ; Précis de Matière Médicale - 2e ed. rev ; Paris: Masson, 1976-1981
73. **P**eng F., L. Sheng, B. Liu, H. Tong, S. Liu, ***Journal of Chromatography A***, 2004, **1040**, 1-17.Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extractionand headspace co-distillation, used for the analysis the volatile components in aged flue-cured tobaccoleaves.
74. **P**érineau F., H.Ziouani, M. Delmas, A. Gaset, G. Lévy, ***Parfums, Cosmétiques, Arômes***, 1989/1990, **90**, 85-92.Huile essentielle de Céleri – Turbo-extraction industrielle.
75. **P**harmacopée Européenne 1 ; Conseil de l'Europe, Maisonneuve S.A. Editions, Sainte Ruffine, 1996
76. **P**latenius, H. (1935) *J. Agric. Res*., **51**, 847
77. **P**roteus (page consultée le 5 avril 2005). Ail, [En ligne]. Adresse URL:http://www.reseauproteus.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=ail
78. **R**abinkov A., Miron T., Konstantinovski L., M. Wilchek, Mirelman D., L. Weiner, le mode d'action de l'allicine:le piégeage de radicaux et de l'interaction avec un thiol contenant protéines, Biochim. Biophys. Acta 1379 (1998) 233-244
79. **R**ay B, NB Chauhan, Lahiri DK. Insultes oxydation des neurones et synapse sont empêchés par l'extrait d'ail vieilli et Sallyl-L-cystéine dans le traitement et la culture des neurones APPTgmodèle de souris. J Neurochem 2011; 117:388 E402.
80. **R**ojas P, Garcia Serrano-N, Medina-Campos ON, Pedraza- Chaverri J, Maldonado PD, Ruiz-Sanchez E. S-Allylcysteine, un composé d'ail, protège contre le stress oxydatif en 1-méthyl-4-phénylpyridinium parkinsonisme induit en souris. J NutrBiochem 2011; 22:937 e44.
81. **S**aghir, A. R., Mann, L. K, *et al* (1964) *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **84**, 386.
82. **S**chauenberg P. ; Guide des plantes médicinales ; Paris: Delachaux et Niestlé, 1977.- 396 p.
83. **S**iano F., C. Ghizzoni, F. Giofriddo, E. Colombo, L. Servillo, D. Castaldo, ***Food Chemistry***, 2003, **81**,469-475.Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products.
84. **S**toll, A., Seebeck, E. (1949) *Helv. Chim. Acta*, **32**, 197.
85. **T**ournaire G., ***Parfums, Cosmétiques, Arômes***, 1980, **35**, 43-46.Les économies d'énergie dans les techniques de production des huiles essentielles
86. **U**chida Y., T. Takahashi, N. Sato, les caractéristiques de la activité antibactérienne de l'ail, Jpn J. Antibiotics 28 (1975) 638-642.
87. **V**alnet J. ; Aromathérapie - Traitement des maladies par les essences de plantes ; Paris: Maloine, 1974.- 418 p.
88. **V**alnet J.; Traitement des maladies par les légumes, les fruits, les céréales ; Paris: Maloine, 1982.- 525 p.
89. **V**agi E., B. Simandi, A. Suhajda, E. Hethelyi, ***Food research international***, 2005, **38**, 51-57.Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanummarjorana*L. Extracts obtained withethyl alcohol and supercritical carbon dioxide.
90. **V**azquez-Prieto MA, Gonzalez RE, Renna NF, Galmarini CR, RM Miatello. Extraits d'ail aqueuses éviter l'oxydation le stress et le remodelage vasculaire dans un modèle expérimental de syndrome métabolique. J Agric Food Chem 2010; 58:6630
91. **V**ernin, G., Metzger. J., Fraisse, D., Scharff, C. (1986) *Planta Med*., 96-101.
92. **W**ichtl M., Anton R.; Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique - 2ème édition ; Paris: Ed. Tee & doc-Lavoisier; Cachan: Ed. médicales internationales, 2003.- 692p.
93. **W**u CC , LY Sheen, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK. Effets de l' composés organiques soufrés de l'huile d'ail sur le Système anti-oxydation dans le foie de rat et les globules rouges. Nourriture ChemToxicol 2001; 39:563 e9.
94. Yamada Y., Azuma K., Évaluation de l'antifongique in vitro l'activité de l'allicine, Antimicrob. Agents Chemother. 11(1997) 743–749.
95. YehY.Y, Liu L.Cholesterol-lowering effect of Garlic Extracts and Organosulfur compounds : Humanand Animal Studies; Nutr., 2001, 131, 3S, 989S-993S
96. **Z**arnowski R., Y. Suzuki, ***Journal of Food Composition and analysis***, 2004, **17**, 649-663.Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains

