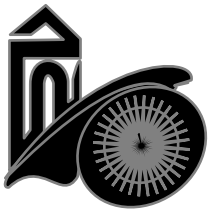
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

DEPARTEMENT DU GENIE DES PROCEDES ET ENVIRONNEMENT



Mémoire de Magister en Génie des procédés pharmaceutiques

Option : Procédés pharmaceutiques

Présenté par : **Djamel ATSAMNIA**

Thème

EXTRACTION, CARACTERISATION, ETUDE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE DE L'ALLICINE, ANTIBIOTIQUE EXTRAIT A BASE D'AIL (ALLIUM SATIVUM)

Devant le jury :

Mr Lyés DEKAR	**Maitre de Conférences A (UDYF -Médéa)**	**Président**
Mr Youcef BAL	**Professeur (USD-Blida)**	**Examinateur**
Mr Mohamed ZOUAMBIA	**Maitre de Conférences A (USTHB)**	**Examinateur**
Mr Salah HANINI	**Professeur (UDYF -Médéa)**	**Rapporteur**
Mr Othmane BENKORTBI	**Maitre de Conférences B (UDYF -Médéa)**	**Invité**

Année Universitaire 2010-2011

Résumé

Les vertus thérapeutiques de l'ail sont nombreuses et ancestrales. Avec le développement des techniques d'investigation physico-chimiques, biologiques et microbiologiques, le secret de ces vertus commence à être percé. C'est dans ce cadre de recherches que se situe l'objectif de notre travail.
A cet effet, après optimisation de l'extraction, notre intérêt s'est porté sur l'allicine un des constituants majeurs de l'extrait et le plus doué d'effets thérapeutiques d'entre eux. Une fois l'étude de la stabilité thermique de l'allicine finalisée, on a entamé successivement l'étude de ses propriétés antibactérienne, antifongique, hypoglycémiante et hypocholestérolémiante. Les résultats auxquels on a abouti sont encourageants à plus d'un titre et notamment celui relatif à l'effet hypoglycémiant de l'allicine.
Ce travail, au regard des résultats obtenus, nous offre des perspectives de recherche nombreuses et intéressantes.

Mots clès : Allicine, Extraction, stabilité, antibactérien, antifongique, hypoglycémie, hypocholéstérolémie.

ملخص

الخصائص العلاجية للثوم كثيرة وقديمة.و مع تطور تقنيات التحاليل الكيميوفيزيائية البيولوجية و الميكروبيولوجية قد بدا الغوص في سر هذه الفضائل وفي هذا الإطار من البحث يقع هدف عملنا هذا

ولهذه الغاية، وبعد تحسين الطريقة المثلى لعملية الاستخلاص ركزنا عملنا على الأليسين احد العناصر الرئيسية في مستخلص الثوم و الأكثر اثر علاجي، وبمجرد الانتهاء من دراسة الثبات الحراري للالأليسين، بدأنا بدراسة خصائصه كمضاد بكتيري، مضاد فطري، خافض لسكر ولكولسترول الدم. النتائج التي تم التوصل إليها مشجعة في كثير من النواحي ، بما في ذلك ما يتصل منه بتأثير الأليسين في نقص سكر الدم

و بالنظر لهذه النتائج، يقدم لنا هذا العمل فرص بحث كثيرة ومثيرة للاهتمام.

المفاتيح : ا ليسين، استخلآص، استقرار، مضاد بكتيري، مضاد فطري، خافض للسكري، خافض للكوليستيرول

Abstract

The therapeutic properties of garlic are numerous and ancient. With the development of investigative techniques physico-chemical, biological and microbiological processes, the secret of these virtues is beginning to be pierced. Within this framework of research that is the goal of our work.
To this end, after optimization of the extraction, this work focused on Allicin a major component of the extract and the most gifted of therapeutic effects of them. Once the study of thermal stability of allicin is finalized, we began the study of successively its antibacterial, antifungal, hypoglycemic and hypocholesterolemic. The results that were reached are encouraging in many respects, including that relating to the hypoglycemic effect of allicin.
This work, in terms of results, we offer research opportunities and many interesting

Key words : Allicin, Extraction, Antibacterien, Antifungul**,** hypoglycemic, hypocholesterolemic

DEDICACES

Je dédie ce travail à:

Mes parents pour leur soutien, leur aide, leur patience et leur amour.

Ma femme.

Mes enfants : Sara, Raouf, Ayoub et Younes.

Mes frères et sœurs.

Toute ma famille.

Mes amis Smail KOUADIK, Mabrouk HAMADACHE, Othmane BENKORTBI,

Redhouane TCHIKOU, Billal BENRAMOUL, Abdelhafid KADIK et Allel AZIZI.

Djamel

REMERCIEMENTS

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage »

Je remercie en premier lieu le dieu le tout puissant de nous avoir accordé la santé et la volonté pour terminer ce travail.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Salah HANINI** d'avoir accepté de diriger ce mémoire de Magister. Merci pour votre encadrement sans faille durant la réalisation de ce mémoire.

Monsieur le Docteur **Othmane BENKORTBI**, qu'il fut agréable et motivant d'avancer dans ce long et passionnant travail de Magister qui fut tellement enrichissant et stimulant avec toute votre bienveillance, votre confiance, votre encadrement scientifique et humain, votre disponibilité et votre savoir.

Je remercie le Docteur **DEKAR Lyes** Maitre de conférences A à l'université de Médéa d'avoir accepté d'être Président du jury.

Je remercie vivement le Professeur **BAL Youcef** de l'université de Blida et le docteur **ZOUAMBIA Mohamed** de l'université de Bab Ezzouar, pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du jury de ce mémoire. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir d'avoir pu faire votre connaissance et de pouvoir aujourd'hui vous soumettre mes travaux sur ce sujet qui nous tient tant à cœur.

Monsieur **HAMADACHE Mabrouk**, enseignant à l'université de Médéa, avec qui j'ai tant de fois eu de longues et enrichissantes discussions. Je vous adresse mes plus chaleureux remerciements.

Que madame **Amina TASSIST**, enseignante à l'université de Médéa, trouve ici mes sincères remerciements pour son aide précieuse et désintéressée.

Je remercie Mr **M.S. BOUKHECHEM**, enseignant à l'ENS de Kouba pour l'attention qu'il a porté à ce travail et pour ses précieux conseils.

Mes remerciements s'adressent au Dr **D.BOUDANA,** responsable du HALL de Technologie, à Mr. **R. ALOUAOUI** et Mme **R. GUENAOUI** pour leur aide.

Mes remerciements vont également, à Mme **S.KESKES**, directrice des laboratoires au niveau du complexe antibiotique SAIDAL de Médéa, pour m'avoir accueilli dans son service, et ce lors de la réalisation de ce travail.

C’est un grand merci que j’adresse à tous les membres du laboratoire de pharmacologie toxicologie générale et du laboratoire de microbiologie du complexe antibiotical de Médéa. C’est auprès de vous que j’ai appris tant de choses. Je citerai à titre exceptionnel respectivement Mrs : M.NEMRI ; O.MEDJADJI ; F.OUKRIF ; N.MAZARI et A.GANIF

Les analyses du sang ont été faites au niveau du laboratoire d’analyse du dispensaire de Theniet El Hadjar de Médéa .Que son personnel trouve ici l’expression de mes remerciements.

Liste des figures

		Page
Figure (I.1)	Photographie de l'ail (plante entière) et des fleurs……	05
Figure (I.2)	Le bulbe d'ail……	05
Figure (I.3)	Transformation de l'alliine en allicine et de l'allicine en disulfure d'allyle……	08
Figure (I.4)	Formation des ajoènes……	08
Figure (I.5)	Différents traitements appliqués à l'ail et produits obtenus……	09
Figure (I.6)	Récapitulatif des principales molécules présentes dans l'ail……	09
Figure (I.7)	Effet hypoglycémiant de l'extrait d'ail âgé chez les rats……	19
Figure (I.8)	Décomposition thermique de l'allicine……	26
Figure (I.9)	Chromatogramme d'extrait d'ail par le méthanol ……	31
Figure (I.10)	Chromatogramme d'un extrait d'ai frais ……	32
Figure (II.1)	Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur	39
Figure (II.2)	Montage de l'hydrodistillation simple……	40
Figure (II.3)	Appareil de type « Clevenger » pour l'hydrodistillation……	41
Figure (II.4)	Principe schématisé de l'extraction par hydrodiffusion ……	41
Figure (II.5)	Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro ondes..	43
Figure (III.1)	Différentes étapes de détermination de l'allicine……	56
Figure (III.2)	Technique du prélèvement sanguin réalisé sur les rats……	62
Figure (III.3)	Les extraits d'ail aqueux préparés par extraction……	62
Figure (III.4)	Opération de gavage de la solution aqueuse de l'extrait d'ail……	63
Figure (IV.1)	Couleur de l'extrait obtenu par les deux procèdes d'extraction……	66
Figure (IV.2)	Spectre IR de l'extrait d'ail……	68
Figure (IV.3)	Chromatogramme de l'extrait d'ail……	69
Figure (IV.4)	Les trois phases obtenues après extraction et avant séparation……	70

Figure (II.5)	Rapport phase organique/ phase aqueuse……	70
Figure (IV.6)	Variation de la quantité du DEE pour une même quantité d'eau……	71
Figure (IV.7)	Variation de la phase aqueuse pour une même quantité du DEE……	72
Figure (IV.8)	Chromatogrammes montrant la variation de la quantité d'allicine. en fonction de la température……..	73
Figure (IV.9)	Photos choix de la souche……..	74
Figure (IV.10)	Méthode des dilutions en milieu liquide……..	75
Figure (IV.11)	Détermination de la C.M.I par la méthode de diffusion en milieu solide sur *S aureus*……..	76
Figure (IV.12)	Détermination de la C.M.I par la méthode de diffusion en milieu solide sur E. Coli……..	76
Figure (IV.13)	Diamètre d'inhibition à T=50°C et T=75°C après une heure d'incubation……	78
Figure (IV.14)	Diamètre d'inhibition à T=50°C et T=75°C après 6 heures d'incubation……	78
Figure (IV.15)	Influence de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail vis-à-vis de *S. aureus*……..	79
Figure (IV.16)	Zones d'inhibition d'*E coli* obtenues pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (25-75°C) pendant une heure……..	80
Figure (IV.17)	Zones d'inhibition d'*E coli* obtenues pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (50°C et 75°C) pendant 3 heures……..	80
Figure (IV.18)	Effet du pH sur l'activité antibactérienne de l'allicine : Zones d'inhibitions enregistrées aux différents pH……..	82
Figure (IV.19)	Diamètre d'inhibition (a. Oxacilline ; b. Gentamycine)……..	83
Figure (IV.20a)	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice par la méthode de diffusion en milieu solide sur *Candida albicans*……..	86
Figure (IV.20b)	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice par la méthode de diffusion en milieu solide sur *Saccharomyces cerevisiae*……..	86
Figure (IV.21)	Zones d'inhibition pour *Candida albicans* obtenus pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (25-75°C) pendant une heure……	87
Figure (IV.22)	Zones d'inhibition pour *Candida albicans* obtenus pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (25-75°C) pendant deux heures……	87
Figure (IV.23)	Zones d'inhibition pour *Candida albicans* obtenus pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (25-75°C) pendant quatre heures……	87
Figure (IV.24)	Influence de la température sur l'activité antifongique de l'extrait d'ail vis-à-vis de *Candida albicans*……..	88
Figure (IV.25)	Etat des Rats alloxaniques traités par l'extrait d'ail maintenu à 4°C……..	90

Figure (IV.26) Etat des Rats alloxaniques traités par l'extrait d'ail exposé à une température de 75°C..... 90

Figure (IV.27) Etat des Rats alloxaniques traités par la Metformine HCl..... 91

Figure (IV.28) Etat des Rats alloxaniques sans traitement durant 5 semaines..... 92

Figure (IV.29) Etat des Rats non alloxaniques ayant subit un traitement à l'extrait d'ail (4°C) 93

Figure (IV.30) variation du poids des rats pour chaque lot durant la période d'observation 94

Figure (IV.31) Effet hypolipidémiant des rats hypercholestérolemiques et normocholesterolémiques..... 96

Liste des tableaux

		Page
Tableau (III.1)	Produits utilisés lors de l'extraction de l'extrait d'ail et de son analyse par HPLC……	49
Tableau (III.2)	Matériels utilisés lors des analyses microbiologiques……	49
Tableau (III.3)	Appareillages utilisés (extraction et analyses)……	50
Tableau (III.4)	conditions d'analyses par HPLC……	52
Tableau (III.5)	Effet du rapport phase aqueuse (eau) / phase organique (D.E.E)……	55
Tableau (III.6)	Composition du milieu de culture……	57
Tableau (III.7)	Normes en glycémie, cholestérolémie et triglycérides chez les rats……	61
Tableau (III.8)	Répartition des réactifs dans les tubes……	65
Tableau (IV.1)	Pourcentage d'Allicine dans l'extrait en fonction de la température et du temps de conservation (analyse HPLC)……	73
Tableau (IV.2)	Diamètre des zones d'inhibition des souches……	74
Tableau (IV.3)	Diamètre des zones d'inhibition obtenus par la méthode de diffusion en milieu solide……	77
Tableau (IV.4)	Diamètres des zones d'inhibition d'*E coli* enregistrés……	81
Tableau (IV.5)	Diamètre d'inhibition de S. aureus obtenus pour des……	84
Tableau IV.6	Diamètre des zones d'inhibitions obtenus pour l'étude antifongique……	85

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association Francaise de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CRD : Centre de Recherche et Développement

D.E.E : DiEthyle Ether

D.O : Densité Optique

FTIR : Infra Rouge à Transformée de Forrier

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IR : Infra Rouge

UV-VIS : Ultra Violet-visible

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 01

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 03

Partie I - L'AIL 03

I.1 Etude botanique 03

I.1.1. Classification 03

I.1.2. Distribution géographique..... 03

I.1.3. Description botanique..... 04

I.1.4. La drogue 04

I.2. Etude chimique 06

I.2.1. Analyse quantitative des composés contenus dans l'ail 06

I.2.2. Analyse qualitative des composés contenus dans l'ail 07

I.2.3. Identification..... 10

I.3. ETUDE PHARMACOLOGIQUE..... 11

I.3.1. Historique et Emplois 11

I.3.2. Propriétés diverses 11

I.3.2.1 Propriétés antiseptiques, antibactériennes, antivirales, antifongiques, antiparasitaires 11

I.3.2.2. Modifications des sécrétions respiratoires 12

I.3.2.3. Propriétés préventives vis-à-vis du cancer 12

I.3.2.4. Action hypoglycémiant 13

I.3.2.5. Propriétés cardiovasculaires 14

I.3.2.6. Autres propriétés 15

I.3.3. Effet hypocholestérolémiant 15

I.3.4. Etudes sur cultures cellulaires 17

I.3.5. Etudes chez l'animal 17

I.4. UTILISATION DE L'AIL 19

I.5. TOXICITE DE L'AIL 20

I.5.1. Odeur de l'ail 20
I.5.2. Effets indésirables rencontrés lors de l'utilisation de l'ail 20
I.5.3. Toxicologie 21
I.5.4. Contre-indications 21
I.6. CONCLUSION 21
Partie II - REVUE SUR LES MÉTHODES ANALYTIQUES 24
I.7. METHODE COLORIMETRIQUE POUR LA DETECTION DES THIOSULFINATES 24
I.8.TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES..... 25
I.8.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) 25
I.8.2. Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP ou HPLC) 27
I.8.3. HPLC en phase inverse..... 28
I.8.4. HPLC en phase normale 29
I.8.5. HPLC couplée à la spectrométrie de masses (CL-MS) 31

CHAPITRE II : LES EXTRAITS A BASE DE PLANTES 33

1ére PARTIE : PRESENTATION 33
II.1 INTRODUCTION 33
II.2 TYPES D'EXTRAITS 33
II.2.1 Extraits titrés 33
II.2.2. Extraits quantifiés 33
II.3 EXTRAITS NATURELS 34
II.3.1 Eau aromatique (hydrolat) 34
II.3.2 Intrait 34
II.3.3 Alcoolat 34
II.3.4 Extrait 34
II.3.4 Extrait fluide 35
II.3.6 Extrait mou 35
II.3.7 Absolue 35
II.3.8 Concrète 35
II.3.9 Résinoïde 35
II.3.10 Pommade florale 35

II.3.11 Teinture 36
II.3.12 Les huiles médicinales 36
II.3.12.1 Les huiles médicinales élaborées à chaud 36
II.3.12.2 Les huiles médicinales élaborées à froid 36
II.3.13 Les huiles essentielles 36
2éme PARTIE : PROCEDES D'OBTENTION DES EXTRAITS 37
II.4 INTRODUCTION 37
II.5 INTERET DE L'EXTRACTION 38
II.6 LES METHODES D'EXTRACTION 38
II.6.1 Extraction a la vapeur d'eau 38
II.6.1.1 Entraînement à la vapeur 38
II.6.1.2 Hydrodistillation 39
II.6.1.3 Hydrodiffusion 41
II.6.1.4 Distillation à la vapeur saturée 42
II.6.1.5 Hydrodistillation par micro-ondes 42
II.6.1.6 Extraction au moyen de solvants 42
II.6.1.7 Technique d'enfleurage 46
II.6.1.8 Extraction par CO_2 46
II.6.1.9 L'expression à froid 48
II.6.1.10 Le cryobroyage 48

CHAPITRE III : PROCEDURE EXPERIMENTALE 49

III. MATIERE VEGETALE 49
III.1. produits chimiques 49
III.2. matériel microbiologiques 49
III.3. Matériels 50
III.4. Outils analytiques 50
III.4.1. Spectrophotométrie UV-Visible 50
III.4.2. Spectrométrie Infrarouge (IR) 51
III.4.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) 51
III.5. Choix du solvant d'extraction 52
III.5.1. Mode opératoire 52

III.5.2. Choix du procédé d'extraction 52
III.5.2. 1. Extraction par hydrodistillation 53
III.5.2. 2. Extraction a froid 53
III.5.3. Caractérisation de l'extrait 54
III.5.3.1. Caractérisation organoleptique de l'extrait 54
III.5.3.2. Caractérisation physico-chimique de l'extrait 54
III.5.4. Caractérisation de l'allicine dans l'extrait d'ail 55
III.5.5. Effet du rapport phase aqueuse/ phase organique 55
III.5.6. Stabilité thermique de l'allicine 56
III.6. Etude microbiologique de l'allicine 57
III.6.1. Effet antibactérien 57
III.6.1.1. Milieu de culture 57
III.6.1.2. Choix de la souche 57
III.6.1.3. Critères de choix de la souche utilisée dans les tests d'inhibition 57
III.6.1.4. Mode opératoire 58
III.6.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) 58
III.6.2.1. Définition de la CMI 58
III.6.2.2. Méthode de dilution en milieu liquide 58
III.6.2.3. Méthode de diffusion en milieu solide 59
III.6.3. Effet des facteurs physico-chimique sur l'activité antibactérienne 59
III.6.3.1. Effet de la température 59
III.6.3.2. Effet du pH 60
III.6.4. Etude comparative entre l'allicine et quelques antibiotiques 60
III.7.Etude de l'activité antifongique 60
III.8. Etude in vivo de l'activité hypoglycémiante et hypocholestérolémiante de l'allicine 60
III.8.1. Cadre d'étude 60
III.8.2. Matériel animal 61
III.8.3. Critères du choix des Rats 61
III.8.4. Prélèvement de sang 61
III.8.5. Préparation des extraits d'ail 61
III.9. Etude de l'activité antidiabétique de l'allicine 62
III.9.1. Induction du diabète 63
III.9.2. Essais de correction de la glycémie 63

III.9.3. Dosage du glucose 64
III.9.3.1. Mode opératoire 64
III.9.4. Etude de l'activité hypo-lipémiante 65
III.9.4.1. Induction de l'hyper-cholestérolémie chez les rats 65
III.9.4.2. Essais sur des rats hyper-cholestérolemiques 65

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS 66

IV.1. QUALITE D'EXTRAIT OBTENU PAR LES DIFFERENTS PROCEDES D'EXTRACTION 66
IV.2. CARACTERISATION DE L'EXTRAIT OBTENU PAR SOLVANT A FROID 67
IV.2.1. Rendement 67
IV.2.2. Densité 67
IV.2.3. Indice de réfraction 67
IV.2.4. Miscibilité dans l'eau à 20°C 68
IV.2.5. Miscibilité dans les solvants organiques 68
IV.2.6. Spectrométrie Infrarouge (IR) 68
IV.2.7 Caractérisation par HPLC de l'allicine dans l'extrait d'ail 69
IV.3. OPTIMISATION DU RAPPORT PHASE AQUEUSE / PHASE ORGANIQUE 69
IV.4. STABILITE THERMIQUE DE L'ALLICINE 72
IV.5. EFFET ANTIBACTERIEN DE L'ALLICINE 74
IV.5.1 Choix de la souche 74
IV.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) 75
IV.5.2.1. Méthode de dilution en milieu liquide 75
IV.5.2.2. Méthode de diffusion en milieu solide 76
IV.5.3. Effet des facteurs physico-chimique sur l'activité antibactérienne 78
IV.5.3.1. Effet de la température 78
IV.5.3.2. Effet du pH 81
IV.5.3.2. Etude comparative entre l'allicine et quelques antibiotiques 83
IV.6. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE 84
IV.6.1. Determination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) 84
IV.6.2. Effet de la température sur l'effet antifongique 87
IV.7. ETUDE IN VIVO DE L'ACTIVITE HYPOGLYCEMIANTE ET HYPOCHOLESTEROLEMIANTE DE L'ALLICINE 89
IV.7.1. Activité hypoglycémiant 89

IV.7.1.1. Essais d'induction du Diabète chez les rats 89

IV.7.1.2. Essais de correction de la glycémie par l'extrait d'ail frais 89

IV.6. SUIVI PHYSIOLOGIQUE DES DIFFERENTS LOTS DE RATS 94

IV.7. ETUDE COMPARATIVE 94

IV.8 Activité hypocholestérolémiante 95

IV.8.1 Induction de l'hyper-cholestérolémie chez les rats 95

IV.8.2 Essais sur des rats hyper-cholestérolémiques 95

CONCLUSION 98

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique courante depuis des millénaires. Ce phénomène a eu un regain d'intérêt avec les premières recherches sur les multiples propriétés thérapeutiques des plantes pour tenter de donner une base scientifique à ces pratiques empiriques. Actuellement, l'intérêt pour la phyto-chimiothérapie se retrouve partout dans le monde.

Parmi ces plantes, on retrouve l'ail (*Allium sativum*). Cette plante est utilisée depuis plusieurs centaines d'années pour traiter divers problèmes de santé. On croit que l'origine de l'ail remonte à 7000 ans et qu'il provient du désert Kirgiz de la Sibérie. Les Egyptiens de l'Egypte ancienne l'importaient pour nourrir les esclaves qui ont bâti les pyramides afin de les garder en santé et de les prévenir contre les infections. À l'époque de la Grèce ancienne, on consommait l'ail en grande quantité pour améliorer la circulation sanguine et pour fortifier les muscles. Depuis cette époque, l'ail occupe une place de choix dans les différentes civilisations qu'a connu le monde.

Au cours des 50 dernières années, un nombre impressionnant d'études sur l'ail - publiées dans le monde entier - ont confirmé de nombreuses propriétés bénéfiques de l'ail. Ces études ont été réalisées afin de mieux cerner les principes actifs de l'ail et leurs effets physiologiques. De tous ces nombreux principes ou composés actifs, l'allicine reste le composé le plus intéressant du fait qu'on lui attribue la plupart des actions bénéfiques de l'ail.

Les objectifs assignés à notre projet de Magister sont multiples. Dans un premier temps, on s'attèlera au choix de la méthode d'extraction qui nous permettra d'avoir un extrait riche en allicine et ce par utilisation de la chromatographie liquide à haute performance. Suite à cela, comme second objectif, on se propose de suivre la stabilité de l'allicine à différentes températures afin de déterminer les conditions optimales de conservation de ce principe actif.

Ce suivi sera effectué moyennant l'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance. Dans une troisième étape, il sera question d'évaluer successivement l'action antibactérienne, antifongique, hypoglycémiante et cholestérolémiante de l'allicine et de confirmer les résultats auxquels ont abouti d'autres chercheurs.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, consacré à la revue bibliographique, nous traiterons la présentation de l'ail, de ses composés, de leurs différentes actions thérapeutiques ainsi que des techniques analytiques utilisées. Le second chapitre est consacré à une revue générale sur les extraits végétaux ainsi qu'aux différentes méthodes d'obtention de ces extraits.

Les chapitres trois et quatre de cette thèse regroupent successivement la partie expérimentale de tous nos travaux ainsi que les résultats et discussions auxquels on a abouti. Une conclusion mettant en exergue les objectifs atteints par rapport à ceux qu'on s'est assignés et les éventuelles perspectives de ce travail clôturera cette thèse de Magister.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I - L'AIL



Photo ***Allium sativum L*** Tibetan medicine **(encyc1opedia 2005)**

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., 1980**) « Allium » provient du celtique «All » 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.,1980).**

I.1.2. Distribution géographique

L'ail est originaire d'Asie Centrale (**Thompson., 2003, 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., 1993, Girre., 1980**). Sa culture peut se faire à partir de bulbilles situés dans l'inflorescence ou à partir des fragments du bulbe (caïeux) (**Delaveau., 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., 1982)**. Elle est représentée sur la figure I.1. Son odeur est forte et piquante (**Garnier et al. 1961**). Sa tige est creuse et peut atteindre 50 cm de hauteur (**Girre., 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 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., 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 et al. 1961**).

Après fécondation, 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 **Garnier et al. 1961**). Le style est mince et persistant, le stigmate quant à lui est petit.

I.1.4. La drogue

C'est le bulbe ou « tête d'ail» (figure I.2). Il a une odeur caractéristique (**Girre., 1980, Girre., 2001**). Il est utilisé depuis l'Antiquité comme antiseptique. Il fournit, après cryodessiccation ou séchage à une température inférieure à 65 "C, la poudre d'ail officinale (Pharmacopée Européenne, 3ème édition, 1998, **Bruneton., 1999**). La poudre contient au minimum 0,45 % d'allicine.

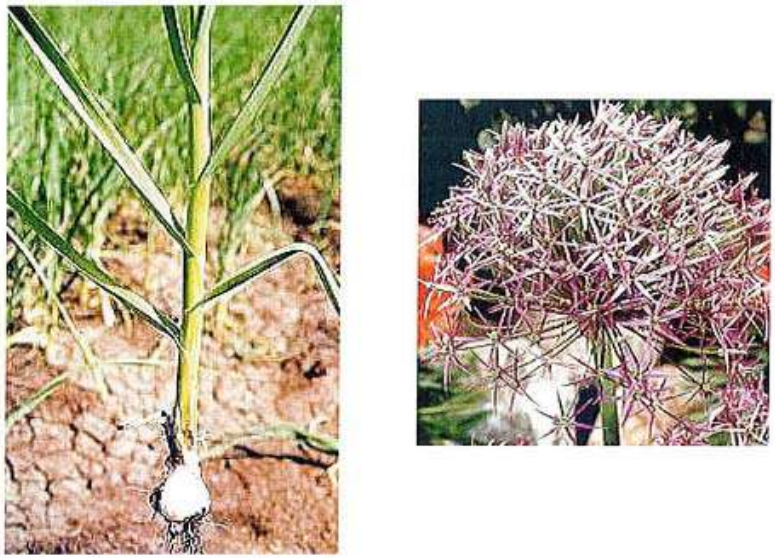


Figure I.1 : Photographie de l'ail (plante entière) et des fleurs (**Lefrancois et al., 2005**).

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 : le bulbe d'ail (**Proteus., 2005**)

I.2. ETUDE CHIMIQUE

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

Les parties comestibles contiennent (**Garnier 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 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., 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) .

Les caïeux donnent de 0,680 à 0,750 % d'huile essentielle (en % du poids sec). Les tiges fournissent 0,665 à 0,720 % d'huile essentielle par expression (**Garnier 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., 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., 1999, Delaveau., 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., 1998**). Le bulbe d'ail en contient en moyenne de 0,35 % à 1,15 % (68) 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 2-propènesulfènique, qui sera immédiatement transformé en allicine (0,3 % de la masse fraîche) (**Taira ., 1991, Delaveau., 1982, Grun., 1998, Girre., 2001)**. L'allicine (ou allyl-2 propènethiosulfate) a été isolée pour la première fois en 1944 par Chester 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., 1998**). Il se décompose, selon la température et les conditions du milieu en composés soufrés volatiles et fortement aromatiques **(Wichtl et Anton., 2003).** D'autres précurseurs sont également retrouvés: la cycloalliine et la méthylalliine qui sont décomposés en trisulfure de méthylalliine.

L'oxydation par l'air de l'allicine conduit au 1,7-dithiaocta-4,5-diène, ou disulfure de diallyle (figure I.3) (6 % de la masse sèche (**Garnier., 1961**) : c'est lui qu'on retrouve majoritairement dans l'«essence» d'ail (**Delaveau., 1982, Grun., 1998**. On retrouve également divers vinyldithiines provenant de la cycloaddition du propènethial par exemple (**Wichtl et Anton., 2003**).

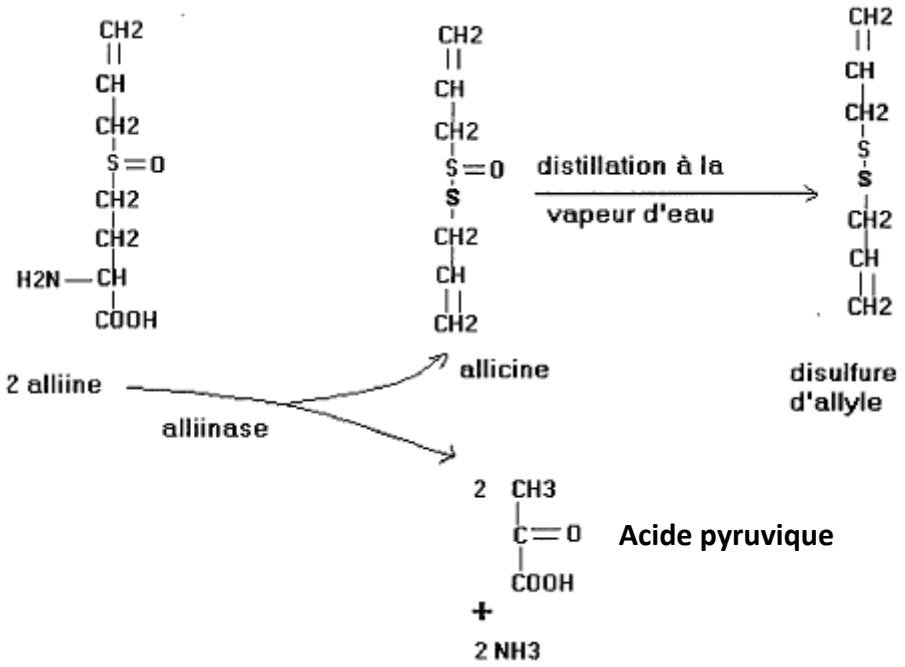


Figure I.3 : Transformation de l'alliine en allicine et de l'allicine en disulfure d'allyle

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-S- oxyde) et de produits de cycloaddition du propènethial (vinyldithiines) (**Anderson et al., 2000**). Les ajoènes sont des produits obtenus secondairement par dégradation de l'allicine (figure I.4). 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.

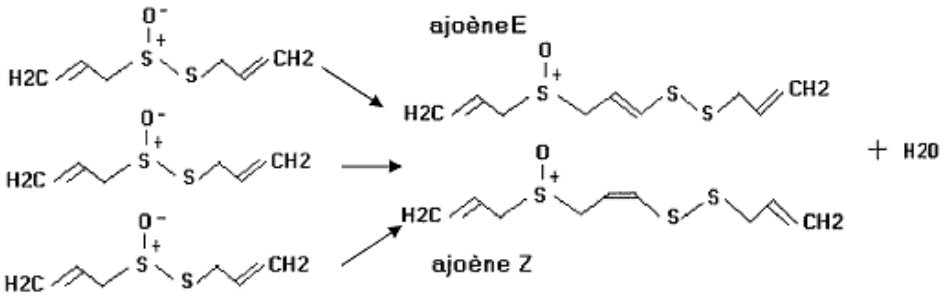


Figure I.4 : Formation des ajoènes

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 8 récapitule les différents traitements pouvant être appliqués à l'ail et les produits obtenus. La figure I.5 reprend les différentes molécules retrouvées dans l'ail.

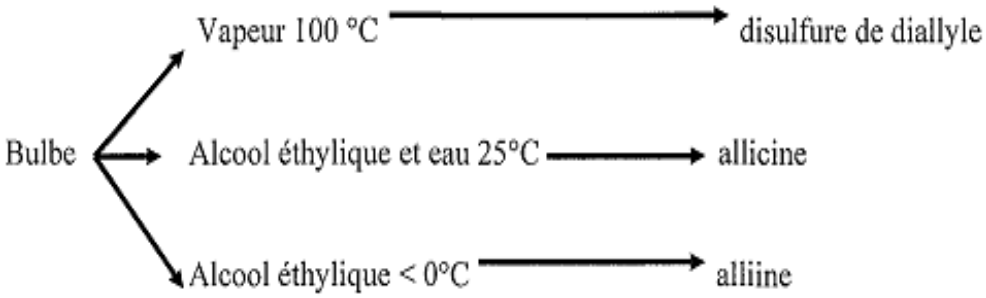


Figure (I.5) : Différents traitements appliqués à l'ail et produits obtenus

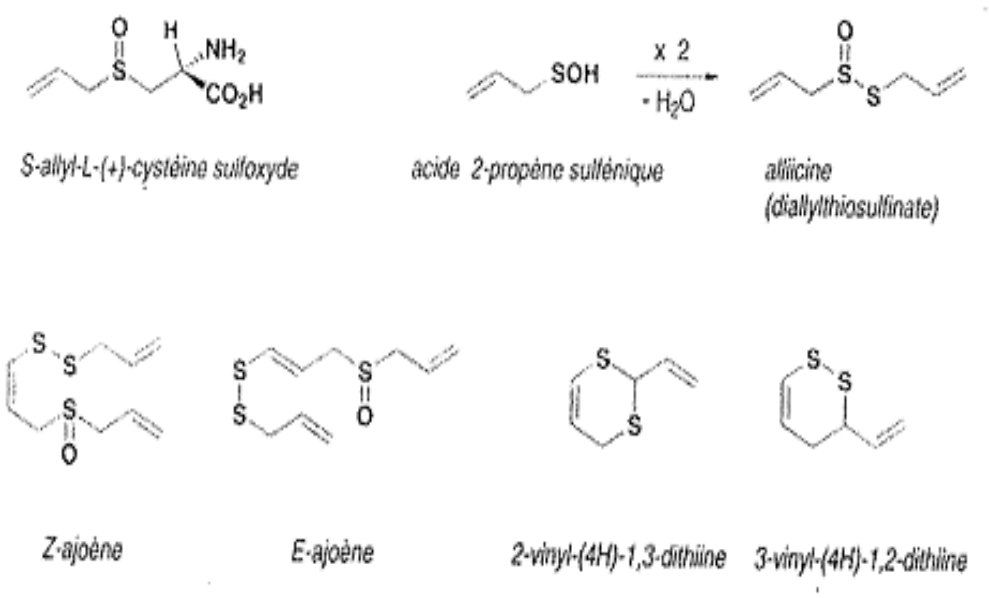


Figure I.6 : Récapitulatif des principales molécules présentes dans l'ail (**Bruneton., 1999**)

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., 1987**). On retrouve jusqu'à 127 mg de vitamine C pour 100 g de feuilles sèches. L'huile essentielle contient de l'allicine, des sulfides, des diallyles, divers ferments, de la vitamine A_I, B_I, B_2 et du nicotylamide (**Schauenberg., 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 (CCM) (**Khalili 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 µl. de solution à examiner et 1µl, 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 et Moyse., 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 Grecs et les Romains en faisaient grand usage pour diminuer la fatigue (**Kasuga 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 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 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., 1977, Amagase et al., 2001**). En homéopathie, il est utilisé sous forme de teinture de bulbe frais (55).