Partie expérimentale

1. Cuq J. L., 2007, La Chromatographie Liquide, Université Montpellier 2, p. 13-14.HPLC.
2. Demirdöven N., C. M. Cheatum, H. S. Chung, M. Khalil, J. Knoester, A. Tokmakoff, « Two-dimensional infrared spectroscopy of antiparallel beta-sheet secondary structure », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, 2004, p. 7981 [lien DOI [archive]].
3. Hamm .P., M. H. Lim, R. M. Hochstrasser, « Structure of the amide I band of peptides measured by femtosecond nonlinear-infrared spectroscopy », *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, 1998, p. 6123 [lien DOI [archive].
4. Lau W.S., Infrared characterization for microelectronics, World Scientific, 1999.
5. Mendham J., R.C. Denney, J.D. Barnes, M.J.K. Thomas, De BoeckUniversité (2005)Analytical Chemistry,Séamus P J Higson, Oxford University Press (2003).
6. Mukamel S., « Multidimensional Fentosecond Correlation Spectroscopies of Electronic and Vibrational Excitations », *Annual Review of Physics and Chemistry*, vol. 51, 2000, p. 691 [lien DOI [archive]].
7. Rouessac F., A. Rouessac, D. Cruché ; Dunod, Paris (2004); Analyse Chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6ème éditionChimie Analytique, 7ème édition.
8. Skoog D.A., D.M. West, F.J. Holler; De Boek&Larcier, Paris & Bruxelles (1997)Analyse chimique quantitative de Vogel, 6ème édition.

Résultatet discussion

9. Benjilali B, Tantaoui-Elaraki A, Ismaïl-Alaoui M et Ayadi A (1986) Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*. 20,155-167.)
10. Boulahbal F (1993) Microbiologie S1 Clinique. Office des Publications Universitaires(OPU), Alger.
11. Janssen AM, Scheffer JJC and BaerheinSvendsen A (1987) Antimicrobial activity ofessential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *PlantaMedica*. 53,395-398.
12. Rahal K, et un groupe de collaborateurs (2003) Standardisation de l'Antibiogramme enMédecine Humaine à l'Echelle Nationale Selon les recommandations de l'OMS, 3e Edition.
13. Young-Mi Jung et al ,Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, Republic of Koreae Department of Veterinary Surgery, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701; Nutrition Research 31 (2011) 387 – 396

Annexe N°1

La figure suivant représente la courbe de balayage de l'extrait méthanolique par spectrophotomètre UV