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., 1993, Valnet., 1982**). Il a des propriétés bactéricides (l'activité bactéricide a été découverte par **Pasteur** en 1885 (**Grun., 1998**). Il a été montré que le jus d'ail dilué 125000 fois avait des propriétés inhibitrices sur le développement des Staphylocoques, des Streptocoques,

des Vibrio, des Bacillus et une activité sur certains champignons zoopathogènes et de nombreuses levures.

Daif., 1993 a prouvé son activité antifongique sur Microsporum, Tricophyton, Candida, Cryptococcus et Aspergillus. Les études de l'Institut des Plantes Médicinales de Poznan (Pologne) ont montré son action importante sur les dermatophytes (**Grun., 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. 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., 1976, Schauenberg., 1977, Wichtl et Anton., 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., 2001**).

Les saponines stéroïdiennes contenues dans l'ail auraient aussi un rôle antifongique et antibactérien. L'éruboside B a une activité contre Candida albicans comparable à l'activité de l'allicine et des ajoènes (**Matsuura., 2001**47).

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. Il a également certaines propriétés curatives et préventives dans la coqueluche (**Leclerc., 1976**). Il possède aussi des propriétés expectorantes (**Schauenberg., 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. **Bruneton**., **1999** a émis l'hypothèse que l'ail augmenterait la sécrétion de suc gastrique et désinfecterait l'intestin (**Leclerc., 1976**). La S-allylcystéine (composé stable et inodore) inhiberait le processus de cancérogénèse (**Amagase 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., 2001**).

Une étude réalisée en Chine a montré que des composés soufrés, notamment le disulfure d'allyle, diminuent 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 (**Wichtl et Anton., 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.

Différentes préparations d'ail ont été testées chez des rats par **Kasuga et al., 2001** pour leur activité antitumorale. 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 NK et des cellules «killers » . Le jus d'ail chauffé a aussi une petite activité. Les deux autres préparations sont sans effet.

I.3.2.4. 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., 1993**). Il semblerait que l'éventuel pouvoir hypoglycémiant de l'ail soit dû à l'allicine et au disulfure d'allylpropyle (**Girre ., 2001**).

I.3.2.5. 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., 1998**). La prise régulière d'ail a la capacité de diminuer le pression artérielle (**Valnet., 1982, Yeh et Liu., 2001**).

(Jenkins., et al., 1997) ont administré à des 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., 2001**).

Il existe une spécialité à base d'ail qui agit en prévention ou en association avec le traitement de l'affection cardiovasculaire (**Daif., 1993**). L'huile essentielle d'ail a une activité fibrinolytique (69), 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. **Obata., 1998** a également démontré les propriétés antiagrégantes plaquettaires in vivo et in vitro. L'effet antiagrégant plaquettaire serait dû aux ajoènes (**Grun., 1998**, **Amagase 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., 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., 2001**). L'allicine, quant à elle, a un rôle sur les plaquettes, les neutrophiles par un mécanisme faisant intervenir les ions calcium. Certaines saponines comme l'isoéruboside B inhibe la coagulation sanguine et a un effet promoteur sur la fibrinolyse (comme le protoisoéruboside B) (**Matsuura., 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.

I.3.2.6. 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., 1976**). L'ail est aussi cholérétique et cholagogue (**Schauenberg., 1977**). Les fructosanes contenus dans l'ail ont aussi une certaine activité diurétique. L'allisatine et les saponines stéroïdiennes de l'ail ont montré une activité antiinfiammatoire. 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 et Liu., 2001**), il entrerait en jeu dans des processus de détoxification, de radioprotection. Il a également été prouvé que les produits à base d'ail ont des effets protecteurs hépatiques contre les toxines comme l'alcool (**Cui 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. 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 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 et Anton ., 2003**). Il est en effet important de conserver le système «alliine-alliinase» et d'inhiber une transformation ultérieure de l'allicine déjà formée. Certaines poudres ont la réputation de «générer de l'allicine » mais pas en quantité réellement appréciable. Les sucs gastriques et les sécrétions intestinales les altèrent (**Amagase 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 triterpéniques (**Wichtl et Anton ., 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.

- 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., 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 (**Wichtl et Anton., 2003**).

- 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. 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 (**Daif., 1993, Wichtl et Anton ., 2003**).

I.3.4. 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 (69). 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 et Liu., 2001**).

I.3.5. Etudes chez l'animal

Brown., 1999 a réalisé une étude chez le lapin. 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 béta-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 (Béta-lipoprotéines et une augmentation des béta-lipoprotéines. L'ail augmenterait l'activité fibrinolytique par rapport à un régime à base de cholestérol sans ail.

Lata et al., 1991 ont utilisé des rats rendus hyperlipémiques pour leurs expériences. 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 LDL- cholestérol et une augmentation relative en HDL-cholestérol.

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

Aoudi et al., 2002 étudièrent l'effet hypocholestérolémique de l'ail. 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 HDL-cholestérol 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.

Yeh et Liu., 2001 ont nourri des rats avec un régime riche en graisses. Les concentrations en cholestérol total et en triglycérides furent plus basses dans le groupe « rats

supplémentés en ail» que dans le groupe «placebo» (figure I.7). En blanc est représenté le groupe « placebo» et en noir, le groupe «intervention».

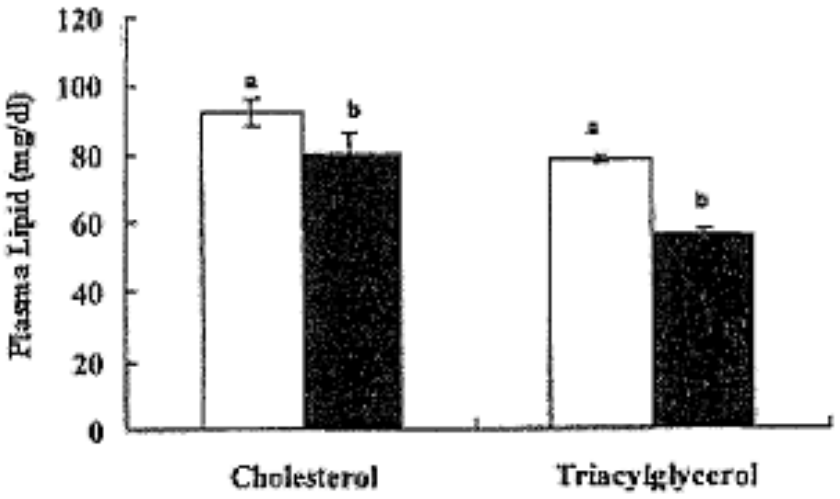


Figure I.7 : Effet hypoglycémiant de l'extrait d'ail âgé chez les rats, **(YEH Y.Y, LIU L., 2001)**

I.4. 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.5. TOXICITE DE L'AIL

I.5.1. Odeur de l'ail

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

Leclerc., 1976 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., 1974, Valnet., 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.5.2. 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 et Anton, 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. Ils peuvent être à l'origine d'anémies et d'une inhibition de la spermatogénèse.

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. (**Yeh et Liu., 2001**) . Des saignements peuvent se produire lorsque les doses usuelles sont dépassées.

I.5.3. 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., 1983**). Des lavements à base d'ail (dans le but d'expulser des vers intestinaux) à fortes doses peuvent provoquer une dysentérie. 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). L'alliine est un des plus irritants et le DAS est le plus allergène. L'allicine peut se comporter comme un agent oxydant et entraîner des irritations de l'estomac et l'intestin (**Amagase et al., 2001).**

L'extrait d'ail vieilli ne présente pas d'effets indésirables (3). La S-allylcystéine est 30 fois plus toxique que l'allicine et le DADS. En revanche, la cancérogénécité et la tératogénécité ne sont pas établies.

I.5.4. Contre-indications

Les dermatoses, les dartres, les irritations de l'estomac et des intestins contre-indiquent l'utilisation de l'ail (**Valnet., 1982, Vega-Lopez., 2003**).

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.

I.6. CONCLUSION

L'ail est désormais une plante bien connue. Son action repose sur les dérivés soufrés: alliine, allicine et 6Z- et 6E-ajoènes. Ses propriétés antiseptiques, antibactériennes, antivirales,

antifongiques sont indéniables. Elles proviennent de l'allicine, des saponines stéroïdiennes et des ajoènes. Une action contre le cancer de l'allicine, de la S-allylcystéine et des saponines a aussi été notée.

L'ail semble aussi faire preuve d'une action hypoglycémiante mais cela reste à confirmer.

Son éventuel pouvoir hypocholestérolémiant a été bien étudié. L'action hypocholestérolémiante proviendrait des composés sulfurés de l'ail. Des études sur cultures cellulaires d'hépatocytes ont montré une action concertée de tous les composants de l'ail avec une efficacité plus marquée des composés hydrophiles. Des études animales chez le lapin et le rat ont montré une nette diminution des LDL et du cholestérol avec l'ail et une action sur l'artériosclérose. On retrouve une diminution des activités hépatiques des enzymes de la lipogénèse et de la cholestérogénèse (enzyme malique, acide gras synthétase, glucose-6-synthétase et HMG-coA réductase).

Des études cliniques sont venues appuyer ces études animales. L'étude de **Turley., 1995** a retrouvé des résultats intéressants mais l'échantillon étudié est faible et il apporte peu de précisions quant aux modalités de son étude. L'étude de **Marlet**, **2003** est plus significative (échantillon important et étude sur 4 mois) : l'ail fait preuve d'une action hypocholestérolémiante chez des patients hypercholestérolémiques. **Adler., 1997** a noté des résultats positifs chez des patients hypercholestérolémiques sans traitement et non malades.

Le mécanisme à l'origine de l'action hypocholestérolémiante serait une inhibition de l'HMG- coA réductase. Dans cette étude, on constate aussi une diminution de la pression artérielle. **Gupta et Porter., 2001** retrouvent, quant-à-eux, une inhibition de la squalène monooxygénase par la sélénocystine, l'alliine, le diallyltrisulfide, le diallyldisulfide et surtout la S-allyl-cystéine. YEH et LIU, qui ont réalisé une étude chez des sujets hypercholestérolémiques ont retrouvé eux-aussi des effets positifs de l'ail sur le cholestérol. Il est important également de noter que la métaanalyse de 13 études a retrouvé des résultats encourageants pour le cholestérol total mais pas de différence significative pour la diminution des LDL et

l'augmentation des HDL. Au vu de toutes ces études, le pouvoir hypocholestérolémiant de l'ail se voit confirmer.

A cette action s'ajoutent d'autres actions bénéfiques de l'ail au niveau cardiovasculaire: une action vasodilatatrice, fibrinolytique (de l'huile essentielle), anti-agrégante plaquettaire (ajoènes, disulfure d'allyle, trisulfure d'allyle et trisulfure de méthylallyle) et une inhibition de la coagulation (isoéruboside B = saponine).

L'ail possède donc un réel potentiel dans le traitement des maladies cardiovasculaires. A dose modérée, il présente peu d'effets indésirables et ces effets indésirables peuvent être maîtrisés par une galénique adaptée. Aucune étude qui comparerait l'ail et les traitements médicamenteux actuels de l'hypercholestérolémie n'a été retrouvée. De même, l'association médicament/ail ne semble pas avoir été évaluée. Des études complémentaires mériteraient donc d'être entreprises. Cependant, compte-tenu des résultats présentés ici, nous estimons que l'ail peut tout-à-fait être proposé en première intention chez des patients avec une hypercholestérolémie modérée en association au régime. Le cas des fortes hypercholestéromies est plus délicat mais on pourrait envisager un apport d'ail complémentaire au traitement médicamenteux. Peu d'effets indésirables sont à craindre et le bénéfice apporté par l'ail est non négligeable.

Partie II - REVUE SUR LES MÉTHODES ANALYTIQUES

Les propriétés antibactériennes de l'extrait de l'ail frais ont d'abord été reconnues par Pasteur en 1858 et même dès 1892 Semmler avait réussi à obtenir entre 0,1% - 0,2% de rendement d'huile volatile de gousses d'ail par distillation à la vapeur. **Platenius**., **1935, Culter et Wilson., 2004, Shafiur et al., 2010** ont développé une méthode d'évaluation de saveur par laquelle les sulfures dans les distillats de pétrole pourraient être oxydés en sulfate dans l'eau de brome, l'excés du brome récupéré par chauffage et la précipitation du sulfate est obtenu par utilisation du chlorure de baryum. Dix ans plus tard, cette méthode a été améliorée par **Currier**., **1945, Pablo et al., 2004** ont travaillé avec de faibles températures et ont converti le soufre en bleu de méthylène, effectuant ainsi une détermination colorimétrique. Bien que l'utilisation du soufre total comme une mesure de l'ail piquant a été développée plus tard par **Kohman et Farber., 1947 Cavallito et al., 1944, Han et al., 1995** sont les premiers à avoir déterminé la structure chimique de l'allicine et sa réaction avec la cystéine :

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

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

$$RS(O)CH_2CHNH_2COOH + H_2O \rightarrow [RSOH] + NH_3 + CH_3COCOOH \text{ (pyruvic acid)}$$

I.7. METHODE COLORIMETRIQUE POUR LA DETECTION DES THIOSULFINATES

Les premières investigations au Japon dans la formation des thiosulfinates dans l'ail ont conduit à l'élaboration d'une technique chromatographique qui repose sur le développement d'une couleur rouge-orange formée par une réaction avec le sodium alcalin nitroprussiate. Cette réaction colorée a été limitée par son incapacité à distinguer entre les thiosulphonates et les thiosulfinates et que le développement de la couleur n'était pas permanente.

Durant la même période, aux Etats-Unis, des expériences ont été effectuées avec des peptides homocystéines. 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 des conditions correctes, la réaction a été jugée extrêmement sensible et la stabilité de la couleur est mise à profit pour la visualisation des thiols ou des esters thiol séparés par chromatographie et pour la détermination colorimétrique. Bien que cette réaction colorée ait été extrêmement sensible, il a été constaté l'interférence des disulfures.

Cette réaction a été ensuite modifiée à l'aide de N-éthylmaléimide dans l'alcool isopropylique suivie par l'hydroxyde de potassium dans le même solvant. Cette combinaison donne une couleur rose à rouge avec thiosulfinates, tous les disulfures restent incolores. D'autres améliorations dans la procédure d'extraction (avec le diéthyléther) et stabilité de la couleur (avec l'acide ascorbique) ont produit une méthode fiable pour la détermination colorimétrique de thiosulfinates.

I.8.TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Bien que les techniques de chromatographie sur couche mince aient été développées, la résolution, la sensibilité et la quantification est possible par l'utilisation des techniques modernes telles que la chromatographie en phase gazeuse CPG) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

I.8.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La première référence à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) utilisée dans le domaine de la recherche de l'ail date de 1961, lorsque **Carson., 1961, Lawson., 1996, Hunter et al., 2005** ont utilisé cette technique pour séparer l'alkyle di-et trisulfures pour de nouvelles identification . La CPG semble avoir été utilisée avec modération dans les années 1960, sans doute parce qu'elle était une nouvelle technique et la disponibilité des équipements fut limitée.

Saghir et al., 1964 avait averti que la plupart des composés appartenant à l'espèce allium détecté par GPC peuvent être dû aux **artefacts** de l'analyse.

En raison de leur excellente résolution et des capacités d'identification de masse, la CG et le couplage CG-MS ont continué à figurer en bonne place dans les efforts visant à caractériser les composés volatils d'allium. Ces outils sont d'une grande valeur dans l'étude des composés de stabilité thermique modérée tels que ceux trouvés dans des huiles distillées, thiosulfinates des espèces Allium connues pour se décomposer en chauffage.

L'allicine est très réactive et instable. L'hydrolyse par chauffage dans l'eau donne le diallyle disulfure, diallyle trisulfure et les polysulfures. **Brodnitz et al., 1971, Hunter et al., 2005, Baghalian et al., 2005** ont déterminé l'allicine par GC-MS permettant de mettre en évidence un mode inhabituel de décomposition; ils ont indiqué que la CPG cause la décomposition du thiosulphinate diallyle (allicine) déshydraté (Figure I.8), permettant de donner un mélange de deux composés 3-vinyl-4H-1 ,2-dithiin et 3-vinyl-6H-1, 2-dithiin.

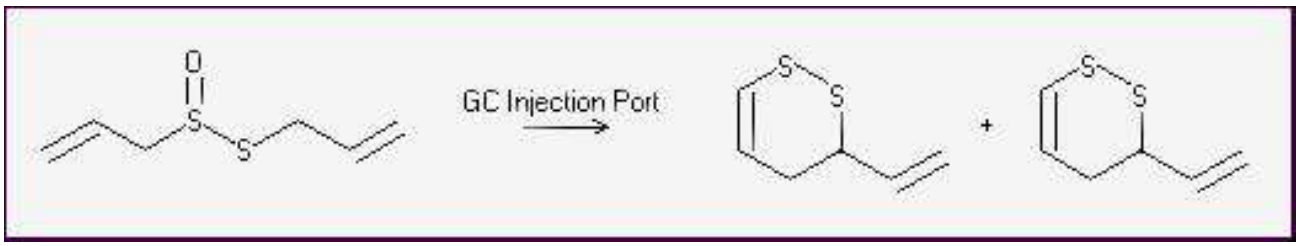


Figure I.8: The thermal decomposition of allicin (**Block et al., 1988**)

Malgré cela, plusieurs auteurs ont continué à tirer des conclusions basées sur les produits formés par l'analyse CPG des préparations d'Allium utilisant des températures de port d'injection supérieures à 280°C. Suite à des travaux sur la décomposition de l'allicine, il a été confirmé la formation de deux isomères $C_6H_8S_2$, 3-vinyl-6H-1 ,2-dithiin (Figure 1) qui plus tard ont été correctement identifié en tant que 2-vinyl-4H-1,3-dithiin (Figure I.9).

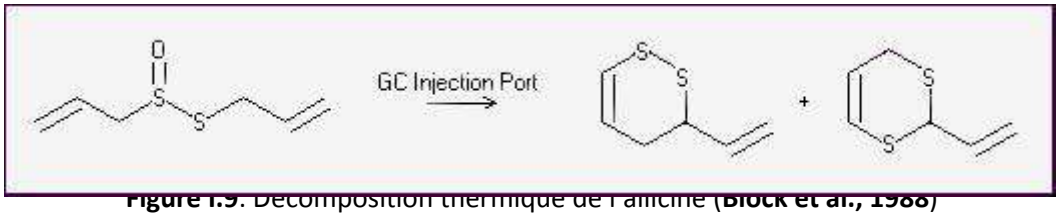


Figure I.9. Décomposition thermique de l'alliine (**Block et al., 1988**)

Lors du chauffage, le diallyle disulfure subit une séquence de réactions complexes qui conduisent à la fois au diallyle polysulfures ainsi qu'à une série de composés acycliques et hétérocycliques, produits résultant de la réaction de thioacrolein et l'espèce radical $CH_2 = CHCH_2S_n$ avec des 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 de l'analyse par HPLC et CPG a conduit cependant à une observation inhabituelle: le fait qu'un produit ait été distillée ne garantit pas qu'il survivra à l'analyse par CPG. Dans une analyse exhaustive GC-MS comparative de deux huiles essentielles de l'ail, (**Vernin et al., 1986)**. Tous les composés identifiés sont des produits de dégradation des composés thiosulfinates d'ail et sont typiques aux résultats de l'analyse par CPG à la fois de l'huile d'ail et des extraits qui subissent une décomposition thermique lors de l'analyse.

I.8.2. Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP ou HPLC)

A la fin des années 1980 et au début des années 1990, lorsque les résultats de la GC-MS ont été soumis à un examen plus minutieux, les techniques de la HPLC capable d'identifier les composés aromatiques primaires des extraits d'ail sans dégradation thermique ont été mises au point. Bien que certaines lacunes existent avec la méthode de séparation par HPLC, comme la variation du temps de rétention pouvant conduire à une mauvaise interprétation possible des pics et des composés, les techniques sont aujourd'hui très développées et capables de présenter une image fidèle des composés aromatiques primaires des espèces du genre *Allium.* L'analyse par HPLC des extraits d'ail en allicine a d'abord été signalée par **Miething., 1985, Afzal et al., 2000** lesquels ont analysé les extraits éthérés de l'ail et les produits de l'ail en phase

normale (Si) HPLC. Cette méthode souffre du fait que l'allicine est très instable dans l'éther et dans d'autres solvants organiques qui sont nécessaires pour la Si-HPLC. **Jansen et al., 1987** ont été les premiers à effectuer l'analyse de l'allicine dans l'extrait de l'ail aqueux par HPLC sur une colonne C_{18} en phase inverse.

I.8.3. HPLC en phase inverse

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 utilisant un standard externe. Dans ce rapport, toutes les combinaisons possibles thiosulphinate ont été synthétisées. La séparation des paires de l'allyle méthyl / allyle méthyl et de méthyl 1-propenyl/1-propenyl a été si pauvre, mais cela a ensuite été améliorée par HPLC en phase normale.

Avec cette méthode, la préparation de l'échantillon était relativement simple. Filtré, l'homogénat aqueux a été injecté directement. La phase mobile pour la C_{18}-HPLC se composait d'un mélange 50/50 de méthanol et d'eau. L'injection directe de méthanol a été fréquemment utilisée pour prolonger la longévité de la colonne.

Un rapport en hexane / isopropanol de 95/5 a été utilisé pour la HPLC en phase normale. Bien que la présence du groupe propyle ait été suggérée, cette étude a été l'une des premières 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 élué conjointement avec le thiosulphinate allylique 1-propényle, son existence a été écartée parce que son isomère, propyle thiosulphinate allyle, n'a pas pu être détecté et aucun signal RMN-H caractéristique des groupes propyle n'a pu être trouvé. Le seul thiosulphinate prévu, mais pas trouvé, a été le di-1-propenyl thiosulphinate. Ce composé est très instable et il a été montré qu'il se forme rapidement et spontanément deux dithiabicyclohexane diméthyl oxydes appelé zwiebelanes. Cette méthode a été complétée par **Lawson et al., 1990** pour identifier et quantifier un certain

nombre de produits de dégradation thiosulphinate y compris les sulfures, dithiins vinyle et l'ajoène.

I.8.4. HPLC en phase normale

À la suite des études comparatives, **Block et al., 1986, Amagase et al., 1996, Sarker et al., 2007** ont conclu que les meilleures résolutions maximales ont été obtenues par HPLC en phase normale avec des gradients de 2-propanol/hexane.

Conscient de l'instabilité de thiosulfinates dans des solvants organiques, le travail de **Block et al., 1992** a été concentré sur les procédures d'extraction, de distillation et les évaluations comparatives, 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 C_{18} 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 les condensats aqueux ont été recueillies à -196 ° C. Il a été constaté que l'analyse par HPLC et spectroscopie RMN du CH_2C_{l2} condensât, extrait du sel saturé a donné de bons profils de composition qualitative du thiosulphinate. On croit que cette méthode de «distillation à température ambiante» a connu un succès à cause de l'effet stabilisateur de l'eau, par liaison hydrogène, de thiosulfinates. Toutes les analyses ont été effectuées dans les 30 minutes de l'extraction et la reproductibilité était excellente.

Les deux méthodes Si-HPLC et C18-HPLC peuvent être utilisées pour une identification précise et une quantification de composés individuels. Les Thiosulfinates symétriques peuvent être synthétisés à partir des disulfures par oxydation avec de l'acide 3-chloroperbenzoïque. Les thiosulfinates asymétriques sont préparés d'une manière similaire à partir de leurs précurseurs

disulfure asymétrique pour donner des isomères thiosulphinate: allyl-méthyl allyl méthyl /, 1-propényle allyl / l allyl-propényl, et le méthyl 1-propenyl/1-propenyl de méthyle.

La préparation des disulfures dissymétriques est élaborée à partir du chlorure de chlorocarbonylsulphinyl et du méthanol. On fait réagir avec un thiol pour donner un intermédiaire disulphane méthoxycarbonyle alkyle. Ce produit intermédiaire est à son tour mis à réagir avec un thiol en présence de triéthylamine pour donner le sulfure. La distillation suivie par CCM donne des produits purs. Dans les applications commerciales, la quantification du 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., 1988, Han et al., 1995, Pablo et al., 2004** décrivent une méthode simple permettant la synthèse de l'allicine par oxydation de disulfure du diallyle avec du peroxyde d'hydrogène acide et purifié en utilisant une plaque de Si-TLC développée dans l'hexane / acétate d'éthyle immergé dans l'eau glacée.

Par ailleurs l'allicine pur peut être isolée par Si-CCM de l'extrait 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 les thiosulphinate allylique 1-propényle qui sont co-élués 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 inversée LC. La préparation implique le séchage des tranches d'ail frais 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 de diéthyle est éliminée et la couche aqueuse chargée sur une résine pré-équilibrée échangeuses d'ions et on le laisse égoutter.

La résine est lavée avec de l'eau jusqu'à ce que les lavages soient neutres au papier de tournesol, puis l'alliine retenue sur la résine est éluée avec de l'hydroxyde d'ammonium. Après lyophilisation, l'alliine est cristallisée dans l'éthanol à 70%. La recristallisation répétée donne des aiguilles blanches d'alliine pure. Les deux produits «alliine et l'allicine» préparés de cette

façon sont utilisés comme normes externes pour la quantification simultanée des composés dans les échantillons de l'ail.

Des extraits aqueux des échantillons soumis à l'enquête 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 température (40°C) ont été utilisés avec cette méthode, qui prévoit un examen simple et rapide quantitatif des échantillons d'ail (Figure I.9).

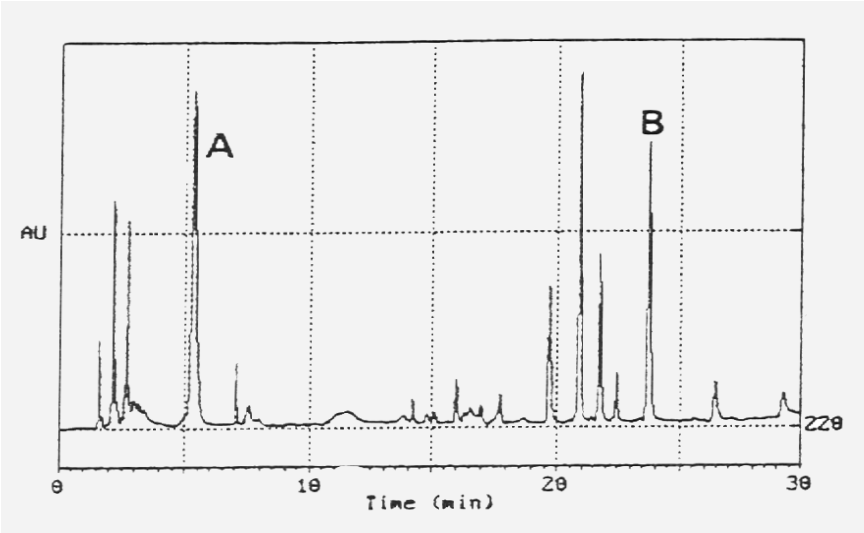


Figure I.9 : Chromatogramme d'un extrait d'ail frais avec utilisation du methanol comme solvent d'extarction: (A, alliin; B, allicin)

I.8.5. HPLC couplée à la spectrométrie de masses (CL-MS)

Au cours des huit dernières années de grands efforts ont été déployés pour coupler 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., 1996 , Ross et al., 2001, Kyung et al., 2009** ont utilisé la LC-MS pour examiner les odeurs d'allium et déterminer si oui ou non ils contenaient des composés de dégradation thiosulfinates. En utilisant une technique cryopiégeage, ils ont fait des injections directes de solutions aqueuses par utilisation d'un appareillage de HPLC 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., 1994, Han et al., 1995, Shafiur et al., 2010 ont récemment fait état d'une amélioration de la méthode ci-dessus en utilisant une phase inverse LC-MS et LC MS tandem (LC-MS-MS) avec couplage APCI. Tous les grands thiosulfinates étaient facilement caractérisés par cette technique et pour la première fois des traces de composés propylés ont été trouvés dans l'ail. (Faible absorbance UV, faible concentration) (figure).

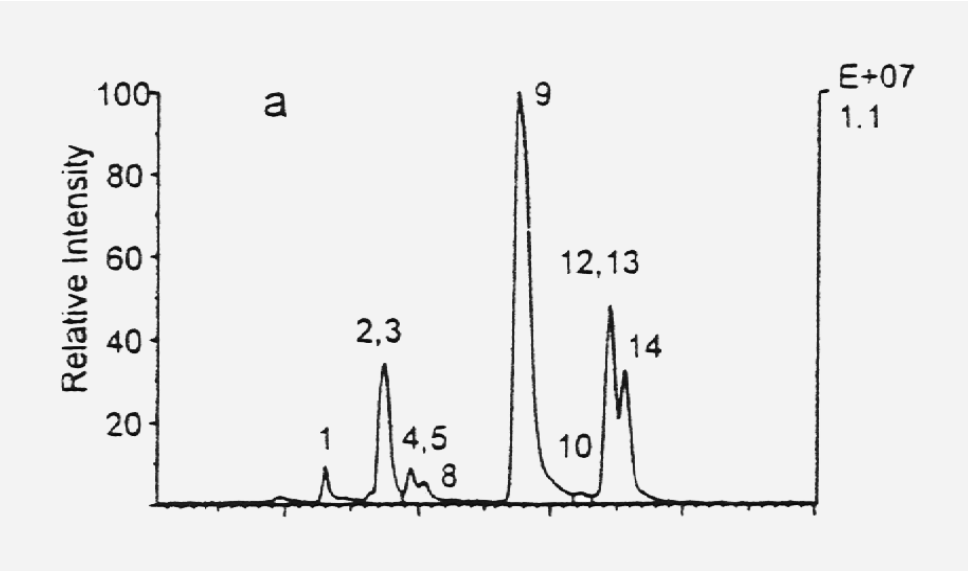


Figure I.10 : chromatographie à échange d'ion d'un extrait d'ail frais**(Shafiur et al., 2010)**

CHAPITRE II : LES EXTRAITS A BASE DE PLANTES

1ére PARTIE : PRESENTATION

II.1. INTRODUCTION

"Certains composés contenus dans les plantes (responsables du goût brûlant ou piquant, de la couleur ou de la protection vis-à-vis de l'oxydation) sont des substances non entraînables par la vapeur d'eau et donc absents de l'huile essentielle. Par contre, ils sont extractibles par certains solvants organiques… En utilisant ces solvants, on obtiendra des extraits beaucoup plus complets renfermant les substances volatiles mais aussi les triglycérides, les cires, les colorants de nature lipidique et les substances sapides (qui ont du goût). -La plupart des solvants utilisés sont l'objet d'une réglementation stricte dictée par des considérations de santé, seuls les solvants sans risque de toxicité sont autorisés **(Thomas et al., 2001).**

II.2. TYPES D'EXTRAITS

II.2.1. Extraits titrés

Ces extraits anciennement dénommés extraits normalisés sont des extraits de drogues dont les constituants sont définis comme déterminants pour une activité thérapeutique connue (seuls ou groupés). Par exemple : extraits de séné ou de nombreux extraits alcaloïdiques. Les constituants déterminants pour une activité thérapeutique connue sont clairement définis, ils se caractérisent par une activité thérapeutique scientifiquement démontrée et sont responsables de l'efficacité clinique de l'extrait.

II.2.2. Extraits quantifiés

Ce sont des extraits de drogues dont les constituants participent partiellement à l'activité, (seuls ou groupés), par exemple : millepertuis, ginkgo, aubépine, sauge. Dans les

extraits quantifiés, les constituants sont connus pour pouvoir contribuer partiellement, mais non entièrement à l'efficacité de l'extrait.

II.3. EXTRAITS NATURELS

II.3.1. Eau aromatique (hydrolat)

Pour la majorité des auteurs (bosson et al., 2005), (bruneton, 1999), l'eau aromatique d'une plante contient une certaine quantité d'essence. Celle-ci peut être plus ou moins saturée en constituants polaires ayant plusieurs origines combinées :

-une partie de l'Huile Essentielle est dissoute dans l'eau;

-une autre fraction est émulsionnée le plus souvent dans l'eau ;

-une quantité est fortement mélangée avec de l'eau et les molécules organiques tierces. (**Boukhatem et al., 2010).**

II.3.2. Intrait

C'est une variété d'extrait physiologique végétal. Pour ce faire, on doit utiliser des plantes fraîches qu'on stabilise à la vapeur d'eau ou d'alcool et qu'on fait ensuite sécher sous vide. Ces plantes stabilisées conservent ainsi toutes leurs qualités. On leur fait ensuite subir le même traitement qu'aux drogues ordinaires : on les lave à l'eau ou à l'alcool et on soumet à évaporation la solution obtenue. L'extrait qui en résulte est appelé intrait ; il possède les qualités de la plante fraîche.

II.3.3. Alcoolat

Il s'agit également de solutions extractives alcooliques, obtenues par une opération de macération réalisée sur des drogues fraîches, ou sèches. Généralement cette forme est utilisée pour des plantes aromatiques, **(Anton, 1987).**

II.3.4. Extrait

C'est une solution qui recueille une partie des principes actifs de la plante soumise à traitement. D'abord la plante est séchée ou réduite en poudre. On lave la drogue, ou sa poudre,

avec un solvant (eau, alcool ou éther) qui en retire les principes solubles, ce procédé s'appelle la lixiviation.

II.3.5. Extrait fluide

Cette forme galénique résulte d'une double lixiviation avec concentration par la chaleur de la seconde solution obtenue. Le mélange donne une solution assez concentrée dont le poids doit correspondre au poids de la drogue sèche .De ce faits, la concentration en constituants actifs d'un extrait fluide est égale à celle de la drogue **(Anton, 1987).**

II.3.6. Extrait mou

L'évaporation de la solution, laisse comme résidu une sorte de pâte molle. [xxx avoir]

II.3.7. Absolue

Il s'agit d'un produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un résinoïde) par extraction à l'éthanol à température ambiante. Notons que la solution éthanolique est généralement refroidie et filtrée dans le but d'éliminer les cires. L'éthanol est ensuite éliminé par distillation.

II.3.8. Concrète

Extrait à odeur caractéristique obtenu à partir d'une matière première fraîche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux.

II.3.9. Résinoïde

Extrait à odeur caractéristique obtenu à partir d'une matière sèche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux.

II.3.10. Pommade florale

Corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs, soit par "enfleurage à froid" (diffusion des composés odorants des fleurs dans le corps gras), soit par "enfleurage à chaud" (digestion ou immersion des fleurs dans le corps gras fondu).**, (Thomas et al., 2001)**

II.3.11. Teinture

Ce sont des préparations alcooliques liquides issues de l'extraction par l'alcool éthylique à titres variables (60°à90°) de drogues sèches animales et surtout végétales. Lorsqu'on utilise des drogues fraîches, la pharmacopée la dénomme: alcoolature. **(Anton, 1987).**

II.3.12. Les huiles médicinales

L'infusion d'une plante dans l'huile permet d'extraire les principes actifs solubles dans l'huile.