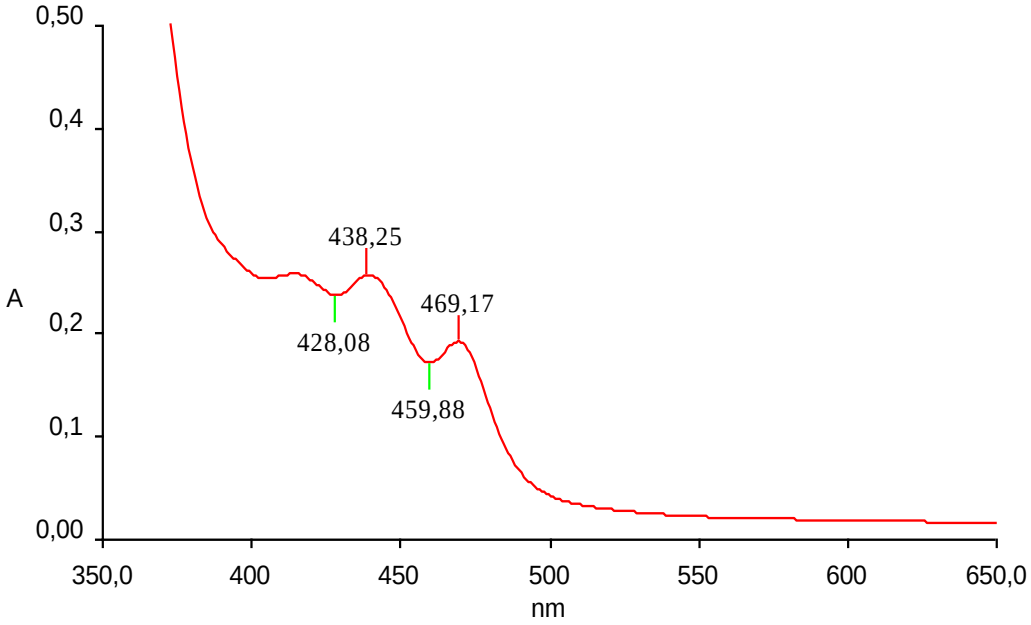


Figure A1. Spectre d'analyse de l'extrait méthanolique par UV.

La figure ci-dessous représente La courbe de balayage de l'extrait aqueux tré dilué (1ml dans 1 litre de l'eau distillé) par spectrophotomètre UV

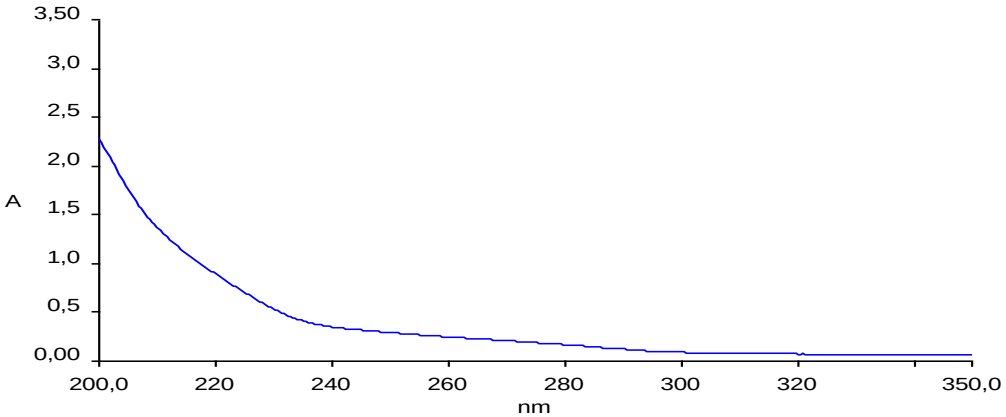


Figure A2. Spectre d'analyse de l'extrait aqueux de l'ail par UV.

Annexe N°2

La figure suivante représente le spectre d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de l'ail après (3j) de fermentation.