II.3.12.1. Les huiles médicinales élaborées à chaud

Bien qu'elles se conservent pendant un an, les huiles médicinales sont plus efficaces lorsqu'elles sont fraîches. Quand l'huile est tiède, la filtrer à travers une étamine. Beaucoup de plantes se prêtent à la préparation d'huile médicinale élaborée à chaud, surtout les épices comme le gingembre, le piment de Cayenne. On les applique par friction sur la peau, pour soulager les douleurs rhumatismales et améliorer la circulation sanguine et détendre les muscles. D'autres huiles accélèrent la cicatrisation des plaies.

II.3.12.2. Les huiles médicinales élaborées à froid

La préparation à froid d'une huile médicinale consiste à faire macérer des plantes dans de l'huile pendant plusieurs semaines. L'huile d'olive convient parfaitement à la préparation, car elle ne rancit presque jamais. Sous l'action de la lumière la plante libère ses principes actifs dans l'huile. C'est la meilleure façon de réaliser des infusions d'huile médicinales à partir de plantes fraîches et notamment de fleurs, parties les plus fragiles. Le millepertuis, le souci et le mélilot sont les plantes le plus couramment employées. **(Larousse, encyclopédie des plantes médicinales., 1996).**

II.3.13 Les huiles essentielles

Ce sont des extraits volatils et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Les végétaux sont le plus riches en essences par temps stable, chaud et ensoleillé : ce sera donc

le meilleur moment pour les cueillir. Ces huiles s'accumulent d'autre part dans certains tissus au sein de cellules ou de réservoirs à essence, sous l'épiderme des poils, des glandules ou dans les espaces intercellulaires**.**

Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie.

Du point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Les huiles essentielles sont constituées de différents composants terpènes, esters, cétones, phénols et d'autres éléments qui ne sont pas tous encore analysés. Parmi ces constituants, certains comme les terpènes ou résines peuvent être irritants pour la peau ou les muqueuses, c'est pourquoi on utilise dans certains cas des essences diterpénées**, (Driss., 2009).** De plus, l'intoxication humaine et animale aux huiles essentielles ont été rapportées.

2éme PARTIE : PROCEDES D'OBTENTION DES EXTRAITS

II.4. INTRODUCTION

Les méthodes par extraction sont parmi les plus utilisées en analyse immédiate (ensemble des procédés mécaniques et physiques permettant de séparer les divers corps purs formant un mélange). Elles permettent de réaliser le transfert d'un soluté initialement contenu dans une phase liquide (ou solide), vers une phase non miscible au premier milieu. Le principe est fondé sur la distribution du soluté entre les deux phases, en fonction de son affinité pour chacune d'elles. Souvent, la technique d'extraction permet d'effectuer aussi une préconcentration (ou enrichissement), étape indispensable lorsque la méthode de détection du ou des composés séparés n'est pas suffisamment sensible.

Les techniques d'extraction ou d'enrichissement peuvent être classées en deux catégories :

- réduction du volume du solvant après extraction liquide d'un échantillon solide ou liquide (Extraction liquide-liquide)

- extraction, sur support solide, des composés dissous dans un échantillon liquide suivie d'une élution dans un faible volume d'un solvant approprié (Extraction liquide-solide).

II.5. INTERET DE L'EXTRACTION

Le but est d'isoler une ou plusieurs molécules à partir d'un organisme. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments peut passer par l'étude de ces substances naturelles et si une molécule se trouve être performante dans un domaine précis, elle pourra faire l'objet d'une commercialisation sous forme de médicament.

Il existe ainsi des compagnes de recherches de plantes dont, par extraction, nous pourrons éventuellement tirer les médicaments de demain **(Rezzoug et al., 2005)**

II.6. LES METHODES D'EXTRACTION

Il existe plusieurs méthodes d'extraction dont certaines ont été développées par les artisans parfumeurs bien avant l'essor de la chimie moderne.

II.6.1. Extraction a la vapeur d'eau

L'extraction à la vapeur d'eau est une méthode ancienne et très répandue, pour l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques. Elle est simple, dans son principe, et utilise un équipement peu coûteux. Elle se présente sous trois variantes: l'entraînement à la vapeur, l'hydrodistillation et l'hydrodiffusion, **(Lee et al., 2005)**

II.6.1.1 Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau (figure II.1) est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, 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. **(Meyer., 1984).**

II.6.1.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est sans aucun doute le procédé chimique le plus ancien. En effet, il fut importé en Europe par les Arabes entre le VIII^{ème} et le X^{ème} siècle mais le principe était déjà connu et utilisé par les Égyptiens dès le IV^{ème} siècle après J.C . Il est aussi le plus utilisé, le plus rentable et celui convenant le mieux à l'extraction des molécules en vue d'une utilisation thérapeutique.

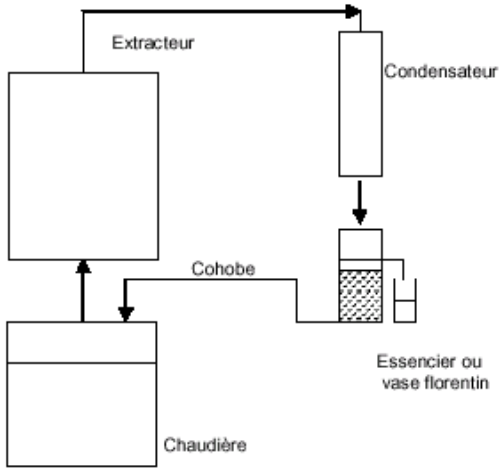


Figure II.1 : Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Cette méthode peut facilement être reproduite en laboratoire et ne nécessite pas beaucoup de matériel (figure II.2). Elle est réalisée en 2 étapes. La partie de la plante contenant la molécule à extraire est placée dans un ballon avec de l'eau et quelques morceaux de pierre

ponce pour assurer le brassage de la solution. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense. Elle est ensuite récupérée dans un erlenmeyer ou une éprouvette où il est possible de distinguer 2 phases bien distinctes : l'huile essentielle et en dessous l'eau aromatique (ou hydrolat) chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et ayant une densité plus élevée **(ANDRO et al., 2010)**.

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 4 (figure II.3)

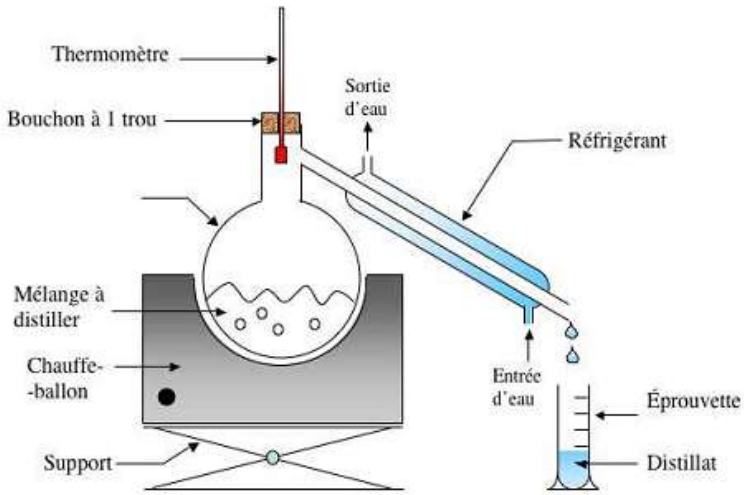


Figure II.2 : Montage de l'hydrodistillation simple

Les 2 phases contenues dans l'erlenmeyer sont ensuite transférées dans une ampoule à décanter. Après avoir laisser reposer le contenu quelques secondes, il est possible d'éliminer totalement l'eau aromatique [**WILLEM 2002].** Il ne reste alors plus que l'huile essentielle dans l'ampoule à décanter. Cette opération est appelée relargage.



Figure II.3 : appareil de type « Clevenger » pour l'hydrodistillation

II.6.1.3. Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure II.4). 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. 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 **[Meyer., 1984 ; Bruneton., 1993].**

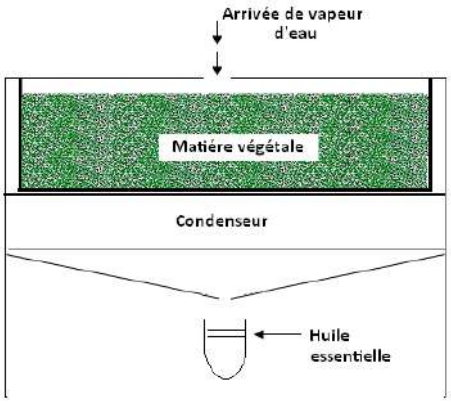


Figure II.4 : Principe schématisé de l'extraction par hydrodiffusion

II.6.1.4. Distillation à la vapeur saturée

Ce procédé consiste à tremper la matière végétale dans l'eau, et de faire passer ensuite dessus un courant de vapeur saturée. De même que pour l'entraînement à la vapeur, les constituants volatils par la suite sont entraînés, condensés puis recueillis sous forme de distillats. L'huile essentielle est séparée par décantation. **(Guenther, 1972 ; Pyron., 1992).**

II.6.1.5. Hydrodistillation par micro-ondes

Il existe divers exemples d'applications de cette technique à l'extraction de certains organes végétaux : épices de Cuminum cyminum L. et Zanthoxylum bungeanum L. par **(Wang et al., 2006**], fruits de Xilopia par **(Stashenko et al.,1996)**, hysope, sariette, marjolaine, sauge (Salvia officinalis) et thym par feuilles de Lippia sidoïdes par **(Craveiro., 1989)**, menthe poivrée et persil commun .

L'avantage essentiel de ce procédé (figure II.5) est de réduire considérablement la durée de distillation (ramenée à quelques minutes) et incrémente le rendement d'extrait.

Toutefois, aucun développement industriel n'a été réalisé à ce jour. Il semble que les problèmes technologiques concernent la mise en œuvre d'un générateur de rayonnement haute fréquence susceptible d'irradier un volume important. Nombre d'expérimentations stipulent l'intervention conjointe d'un solvant organique (tétrachlorure de carbone dichlorométhane, hexane, éthanol) sans en préciser la mise en œuvre.

D'autres recherches sont menées sur l'extraction des métabolites secondaires dans l'optique de développement de technologies innovantes : étude de l'extraction par micro ondes sans solvant de (Cuminum cyminum L.) et (Zanthoxylum bungeanum) [**Wang et al., 2006**].

II.6.1.6. Extraction au moyen de solvants

L'extraction par solvant consiste à faire passer, par solubilisation, la substance à extraire dans un solvant. Celui-ci peut être de l'eau, ou bien un solvant organique, issu de la chimie du pétrole : cyclohexane, éther … etc.

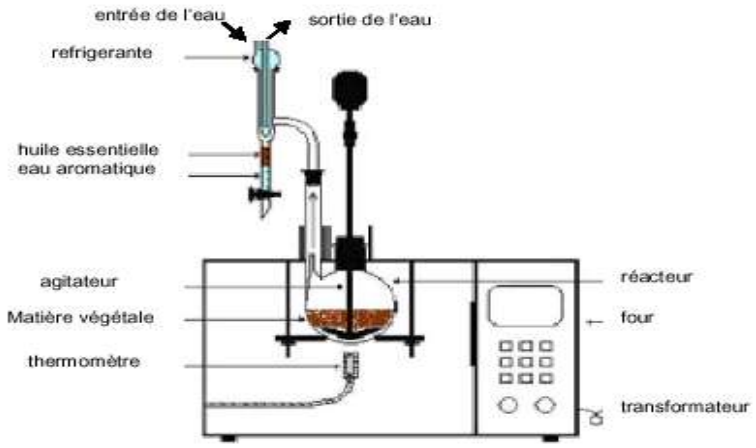


Figure II.5: Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro ondes

Traditionnellement, les solvants d'extraction les plus utilisés sont surtout l'eau et l'alcool éthylique à des titres variés permettant la réalisation de produits phytothérapiques à usage interne. De nos jours, les solvants utilisés sont les mêmes auxquels il faut ajouter la glycérine ou divers glycols.

En règle générale, les solvants utilisés sont des solvants polaires qui par définition pourront dissoudre ou extraire préférentiellement des molécules hydrophiles. Sans pouvoir être exhaustif sur le sujet, certaines constatations sont à faire, permettant de définir le comportement d'une drogue végétale en fonction du solvant utilisé. **(Mortier F., 1990)**

Le solvant doit être choisi suivant plusieurs critères :

- Le soluté doit être le plus soluble possible dans le solvant.
- Le solvant doit être à l'état liquide à la température et à la pression où l'extraction est réalisée.
- Il faut tenir compte de la toxicité de certains solvants (comme le benzène).
- Le solvant doit être volatil c'est-à-dire avoir une température d'ébullition faible.

Si la substance à extraire est diluée dans de l'eau, il faut que :

- le solvant soit non miscible dans l'eau pour pouvoir les séparer lors de la décantation.
- le composé à extraire soit plus soluble dans le solvant que dans l'eau pour que la matière à extraire se retrouve dans le solvant et qu'on ait une phase organique et une aqueuse.

La solubilisation peut être effectuée par différentes méthodes :

a/ Infusion

L'infusion est le mode de préparation le plus simple. Cependant bien que fort répandue, l'infusion obéit à des règles strictes. Les plantes sèches doivent être arrosées par de l'eau bouillante. La quantité et la durée de l'infusion sont variables selon la plante. Certaines demandent d'être infusées 2 minutes, d'autres 5 ou 10 minutes. On suivra ces prescriptions de manière précise afin de retirer un maximum d'efficacité de la plante considérée. Notons que l'infusion peut être quelquefois associée à la décoction.

b/ Décoction

Pour extraire les principes actifs des racines, de l'écorce, des tiges et des baies, il faut généralement leur faire subir un traitement plus énergique qu'aux feuilles ou aux fleurs. Une décoction consiste à faire bouillir dans de l'eau les plantes séchées ou fraîches, préalablement coupées en petits morceaux. On peut la consommer chaude ou froide .

c/ macération

Avec la macération débute le mode de préparation de base de la médecine galénique. Très ancienne, la macération fut utilisée dans la médecine traditionnelle de l'antiquité. Le principe est simple, un solvant qui peut être de l'eau, de l'alcool, du vin ou une huile, est mis en présence d'une quantité suffisante de feuilles ou de fleurs d'une espèce déterminée. Cette opération se fait à froid. Généralement, on place une quantité de plantes dans un flacon de

verre et on utilise comme solvant un alcool issu de la vigne ou à la rigueur un alcool de fruit. Les macérations dans de l'eau sont très délicates, car il se produit très rapidement une détérioration (pourrissement ou fermentation). Le flacon est ensuite hermétiquement bouché et conservé à l'abri de la lumière pendant plusieurs jours, soit de 4 à 15 jours

Selon les prescriptions. Le solvant va peu à peu se charger du principe actif de la plante, surtout si celle-ci est finement pulvérisée lors de la préparation. A la fin du temps prescrit, on filtrera dans un filtre de papier ou au travers de coton hydrophile chirurgical (non traité). La solution retirée est une macération de la plante, contenant le principe actif de cette dernière.

Les macérations alcooliques peuvent être à base d'alcool, de vin blanc, de vin rouge et dans certains cas, d'un mélange d'alcool et d'éther. Il s'agit alors de spécialité d'un emploi délicat que seul un pharmacien peut effectuer étant donné les risques graves qu'il y a à ingérer des solutions contenant de l'éther. A titre indicatif, le mélange « éther – alcool » en quantité égale, porte le nom de liqueur d'Hoffmann.

Les macérations utilisant l'huile comme solvant sont généralement utilisées en usage externe pour la préparation de baumes, onguents ou pommades. Les huiles les plus usitées étant l'huile d'olive, d'œillette, de tournesol, d'amande douce, … etc. La nature même de l'huile peut modifier la spécialité de la préparation, on s'abstiendra de toute improvisation à ce niveau, la macération fait partie des extractions par solvant.

d/ La digestion

La plante sèche ou drogue est placée dans un flacon de verre (un ballon en général). On verse dessus le solvant, eau ou alcool ; après avoir bouché hermétiquement ce récipient on laisse "digérer" à une température douce, inférieure au point d'ébullition. Généralement cette température est de l'ordre de 40°, c'est ce qu'on appelle chaleur du ventre de cheval. La source de chaleur est un chauffe ballon à thermostat qui permet un maintient précis de la température de digestion. La digestion constitue une forme légèrement forcée de l'extraction par solvant,

elle ne convient pas pour certaines plantes ou pour certaines préparations. Dans l'art spagyrique c'est un procédé souvent employé.

e/ La Lixiviation

Également nommée percolation, la lixiviation n'est pas à proprement parler une technique d'amateur, encore qu'avec un peu d'entraînement et un matériel approprié, on puisse la pratiquer sans difficultés. Cette opération doit être menée dans des conditions opératoires très strictes. Elle est utilisée pour préparer les teintures des plantes officinales très actives. La plante séchée est réduite en poudre très fine sur laquelle on verse une partie du solvant. Après un temps de contact, variable selon la nature de la plante, la poudre gonfle. Le mélange est introduit dans l'appareil à lixivier lequel ressemble à une ampoule à décantation. On verse ensuite le reste du solvant. A ce stade, on laisse l'ensemble macérer plusieurs jours, puis, on recueille goutte à goutte le liquide. Le codex pharmaceutique précise la durée de chaque phase ainsi que le dosage, de manière à obtenir des produits de qualité constante.

II.6.1.7. Technique d'enfleurage

Ce procédé met à profit le caractère liposoluble des composants odorants des végétaux. Il consiste, des la récolte de fleurs fraîches, à les intercaler entre des couches de graisse animale qui retenait le parfum. La "pommade" parfumée était lavée à l'alcool qui retenait le parfum. Pour la rose, la fleur d'oranger, l'acacia, le mimosa, l'enfleurage à froid étant insuffisant, on procède ainsi à une immersion dans de la graisse chauffé à 80°C, (**Bruneton, 1993)**.

II.6.1.8. Extraction par CO_2

a/ Principe

L'extraction au CO_2 supercritique est un procédé ultramoderne, permettant d'obtenir des extraits (produits qui ne sont plus vraiment des huiles essentielles au sens ou nous

l'entendons originellement et surtout sur le plan physico-chimique) d'une grande qualité (absence de solvant), et le caractère naturel (aucune altération des principes actifs de la plante) en font une technologie d'avant garde par rapport aux procédés traditionnels d'extraction.

L'état supercritique est un état qui n'est ni liquide ni gaz. La pression est alors supérieure à 74 bars et la température supérieure à 31°C. A cet état, le CO_2 a des propriétés particulières. En effet, il possède un bon pouvoir extractant, modulable à volonté, en jouant sur la pression et la température de mise en œuvre. Il possède également une grande diffusivité, ainsi qu'une densité élevée, ce qui lui confère une capacité de transport et d'extraction importante (**Reverchon et al., 1997 ; Wang et al., 2006)** .

b/ Procédé d'extraction

Le procédé d'extraction par CO_2 supercritique fonctionne en circuit fermé. Ce circuit comporte des organes de mise en pression (pompes), et en température (échangeurs) afin d'amener le CO_2 au-dessus du point critique. Le produit à traiter en extraction est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO_2. Le fluide se charge en composé extrait, puis il est détendu, passe en phase gazeuse et se sépare du composé extrait. Ce dernier est recueilli à l'état liquide (ou pâteux) dans un séparateur.

Les extraits CO_2 sont différents de ceux obtenus par les méthodes classiques d'extraction, grâce à la sélectivité du CO_2 supérieure en général à celle des solvants organiques. Il en résulte de nouveaux extraits aux notes aromatiques spécifiques, impossibles à obtenir par des techniques traditionnelles.

Le principal intérêt des fluides supercritiques est qu'ils ont des propriétés de solvants à géométrie variable « Les changements d'état gaz/fluide supercritique et liquide/fluide supercritique se font d'une manière continue ». Ce sont de bons solvants à une densité élevée (pression et température supérieure au point critique, environ 300 bars et 40 à 60°C) et de mauvais solvants à une faible densité (séparation «solvant - extrait» aisée).

II.6.1.9 L'expression à froid

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des hespéridés. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau et reçoit tout le produit habituel de l'entraînement à la vapeur d'eau, d'où la dénomination d'huile essentielle.

II.6.1.10 Le cryobroyage

Ce procédé d'extraction consiste à pulvériser la partie active de la plante sèche en la broyant à froid sous azote liquide à –196°C. Ce gaz neutre, constituant de l'air que nous respirons, est injecté sur les plantes sèches pour les rendre plus cassantes et pour éviter toute élévation de température pendant le broyage. Il faut savoir qu'au cours d'un broyage classique, la température du broyeur peut atteindre +70°C, et ainsi détruire les principes actifs.

Le cryobroyage est donc une méthode qui évite les dégradations enzymatiques lors de l'extraction, mais pas ensuite, car la poudre donnée, «poudre totale», ou totum de plante, bien qu'elle soit parfaitement fine et homogène, reste un produit très fragile.

Pourquoi utiliser du froid ? Des études ont montré que sous l'action de la chaleur et de l'oxydation produites lors d'un broyage classique, les vitamines, les enzymes, les substances volatiles, et de nombreux principes actifs sont détériorés. Le totum de plante obtenu par cryobroyage renferme donc non seulement l'intégralité des principes actifs, mais aussi tous les constituants d'une plante qui agissent en synergie pour une meilleure efficacité. (**Gantscharova et al., 1984).**

CHAPITRE III : PROCEDURE EXPERIMENTALE

III. MATIERE VEGETALE

La Plante d'ail utilisée a été récoltée au mois de septembre dans la région de Benchikaou (Wilaya Médéa) l'extrait a été obtenu par pression a froid des clous d'ail frais. Les expériences ont été effectuées sur la matière végétale aux Laboratoires du HALL technologique de l'université Dr Yahia Fares de Médéa, au complexe antibiotique (SAIDAL) de Médéa et à l'institut pasteur d'Alger.

III.1. Produits utilisés

Les produits chimiques utilisés pour l'extraction et l'analyse de l'extrait de l'ail sont donnés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Produits utilisés lors de l'extraction de l'extrait d'ail et de son analyse par HPLC

Produits	**Marque**	**utilisation**
Diéthyl ether (D.E.E)	Riedel de Haen AG 3016	Extraction
Méthanol	Sigma Aldrich laboratoire	Chromatographie (HPLC)
Ethanol	Sigma Aldrich laboratoire	Extraction
Acétonitrile	Sigma Aldrich laboratoire	Chromatographie (HPLC)
Eau distillée	Sigma Aldrich laboratoire	Extraction Chromatographie (HPLC)
Alloxan monohydrate	Sigma Aldrich laboratoire	Induction du diabéte chez les rats.

III.2. Matériels microbiologiques

Le matériel utilisé pour les tests microbiologiques est présentés sur le tableau III.2.

Tableau III.2 : Matériels utilisés lors des analyses microbiologiques.

Milieu de culture	Soja agar (Difco^{TM})
	Gélose Sabauraud (Difco^{TM})
Solvant	Myristate (Merck)
	Milieu tampon pH 6
	Milieu tampon pH 8
Souche fongique	*Candida Albicans (*ATCC 10231)
	Saccharomyces cerevisiae (ATCC 12220)

Tableau III.2(suite) : Matériels utilisés lors des analyses microbiologiques.

Souche bactérienne	*Staphylococcus aureus* (ATCC 12228)
	Bacillis subtilis (ATCC 6633)
	Epidermis (ATCC 12228)
	Escherichia coli (ATCC 1536)

Les réactifs utilisés pour la préparation de l'extrait d'ail sont :

- l'eau distillée pour amorcer la réaction enzymatique, passage de l'alliine en allicine ;
- le diéthyléther pour fractionner l'extrait d'ail obtenu.

III.3. Matériels

Le tableau III.3 récapitule le matériel utilisé pour l'extraction.

Tableau III.3 : Appareillages utilisés (extraction et analyses)

Manipulation	Appareillage	Marque
Extraction	Homogeneiseur	IKA T18basic ULTRA-TURRAX
	Evaporateur rotatif	IK. WERKE RV05-ST
Analyses	pH – métre	Hanna pH 209
	Réfractométre	Mod RMT 8s/n270025
	Spectrophotométre UV-Visible	Shimadzu modéle 160A
	Spectrométre FTIR	JASCO FT/IR - 4100
	Chromatographe (HPLC)	Shimadzu LC-10A avec detecteur UV-VIS type SPD
	Lecteur des zones d'inhibition	Fisher L-Lilly

III.4. Outils analytiques

Trois techniques d'analyse différentes ont été appliquées pour caractériser l'extrait d'ail pour les deux procédés d'extraction.

III.4.1. Spectrophotométrie UV-Visible

Cette technique est basée sur la propriété des molécules d'absorber certaines longueurs d'onde du spectre UV-visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer-Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration.

Dans ce travail, un spectrophotomètre Shimadzu modèle (160A) a été utilisé pour l'obtention du spectre UV-visible de l'échantillon entre 200 à 400 nm. Les mesures sont faites dans des cuves en quartz avec un trajet optique de 1 cm.

III.4.2. Spectrométrie Infrarouge (IR)

La spectrométrie infrarouge est une technique d'analyse structurale fonctionnelle, basée sur l'analyse vibrationnelle des liaisons. Elle permet de caractériser les fonctions des produits organiques.

Une molécule soumise à des radiations dans l'infrarouge peut absorber certaines d'entre elles à des longueurs d'onde qui correspondent aux fréquences de vibration des groupements chimiques qui la constituent. La mesure de l'intensité de la lumière absorbée à chaque longueur d'onde (λ) conduit à un spectre caractéristique du produit étudié. Par comparaison avec les spectres d'absorption infrarouge des substances de référence, il est possible d'identifier les structures inconnues.

Afin d'avoir une idée sur les différents groupements chimiques pouvant exister dans l'extrait, l'échantillon prélevé est tout d'abord préparé par micro pastillage de 1 à 2 mm dans le bromure de potassium à une concentration d'environ 1% en masse puis soumis à une pression d'environ 80 bars/cm.

III.4.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les composés à séparer sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide. Poussée par une pompe sous haute pression, le mélange parcourt par la suite le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

A la sortie de la colonne, les différents solutés sont caractérisés, grâce à un détecteur approprié, par des pics avec des temps de rétention bien définis. La hauteur des pics ou

l'intégration de la surface de ces pics permet d'obtenir la concentration des produits **(Antonot et Marchal, 1998).**

L'analyse de l'échantillon a été effectuée par chromatographie en phase liquide (HPLC). La colonne de silice de longueur de 30 m, le diamètre interne de 0.25 mm et 0.25 µ Le m de l'épaisseur de film a été utilisée.

A/ Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques optimisées sont répertoriées sur le tableau III.4 :

Tableau III.4 : conditions d'analyses par HPLC

Colonne	C18 (phases inverses) - longueur : 12.5cm - Ø int : 4.6 mm
Phase mobile	Acétonitrile / eau 60/40 (v/v)
Débit	3 ml/min
Température de travail	25°C
Volume injecté	20 µl
Longueur d'onde	254 nm

III.5. Choix du solvant d'extraction

Le choix du solvant est basé sur l'aspect qualitatif et quantitatif de l'extrait obtenu. Des expériences ont été faites sur des solvants disponibles sur le marché, de faible toxicité et donnent de meilleurs rendements d'extraction, il s'agit du diéthyléther et le méthanol.

III.5.1. Mode opératoire

De bulbes d'ail frais ont été coupés en petites pièces et broyés dans un mortier, macéré dans un mélange solvant/eau (80:20 V/V) sous agitation douce pendant 30 minutes d'incubation à température ambiante. L'extrait obtenu est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange sur papier filtre 0.45 µm. Par utilisation d'un rotavapeur, le solvant organique est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite. L'extrait brut obtenu est caractérisé par une couleur et une odeur qui diffère d'un solvant a un autre.

III.5.2. Choix du procédé d'extraction

Comme l'extrait d'ail dont l'allicine est ses principaux composés sont très thermolabiles. Le choix du procédé d'extraction dépend essentiellement du facteur température utilisé. Deux

procédés d'extraction ont été utilisés, l'hydrodistillation traditionnelle avec une température d'environ 100°C et l'extraction par solvant à froid à une température de 4°C.

III.5.2. 1. Extraction par hydrodistillation

A. Principe de la méthode

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition, l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage communément appelée cohobage. Lors de la distillation des huiles essentielles, plusieurs phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres (coefficient de diffusion, température, etc.) sur la qualité et le rendement de la production **(Hajji *et al.*, 1985).**

B. Mode opératoire

Une masse de 180 g d'ail frais est complètement immergée dans l'eau, on ajoute quelques grains de pierre ponce, le tout est ensuite porté à ébullition. On maintient le chauffage à une température prés de 100°C pendant 4h, les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant, l'extrait et l'eau se séparent par gradient de densité.

L'huile essentielle est extraite avec le diéthyléther, séchée ensuite par le Na_2SO_4. L'évaporation du solvant se fait à l'aide d'un rotavapeur, l'huile ainsi récupérée est placée dans un tube à essai et conservée dans un réfrigérateur.

III.5.2.2. Extraction à froid

A. Principe de la méthode

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils et thermolabile. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à écraser les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau et reçoit tout le produit habituel par entraînement à la vapeur d'eau, d'où la dénomination d'huile essentielle (AFNOR).

B. Mode opératoire

Le mode opératoire consiste en :

1. peser 100 g d'ail frais à l'aide d'une balance de précision ;
2. écraser dans un mortier en porcelaine avec 20 ml d'eau distillée ;
3. homogénéiser ;
4. ajouter180 ml de diéthyléther ;
5. homogénéiser ;
6. incuber à 30°C pendant 30 minutes;
7. centrifuger le mélange à une vitesse de 4000 tr/min pendant 15 minutes.

III.5.3. Caractérisation de l'extrait

Le rendement en extrait est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait obtenue et la masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction **(Carré., 1953).** Deux formules ont été utilisées pour déterminer le rendement :

Formule 1 :

R (%) = m_1*100 / m_2, **[carré.1953]**

m_1 : la masse de l'extrait (g)

m_2 : la masse de la matière végétale (g)

Formule 2 :

R(%) = [(P_0-P_1)] / P_0] *100, **[pharmacopée européenne. 2001]**

P_0 : poid initial

P_1 : poid après extraction et séchage

III.5.3.1. Caractérisation organoleptique de l'extrait

Les caractères organoleptiques sont déterminés à l' œil nue et avec l'odorat

III.5.3.2. Caractérisation physico-chimique de l'extrait

Les caractères physico chimiques sont déterminés par :

- l'indice de réfraction est déterminé par le refractomètre AB

- le pH déterminé par un pH mètre
- une analyse par spectroscopie UV vis pour déterminer la longueur d'onde maximale
- une analyse par infra rouge pour visualiser les vibrations des différentes liaisons des fonctions organiques existant dans l'extrait

III.5.4. Caractérisation de l'allicine dans l'extrait d'ail

Le composé d'allicine a été obtenu en suivant le mode opératoire suivant :

- Prendre un volume de 10 microlitres d'extrait d'ail ;
- diluer au 1/10 avec l'eau distillée froide ;
- homogénéiser pendant 5 minutes à 4 °C ;
- incuber à 30 °C pendant 20 min ;
- filtrer avec un microfiltre de 0.45µ de diamètre.

L'organigramme suivant montre les différentes étapes de détermination de l'allicine à partir de l'ail.

III.5.5. Effet du rapport phase aqueuse/ phase organique

Plusieurs expériences ont été réalisées pour déterminer le rapport optimal d'extraction en faisant varier le rapport entre la phase aqueuse et la phase organique. Pour ce faire, le même protocol expérimental a été maintenu à l'exception des volumes d'eau et du solvant. Les valeurs des volumes ajoutés sont récapitulées dans le tableau ci dessous.

Tableau III.5 : Effet du rapport phase aqueuse (eau) / phase organique (D.E.E)

Manipulation 1 : le volume du D.E .E est fixe (200ml)										
Volume d'eau utilisée	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Manipulation 2 : le volume d'eau est fixe (20ml)										
Volume du DE utilisé	10	40	60	80	100	120	140	160	180	200

Pour chaque manipulation on détermine le rendement et la quantité d'allicine obtenue.

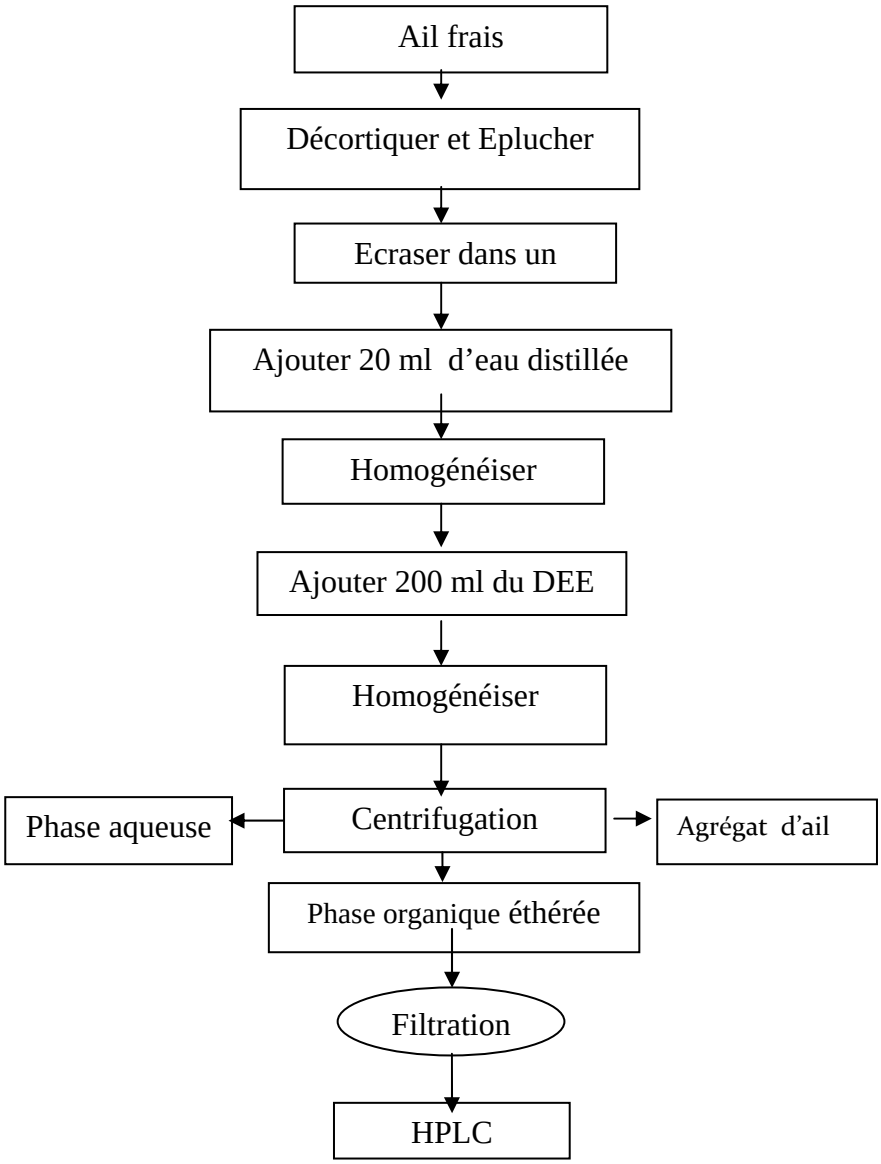


Figure (III.1) différentes étapes de détermination de l'allicine

III.5.6. Stabilité thermique de l'allicine

Le mode opératoire suivi pour la détermination de la stabilité est comme suit :

Dans six tubes à essais nous avons mis 50 µl d'extrait d'ail frais sont portés à incubation pendant 10 minutes à des différentes températures, 4°C, 25°C, 37°C, 50°C, et 75°C. Une étude cinétique a été effectuée afin de voir l'effet de la température sur la stabilité de l'allicine. Pour

ce faire, Un prélèvement d'un échantillon de 20 µl a été pris chaque 15 minutes pour analyse et ce pour un temps allant du 0h à 6h.