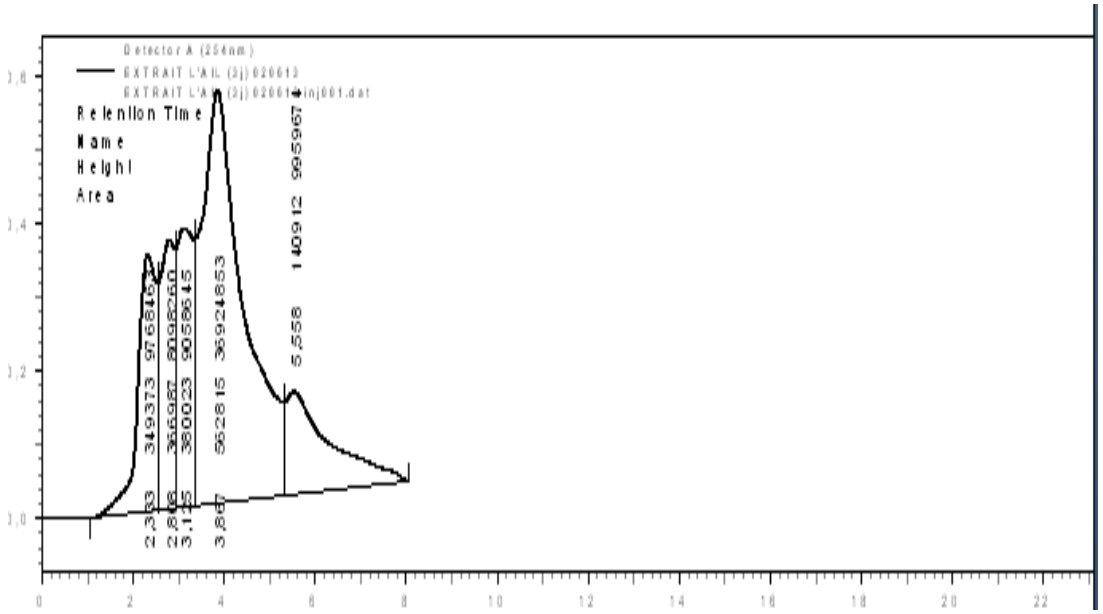


Figure A3. Spectre d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de l'ail après (3j) de fermentation.

Le spectre d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de l'ail après (5j) de fermentation est représenté dans la figure suivante :

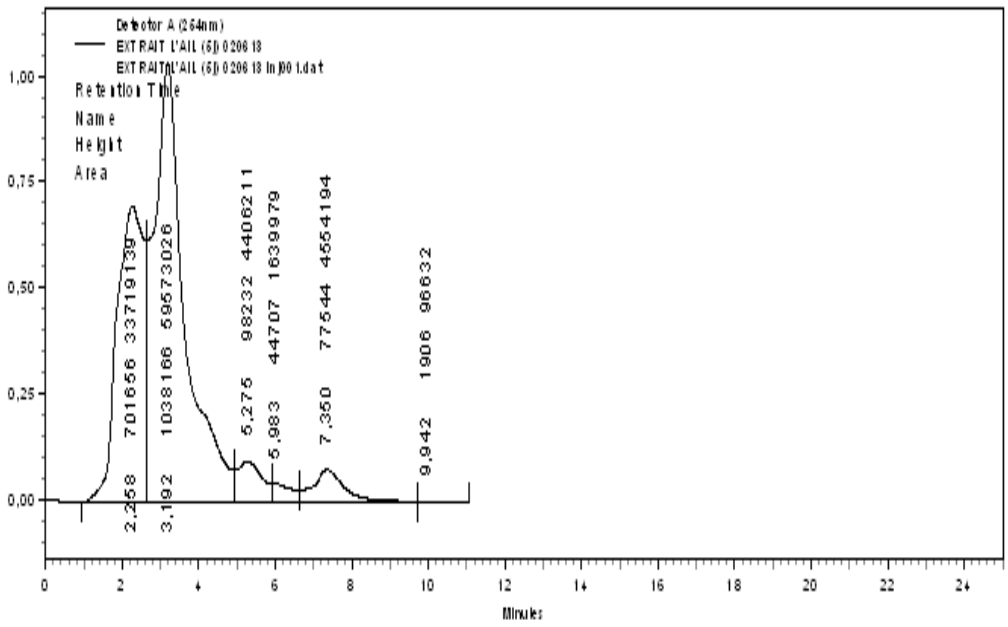


Figure A4. Spectre d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de l'ail après (5j) de fermentation.

La figure suivante représente le spectre d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de l'ail après (14j) de fermentation.

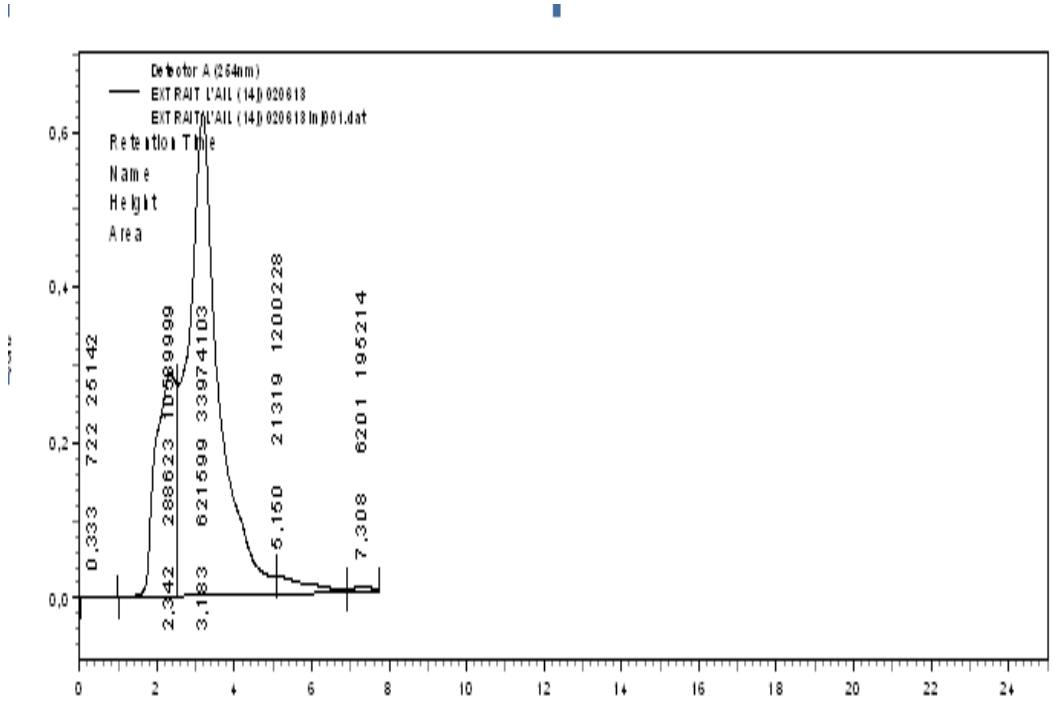


Figure A5. Spectre d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique de l'ail après (14j) de fermentation.

La figure suivante représente une comparaison des spectres d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique d'ail avant et après la fermentation.