III.6. Etude microbiologique de l'allicine

III.6.1. Effet antibactérien

Plusieurs souches ont été utilisées afin de voir l'effet antibactérien de l'allicine. Pour cela, nous avons adopté la démarche suivante.

III.6.1.1. Milieu de culture

Le choix du milieu utilisé pour les tests microbiologiques est primordial. La composition et le pH du milieu de culture influent sur l'activité antimicrobienne et la diffusion du produit à étudier. Dans notre étude, nous avons utilisé le milieu Tryptic soja agar dont la composition est la suivante : (Formule approximative par litre).

Tableau III.6 : Composition du milieu de culture

Constituant	Quantité (g)
Digestion pancréatique de caséine	15
Digestion paraphique de soja	5.0
Chlorure de sodium	5.0
gélose	15

Le pH final du milieu est ajusté à 7.3 ± 0.2.

III.6.1.2. Choix de la souche

L'objectif de cette étude est de tester l'effet antimicrobien de notre extrait sur des souches différentes afin choisir la plus adéquate à la détermination de la CMI et aux études comparatives. La méthode utilisée est la diffusion solide qui consiste à déposer sur la gélose des disques imprégnés de substances antimicrobiennes à étudier.

III.6.1.3. Critères de choix de la souche utilisée dans les tests d'inhibition

Les critères du choix de la souche indicatrice sont:

- elle est choisie parmi les souches de référence répertoriées dans les instituts spécialisés ATCC (American Type Culture Collection) ;
- une croissance rapide et correcte dans les conditions du dosage ;

- obtention des diamètres d'inhibition clairement délimités après un temps d'incubation adéquat (18 à 24 heures).

III.6.1.4. Mode opératoire

Après préparation et autoclavage du milieu de culture, ce dernier est coulé en boites pétri. Après solidification du milieu, la souche est ensemencée en nappe à la surface de chaque boite. Les souches choisis pour cette étude sont : Staphylococcus *aureus*, *Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermidi*s , *Escherichia coli.* Ces souches ont été aimablement fournies par le complexe antibiotique SAIDAL de Médéa. Des disques en papier vierge sont déposés à la surface de la gélose, puis imbibés à laide d'une micropipette par 25µl d'extrait d'ail frais pour chaque disque, soit 0.0245 g. d'allicine. Après 20 minutes de diffusion au sein de la gélose, les boites sont incubées à 37°C pendant 18h. Les diamètres des zones d'inhibition pour chaque souche sont ensuite mesurés à l'aide d'un appareil de lecture des zones dinhibition.

III.6.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

III.6.2..1. Définition de la CMI

C'est la plus petite concentration d'un produit antimicrobien qui provoque une inhibition totale d'une souche bactérienne après 18heures de culture à 37°C **(Archambaud.2001)**. Cette mesure est à la base de toutes les techniques d'études de l'activité antibactérienne.

III.6.2.2. Méthode de dilution en milieu liquide

A. Principe

L'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macro-dilution) ou de cupules (méthode de micro-dilution) contenant l'antibiotique à des concentrations décroissantes. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration d'antibiotique et où aucune croissance n'est visible (**Kamagate et al. 1994)**.

B. Mode opératoire

La technique consiste à déposer 10ml d'un bouillon soja agar dans une série d'une dizaine de tube à essais. Un volume de 0.35ml d'extrais d'ail frais (équivalent en masse 0.42g soit 0.336g d'allicine) est ajouté au premier tube. La concentration de l'extrait est réduite progressivement de 50% d'un tube à un autre jusqu'au 9^{em} tube. Le 10^{em} tube servira de témoin positif.

III.6.2.3. Méthode de diffusion en milieu solide

A. Mode opératoire :

Une quantité d'extrait d'ail de 100 µl soit une masse de 0.121g (0,098g d'allicine) est diluée dans 0,9 ml de myristate, solvant organique utilisé en microbiologie sans effet antimicrobien (pharmacopée européenne 2007).

Dans une série de tube nous avons réalisé des solutions d'extrait d'ail de concentrations décroissantes à partir de la solution mère d'extrait frais. Chaque solution fille est obtenue en mélageant 0.5ml de la solution précédente et 0.5ml de myristate jusqu'au 12^{em} tube. La concentration décroit du 1er au 12^{em} tube à l'orde de 50% d'une solution à une autre.

Deux boites de pétri sont ensuite préparée en déposant sur la surface de chacune d'elle (déjà ensemencée par la souche choisie) 6 disques vierges. Ces derniers sont imbibés de 25µl des 12 concentrations d'extrait d'ail à tester. Les deux boites sont incubées à 37°C pendant 18 heures.

III.6.3. Effet des facteurs physico-chimique sur l'activité antibactérienne

III.6.3.1. Effet de la température

A. Mode opératoire

Pour tester l'effet de la température sur l'activité antibactérienne, nous avons réalisé une série de six tubes, dans les quels en repartie notre extrait d'ail. Chaque tube est porté à une température choisie (4°C, 25°C, 37°C, 42°C, 50°C, 75°C...) pendant une durée totale de 6 heures. Des prélèvements ont été effectués à des intervalles d'une heure, sur lesquels des tests d'inhibitions ont été effectuées.

III.6.3.2. Effet du pH:

Afin d'explorer l'effet du pH sur l'activité antibactérienne, nous avons préparé 14 solutions aqueuses de notre extrait, de pH variant de 1 à 13,70 (≈14). Chaque solution a fait l'objet d'un test d'inhibition.

III.6.4. Etude comparative entre l'allicine et quelques antibiotiques

Dans une série de tube nous avons réalisé des solutions d'antibiotiques 'Gentamycine, Oxacilline et Penicilline G) de concentrations décroissantes à partir d'une solution mère de 1mg/ml. La progression des concentrations est de 50% jusqu'au $6^{ème}$ tube.

Une boite de pétri est ensuite préparée en déposant sur sa surface (ensemencée par la souche choisis) 6 disques vierges. Ces derniers sont imbibés de 25µl des six concentrations d'antibiotique. La lecture des zones d'inhibition se fait après incubation à 37°C pendant 18 heures. Les CMI obtenues pour chaque antibiotique sont comparées à celle enregistrée pour notre extrait.

III.7.Etude de l'activité antifongique

Cette étude a été réalisée sur deux souches de levure : *Candida albicans* (pathogène) et *Saccharomyces cerevisiae* (non pathogène). Le test de la CMI est réalisé uniquement en milieu solide à partir de six concentrations d'extrait d'ail (de la solution mère de 0,098g d'allicine/ml à 0,006125g d'allicine/ml). Il faut signaler que l'effet de la température sur l'activité antifongique a été aussi étudié à partir des prélèvements d'extrait exposés à différentes températures (4°C, 25°C, 37°C, 42°C, 75°C).

III.8. ETUDE IN VIVO DE L'ACTIVITE HYPOGLYCEMIANTE ET HYPOCHOLESTEROLEMIANTE DE L'ALLICINE

III.8.1. Cadre d'étude

Cette étude a été réalisée au laboratoire de la toxicologie animale du complexe antibiotique de Médéa SAIDAL.

III.8.2. Matériel animal

Des Rats femelles de même souche (wistrar) ont été ramenés du centre de recherche et développement d'El-Harrach (CRD) adoptés et nourris à l'animalerie du laboratoire de toxicologie du complexe antibiotique de Médéa SAIDAL. Ces rats ont été pesés puis repartis dans des cages.

III.8.3. Critères du choix des Rats

Les rats choisis doivent répondre aux critères suivants :

- leurs poids doivent être compris entre 200 g et 260 g,
- leurs glycémies et leurs cholestérolémies ainsi leurs taux de triglycérides doivent être dans la norme. Les rats qui ont une anomalie sont écartés.

Le tableau III.7 regroupe les normes de glycémie, cholestérolémie et des triglycérides.

Tableau III.7 : Normes en glycémie, cholestérolémie et triglycérides chez les rats

Glycémie	0.8 g/l-2.0 g/l
Cholestérolémie	0.8 g/l – 1.8 g/l
Triglycérides	0.90 g/l- 1.85 g/l

Des lots de cinq rats ont été répartis dans des cages séparés. Chaque rat sélectionné est marqué par une coupure au niveau de ces oreilles pour pouvoir le distinguer.

III.8.4. Prélèvement du sang

Le sang a été prélevé au niveau du sinus retro orbitaire du rat à l'aide d'un tube capillaire, la quantité du sang est environ 1.5 cc. Le sang est conservé dans des tubes héparinés. Des analyses de glycémie, de cholestérolémie et des triglycérides ont été réalisées au niveau du dispensaire médical deTeniet el hadjar de Médéa.

III.8.5. Préparation des extraits d'ail

500 mg d'extrait d'ail a été préparé par la méthode cité précédemment ensuite partagé dans deux tubes, en partie égale :

- Le premier tube est exposé à une température de 4°C.

- Le deuxième tube est exposé à une température de 75°C pendant 30 minutes.



Figure III.2: Technique du prélèvement sanguin réalisé sur les rats**.**

Les deux extraits préparés se différent par leur couleur et leur odeur. Le contenu de chaque tube est dilué dans 100 ml d'eau distillée afin de préparer une solution de jus d'ail pour faciliter l'opération de gavage pour les Rats, figure (III.3).

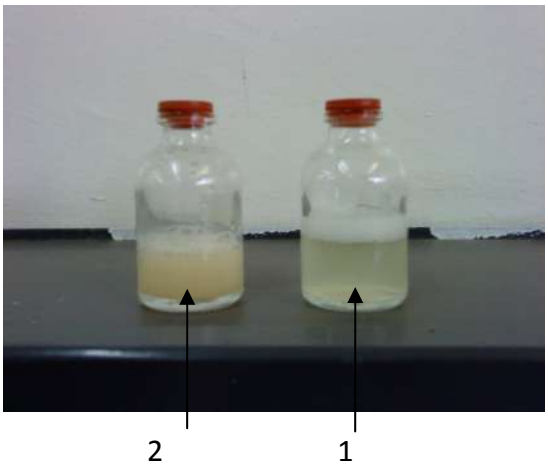


Figure III.3 : Les extraits d'ail aqueux préparés par extraction
Extrait 1: exposé à une température de 4°C,
Extrait 2 : incubé au bain marie à une température de 75°C.

III.9. Etude de l'activité antidiabétique de l'allicine

L'objectif de ce travail et de tester l'effet hypoglycémique de l'allicine. Ce test se résume à un essai de correction de la glycémie chez des rats diabétique par administration orale

(gavage) d'une solution aqueuse d'extrait d'ail. L'effet correcteur de notre extrait a été comparé avec celui d'un antidiabétique connu, la Metformine HCl 850 mg.

III.9.1. Induction du diabète

Avant la provocation du diabète, les rats sélectionnés sont pesés et repartis aléatoirement en lots dans des cages séparés. Pour chaque lot, le diabète a été provoqué par l'administration de 2 ml de monohydrate d'alloxane 98% de concentration de 40 mg/ml par voie sous cutanée (norme de la concentration inductrice pour les rats est située entre 100 et 175 mg/kg).

Après 48 heures, un prélèvement sanguin est effectué à jeun, à 10 heure du matin, chez tous les rats de chaque lot avant administration des différents produits correcteurs de la glycémie (l'extrait d'ail 4°C, 75°C ; un antidiabétique : la Metformine HCl 850 mg).

III.9.2. Essais de correction de la glycémie

Une administration orale (par gavage) de la solution aqueuse de notre extrait (4°C et 75°C) est effectuée quotidiennement et pendant 7 jours accompagnée d'une pesée quotidienne du poids des rats de chaque lot Figure (III.4).



Figure III.4 : Opération de gavage de la solution aqueuse de l'extrait d'ail.

Les lots des rats diabétiques sont présentés ainsi :

Lot 1 : Rats gavés par 1,5mL/jour de la solution aqueuse d'extrait d'ail frais (4°C).
Lot 2 : Rats gavés par 1,5mL/jour de la solution aqueuse d'extrait d'ail (75 °C).
Lot 2 : Rats gavés par 1,5mL/jour d'un antidiabétique (hypoglycémiant) (C= 40 mg/ml).
Lot 4 : Rats diabétique sans aucune administration orale (Témoin positif).
Lot 5 : Rats normoglycémiques gavés de 1,5ml/jour de la solution aqueuse d'extrait d'ail frais (4°C).
Un lot « témoin négatif » a été suivi en parallèle afin d'évaluer l'effet hypoglycemiant de l'allicine d'ail chez un sujet normal:

Un suivi quotidien de l'évolution des rats alloxaniques pendant la période du traitement a été réalisée:

- La consommation de l'eau,
- La nourriture.
- la pesée des rats.

Un dosage de la glycémie a été réalisé chaque semaine pendant la période de traitement et après arrêt du traitement.

III.9.3. Dosage du glucose

Le dosage du glucose a été réalisé par la méthode enzymatique.

III.9.3.1. Mode opératoire

Le kit est constitué d'une solution étalon de glucose (1g/l) et de réactif de composition suivate: phosphate 70 mmol/l, phenol 5mmol/l, glucose oxydase > 10UI/ml, peroxydase > 1 UI/ml, 4-aminoantipyrine 0.4 mmol/l, pH 7.5.

A. Equipement

-Bain marie réglé à 37°C,
-Spectrophotomètre (λmax=500nm).

B. Echantillon

Sérum ou plasma recueilli par procédure normale. Le sérum ou le plasma doivent être séparés rapidement des globules rouges pour éviter la glycolyse. Il est recommandé de prélever sur fluorore de sodium.

C. Procédure

- Etablir une température ambiante aux réactifs,
- Repartir les réactifs dans des tubes :

Le tableau III.8 représente la répartition des réactifs dans les tubes pour incubation

Tableau III.8 : Répartition des réactifs dans les tubes

	Blanc	Etalon	Echantillon
Etalon glucose		10 µl	
Echantillon			10 µl
Réactif (A)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

- Incuber les tubes avec agitation dans un bain marie à 37°C pendant 10 minutes.
- Mesurer l'absorbance de l'étalon est de l'échantillon contre un blanc réactif à 500nm.

D. Calcul

La concentration en glucose de l'échantillon est calculée selon la formule suivante:

$(DO_{échantillon} / DO_{étalon}). C_{étalon}$

III.9.4. Etude de l'activité hypo-lipémiante

Les rats qui ont un taux de cholestérol normal sont repartis en 4 lots de 4 rats chacun.

III.9.4.1. Induction de l'hyper-cholestérolémie chez les rats

Un programme de nourriture riche en cholestérol a été établi par administration quotidienne de jaune d'œuf pendant six semaines à des rats de cholestérolémie normale. Ceci a provoqué une élévation de cholestérol dans le sang.

III.9.4.2. Essais sur des rats hyper-cholestérolemiques

Les 4 lots subissent les essais suivants:

Lot 1 (Témoin négatif) : Rats à cholestérolémie normale et traités avec 1,5ml d'une solution aqueuse d'extrait d'ail frais (4°C),

Lot 2 (Témoin positif): Rat hyper-cholestérolémique sans administration d'extrait frais,

Lot 3 : Rats hyper-cholestérolémique traités par 1,5ml d'une solution aqueuse extrait d'ail frais (4°C)

Lot 4 : Rat hyper-cholestérolémique traité par 1,5ml d'une solution aqueuse d'extrait d'ail (75°C).

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1. QUALITE D'EXTRAIT OBTENU PAR LES DIFFERENTS PROCEDES D'EXTRACTION

Parmi les solvants disponibles et une fois les critères de sélection effectués, notre choix s'est porté sur l'éthanol et le Diéthyléther (DEE). Ce dernier possède en effet une température d'ébullition basse. L'extrait obtenu par le procède d'extraction à froid a une saveur typique de l'ail frais et de couleur jaune verdâtre. Par contre, l'extrait obtenu par hydro distillation a une saveur d'ail cuit et présente une couleur marron, (Figure IV.1).

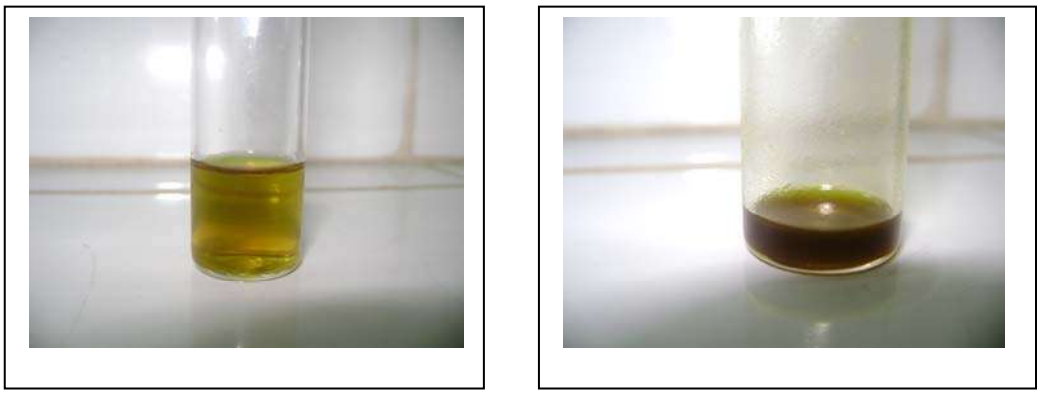


Figure IV.1 : couleur de l'extrait obtenu par extraction par solvant (à gauche) et par hydro distillation (à droite)

D'aprés **Dron et al., 1997; Simandi et al., 2000,** cette différence organoleptique à la présence des thiosulfinates et des thiosulfonates saturés et insaturés dans l'extrait obtenu par le procédé d'extraction à froid et de l'absence de certains de ces composés dans l'extrait obtenu par hydro distillation, la température de vaporisation élevée appliquée dans ce dernier processus pourrait être la cause de cette différence. Par conséquent, la méthode d'extraction à froid est le procédé utilisé dans notre étude pour l'extraction d'extrait de l'ail.