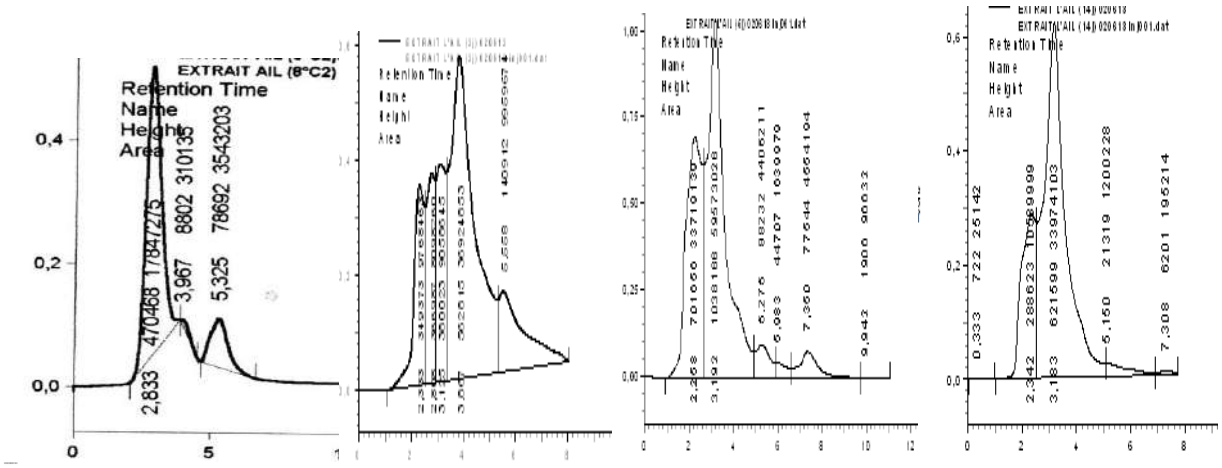


Figure A6. Comparaison des spectres d'analyse par HPLC de l'extrait méthanolique d'ail avant et après la fermentation.

Annexe N°3

Composition du milieu de culture

1. **milieu de culture *soja agar***
    - Caséine : 15g ;
    - Farine de soja : 5g ;
    - Gélose : 15g ;
    - pH après stérilisation : 7, 3± 0,2.

2. **milieu de culture *sabouraud***
    - Caséine : 10g ;
    - Dextrose : 40g ;
    - Gélose : 15g ;
    - pH après stérilisation : 6 ,5± 0,2.

Annexe N°4

Les souches bactériennes utilisent

***1. Escherichia coli* (colibacille)** : Bacille à gram négatif apparentant à la famille des Entérobactérie .E coli se développe sur gélose ordinaire. Indole^{+}, urée-fermente le lactose, gazogène, mais ne produit pas d'acétine**.**

- **Habitat :** E. coli est une hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux. Chez l'homme, il est présent à raison de 10à10 bactéries /g de selles, densité cependant très inférieure à celle des anaérobies qui constituent la flore dominante. La présence d*'E. coli* dans l'environnement est le témoin d'une contamination fécale **(LAMARAT et YKRELEF, 2009).** Pouvoir pathogène.
- **Infection urinaire :** Plus fréquent chez la femme en raison de la brièveté, chez l'homme l'infection est généralement secondaire à un obstacle sur les voies urinaires.
- **Infection intestinal :** Responsable de gastro-entérites.
- **Infection néonatale :** Peut se traduire par une méningite ou une septicémie.
- **Infection diverses :** *Escherichia coli* est impliqué dans de nombreuses infections à point de départ digestif ou urinaire, suppuration localisées, il peut s'agir d'infections communautaires Ou nosocomiales.
- **Sensibilité aux antibiotiques :** La bactérie était initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, mais l'acquisition de résistance est fréquente, surtout en milieu hospitalier**(Nauciel et vildé, 2005 in FAUCHERE et AVRIL, 2002)**.

- Cependant la résistance aux amino et aux carboxipénicillines par production de pénicillinase défasse 40 des souches, une partie de ces souches résistent à l'association amoxicilline-acide clavulainiquepour les autres antibiotiques, les fréquences de résistance, sont faible à l'exception des sulfa- mides (50%), et tétracyclines (40 %) et du chloromphimcol (25%)**(FAUCHERE et AVRIL, 2002)**.



Figure A7 .*Echirichia coli* sur Hecktoen.

2. Staphylococcus aureus

- **Habitat :** C'est un germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol, l'air. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. On le trouve à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles au niveau du Périnée ou des aisselles **(Fig. 14)(FAUCHERE et AVRIL, 2002).**
- **Caractères principaux :** Cocci à gram positif, immobile, pigmenté à jaune, non sporulé en amas (grappes de raisin), G+C: 30-39%, température optimal à 37°C, PH optimal: 7.2-7.4, NaCl: 7.5%, Anaérobie facultatif, oxydase+, catalase+ **(FAUCHERZ et AVRIL, 2002; NUCIEL et VILDE, 2005; DELLARRAS, 2007).**
- **Pouvoir pathogène :** Les manifestations dues à *Staphylococcus aureus* sont très nombreuses, elles sont suppurations, nécrotiques ou entériques:
    - les suppurations localisées.
    - Les manifestations digestives.
    - le syndrome de choc toxique **(FAUCHERE et AVRIL, 2002)**.
- **Sensibilité aux antibiotiques:** Les souches communautaires sont généralement résistantes aux pénicillines G et A, mais sensibles aux pénicillines M. Elles sont souvent sensibles aux macrolides, aux synergistines, aux fluoroquinolones **(FAUCHERE et AVRIL, 2002)**.



Figure A8 .*Staphylococcus aureus* sur Chapman.

3. bacillus subtilis

Caractères bactériologiques

Les bacillus correspondent à des grands bacilles :

- ✓ Gram +, sporogènes ;
- ✓ faciles à cultiver ;
- ✓ aérobies stricts ou facultatifs ;
- ✓ possédant une catalase.

Morphologie : Taille : 3 à 9 micromètres et 1 micromètre de large, forme rectangulaire et mobile. Isolés ou groupés en chaînes, ils peuvent représenter l'aspect en "canne de bambou". Coloration au Gram variable car ils se décolorent rapidemment. On peut donc les voir Gram + et Gram – sur un frottis.

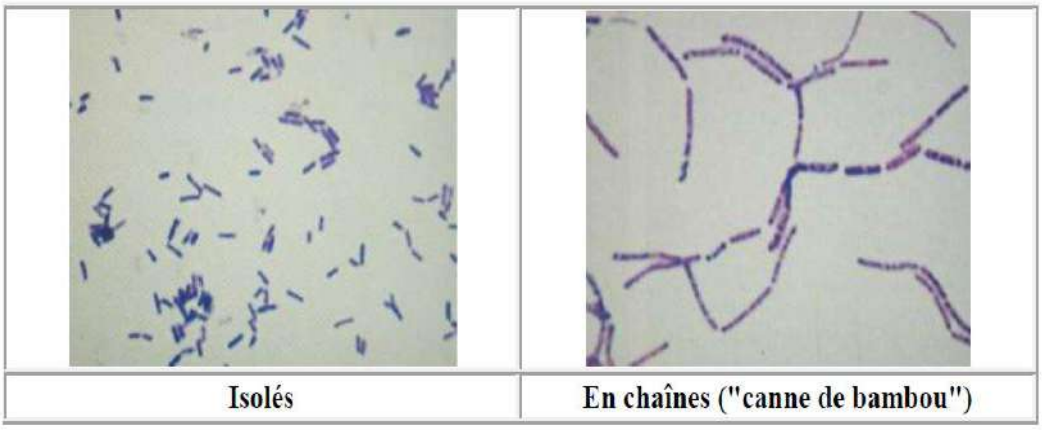


Figure A9 .*Bacillus subtilis.*

4. Candida albicans

C'est un organisme vivant à l'état normal de la bouche, le vagin et le tube digestif de l'être humain **(TONY et PAUL, 1997)**.

- **Caractères principaux :** *Candida albicas* est l'espèce de levure la plus connue .Au laboratoire médical, la culture en boite pétri donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème, elles poussent bien sur milieu de sabouraud ou sur gélose au sang **(CHAKON et BASSOU, 2005).**
- **Pouvoir pathogène**
- **Candidose :** Le principal agent pathogène est *Candida albicans* responsable d'infections superficielles aussi bien que systémiques .Ces dernières ne sont souvent que chez des individus immunodéprimés .Il fait partie de la flore normale de l'intestin ,les infections superficielles comprennent le muguet (sur la muqueuse buccale), des vulvo-vaginites .La pathogénisité de *Candida albicans* est liée à la phase de filamenteuse. Cette levure peut provoquer des infections du vagin, de la bouche ou des poumons.
- **Sensibilité aux antibiotiques :** Candida pathogène sont devenues résistantes à tous les antifongiques actuellement utilisés.



Figure A10.*Candida albicans.*