IV.2. CARACTERISATION DE L'EXTRAIT OBTENU PAR SOLVANT A FROID

IV.2.1. Rendement

Le taux d'extrait d'ail obtenu par la méthode d'extraction à froid est de 0.24% et elle est en accord avec celle citée par (**Dron et al., 1997; Simandi et al., 2000**). Par contre elle est légèrement supérieure a celle rapporté par (**Block et al.,1992; Block et al., 1993**). Cette différence peut être attribuée à la qualité de l'ail frais utilisée dans l'extraction, ou au procédé d'extraction utilisé.

IV.2.2. Densité

La masse volumique désignée souvent par l'appellation densité, dépend de la température et de la composition chimique de l'huile ou l'extrait. C'est le rapport de la masse de l'extrait obtenu sur la masse de même volume en eau (**Pharmacopée européenne 2007**). La valeur de la densité de l'extrait d'ail obtenue par la méthode d'extraction par solvant à T=4°C est de 1.08 g/cm^3, cette valeur est assez voisine à celle trouvée par (**Dron et al., 1997; Simandi et al., 2000**)

IV.2.3. Indice de réfraction

L'indice de réfraction dépend de la composition chimique de l'extrait et de la température. Il croit avec l'insaturation ou avec la présence sur la chaîne principale de fonctions secondaires. L'indice de réfraction de notre extrait obtenu par solvant à froid est 1.447, cette valeur est proche de la valeur trouvée par **Simandi et al., 2000.**

IV.2.4. Miscibilité dans l'eau à 20°C

L'eau étant un solvant non toxique et largement disponible, on a voulu le tester lors des essais préliminaires d'extraction. D'après les tests effectués nous avons constaté que l'extrait d'ail est non miscible dans ce solvant. Suite à cela, on s'est orienté vers d'autres essais moyennant l'utilisation d'autres solvants.

IV.2.5. Miscibilité dans les solvants organiques

Notre extrait d'ail présente une très grande miscibilité dans beaucoup de solvants organique. Des essais ont été effectués sur l'éthanol, le méthanol et le diéthylether. L'extrait d'ail présente une miscibilité totale.

IV.2.6. Spectrométrie Infrarouge (IR)

La figure IV.2 montre le spectre FTIR de l'extrait d'ail. On observe une bande d'absorption comprise entre 1080 et 1150 cm^{-1}, laquelle bande est caractéristique du groupe C-S-O-S-C groupement spécifique de l'allicine. Une forte absorption est signalée entre 1625 et 1680 cm^{-1}. Cette dernière est une caractéristique de la présence de la liaison C=C. Une absorption entre 700 et 800 cm^{-1} caractérisant le groupe S-C a également été remarquée sur le spectre. La présence du CH_3 est signalée à des nombre d'ondes compris entre 2900 et 3100 cm^{-1}.

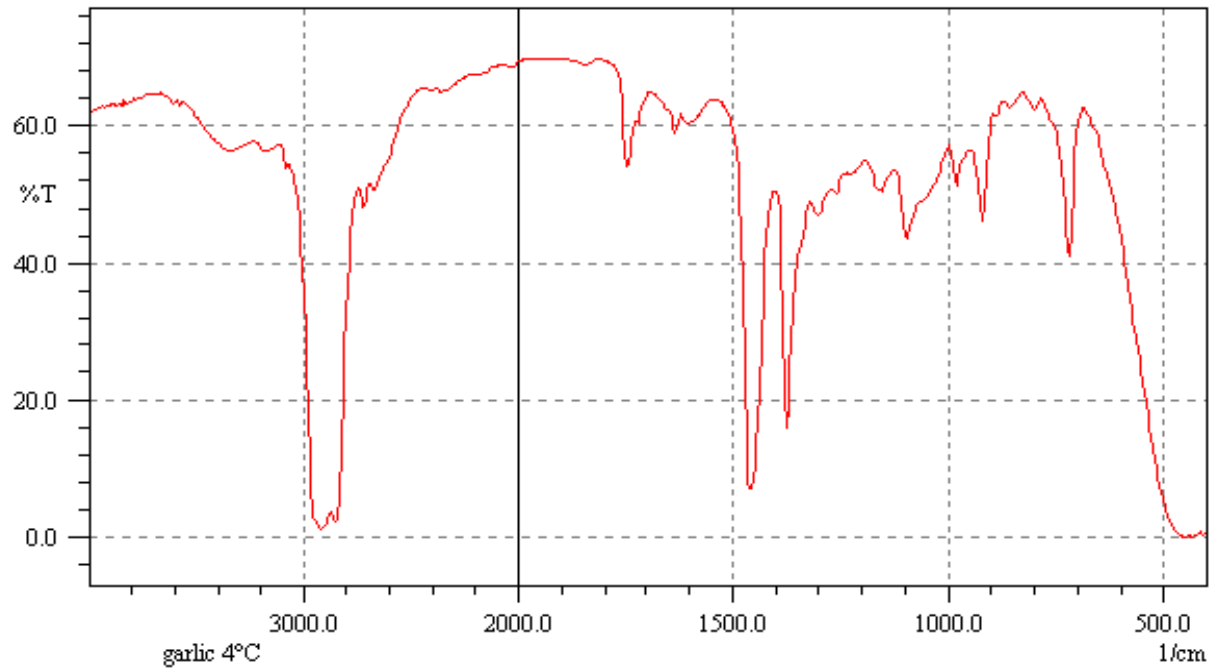


Figure IV.2: Spectre IR de l'extrait d'ail.

Ce résultat est en commun accord avec ceux trouvés par **Bloc et al, 1986.**

IV.2.7. Caractérisation par HPLC de l'allicine dans l'extrait d'ail

Des études de caractérisations préliminaires ont été réalisées sur l'extrait d'ail par utilisation de la chromatographie liquide à haute performance et ce dans le but d'optimiser les conditions opératoires chromatographiques adéquates pour une bonne caractérisation de l'allicine dans l'extrait d'ail. Les conditions chromatographiques d'analyses (solution éluante, colonne utilisée, longueur d'onde d'analyse, ...etc.) rapportées par différents auteurs comme **Iberl et al., 1990**. ont été reprises.

Lors de cette analyse, on a axé notre travail essentiellement à la caractérisation de l'allicine présente dans l'extrait d'ail. Ce faisant, sur le chromatogramme obtenu suite à plusieurs séries d'analyses (figure IV.3) et par comparaison avec les résultats obtenus par différents auteurs (**Jansen et al 1987** ; **Iberl et al., 1990**), il nous a été possible d'identifier le pic propre à l'allicine et dont le temps de rétention est de 6.5 minutes. Les différents résultats trouvés lors de ces analyses sur un extrait frais conservé à une température de 4°C montrent clairement que l'allicine est le constituant le plus prépondérant dans l'extrait. Sa composition calculée à partir de l'aire des pics est de l'ordre de 80%.

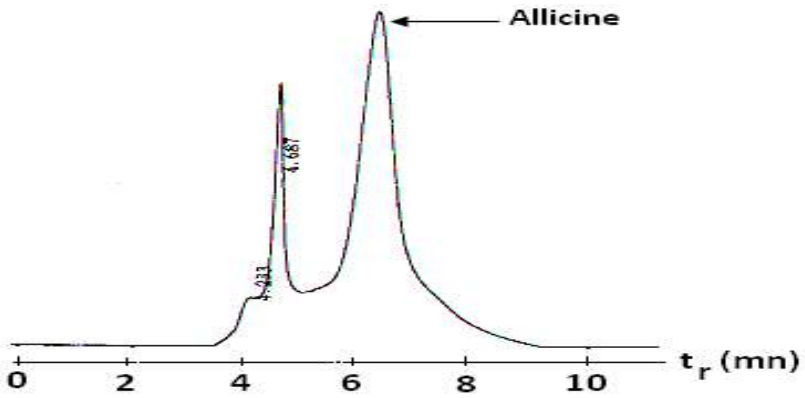


Figure IV.3 : Chromatogramme de l'extrait d'ail

IV.3. OPTIMISATION DU RAPPORT PHASE AQUEUSE / PHASE ORGANIQUE

Au cours de l'extraction par solvant à froid, la centrifugation nous a permis de visualiser trois parties bien séparées (figure (IV.4)). Une phase organique (éthérée) dans la partie

supérieure du tube, une phase aqueuse légèrement éthérée dans la partie inférieure du tube, ces deux phases sont séparées par une phase solide au milieu du tube formée d'agrégats d'ail.

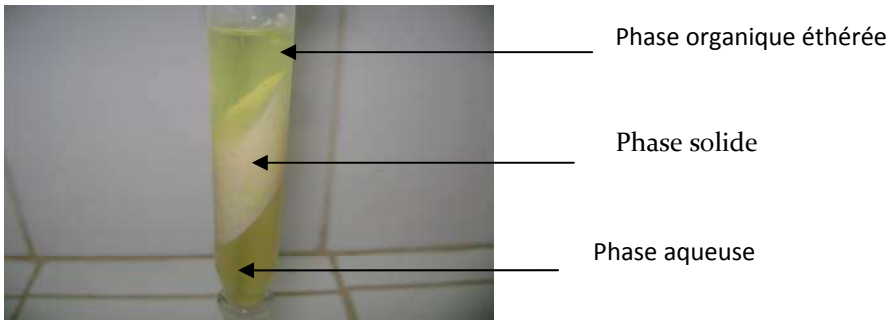


Figure IV.4 : Les trois phases obtenues après extraction et avant séparation.

Au cours de l'extraction et après centrifugation nous avons observé que la modification de la phase organique éthérée influe sur la phase aqueuse.

Plus la phase organique est importante, plus la quantité d'extrait transférée dans la phase aqueuse est faible (couleur de plus en plus claire), et plus la phase organique est faible par rapport a la phase aqueuse, plus la quantité d'extrait transférée dans cette phase est importante (couleur jaune foncé) figure (IV.5).



I **II**

Figure IV.5 : Rapport phase organique/ phase aqueuse
(I : phase aqueuse importante, **II** : phase organique importante).

Comme le diétylether est légèrement miscible dans l'eau, une quantité de l'extrait est transférée dans la phase aqueuse. Lors des expériences entamées à ce sujet, nous avons voulu voir de prés si la quantité d'extrait et d'allicine dépend des proportions en diéthyle ether et en

eau utilisées. La HPLC est utilisée comme moyen d'investigation et ce par la determination de l'aire du pic de l'allicine.

Dans une première série d'expériences, le volume de DEE est constant alors que celui de la phase aqueuse (eau) variait dans le sens croissant. A cet effet, on a constaté une diminution progressive en rendement d'extrait.

Lors de la seconde série d'expériences, le volume d'eau est constant alors que celui du DEE augmentait progressivement. Le rendement en extrait varie dans le même sens que celui du DEE.

Les figures (IV.6 et IV.7) montrent que pour une même valeur d'eau le rendement en extrait obtenu par extraction par solvant à froid croit avec l'augmentation de la quantité du DEE ajoutée de même pour la quantité en allicine.

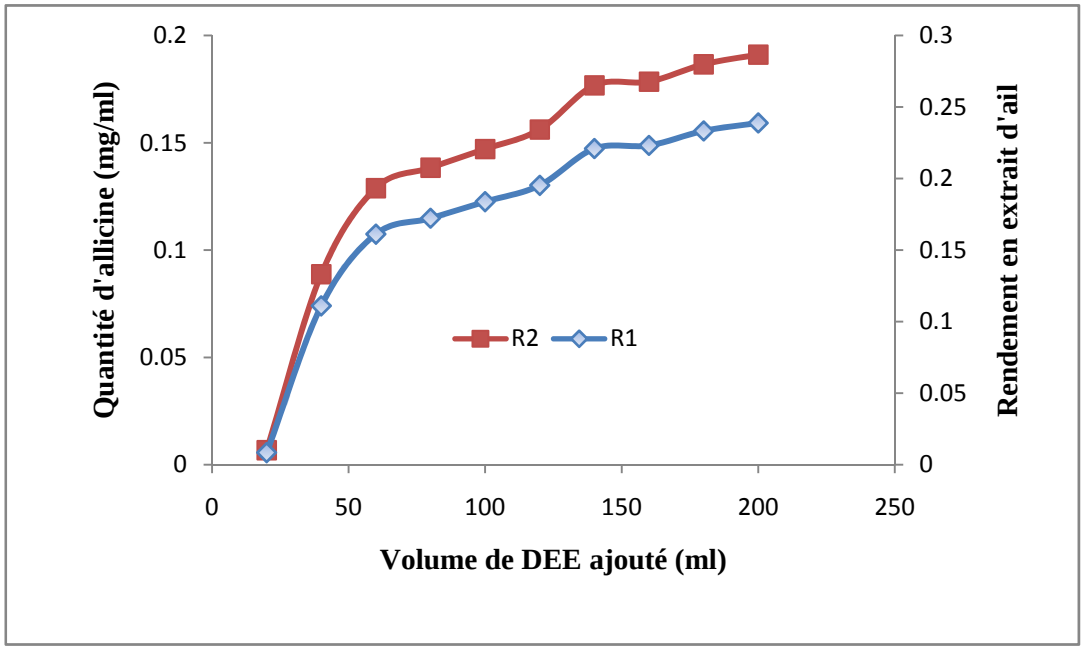


Figure IV.6 : Variation de la quantité du DEE pour une même quantité d'eau
(R_1 : rendement en extrait d'ail ; R_2 : quantité d'allicine)

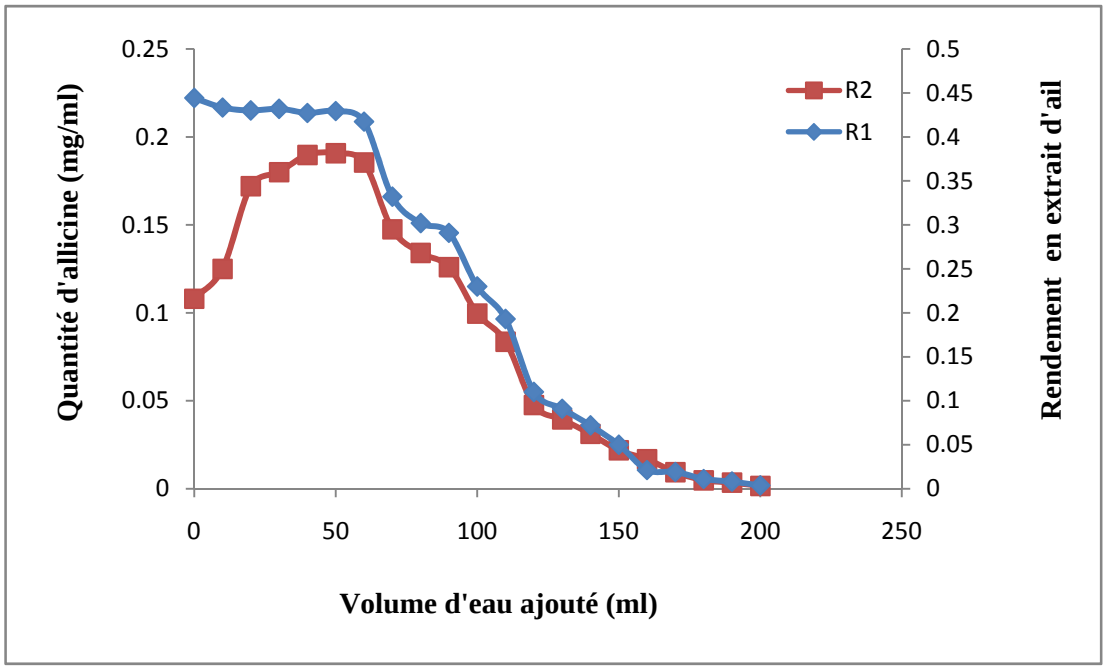


Figure IV.7 : Variation de la phase aqueuse pour une même quantité du DEE
(**R_1** : rendement en extrait d'ail ; **R_2 :** quantité d'allicine)

Pour une même quantité du DEE, plus la quantité en eau (phase organique) augmente plus le rendement en extrait diminue, par contre l'allicine au début présente une phase ascendante jusqu'à un volume en eau de 5.ml, puis elle se stabilise jusqu'à un volume de 60ml pour subir ensuite une phase descendante pour un volume de 200ml.

IV.4. STABILITE THERMIQUE DE L'ALLICINE

Une fois les conditions optimales d'extraction trouvées, nous avons entrepris une série d'expériences par lesquelles nous envisageons d'étudier la stabilité thermique de l'allicine. Les extraits d'ails sont conservés à quatre valeurs de température. Le suivi de la stabilité thermique de l'allicine est assuré par l'utilisation de la HPLC et la vérification des aires des pics de l'allicine. Les valeurs trouvées sont consignées dans le tableau IV.1 ci dessous.

Tableau IV. 1: Pourcentage d'Allicine dans l'extrait en fonction de la température et du temps de conservation (analyse HPLC)

Température de conservation	Temps de conservation (h)					
	1	2	3	4	5	6
4°C	78.707	78.707	78.707	78.707	78.707	78.707
25°C	78.625	78.623	78.620	78.620	76.10	76.04
37°C	77.82	70.906	62.98	55.690	47.95	41.022
42°C	74.12	60.205	47.255	33.174	20.451	7.561
50°C	59.26	40.123	22.891	5.251	0.125	0
75°C	6.50	0	0	0	0	0

D'après les résultats trouvés, la température de 4°C est celle qui donne une grande proportion d'allicine dans l'extrait, donc celle favorisant la stabilité de ce principe actif. Sur la figure (IV.8) sont représentés les chromatogrammes obtenus lors de cette étude.

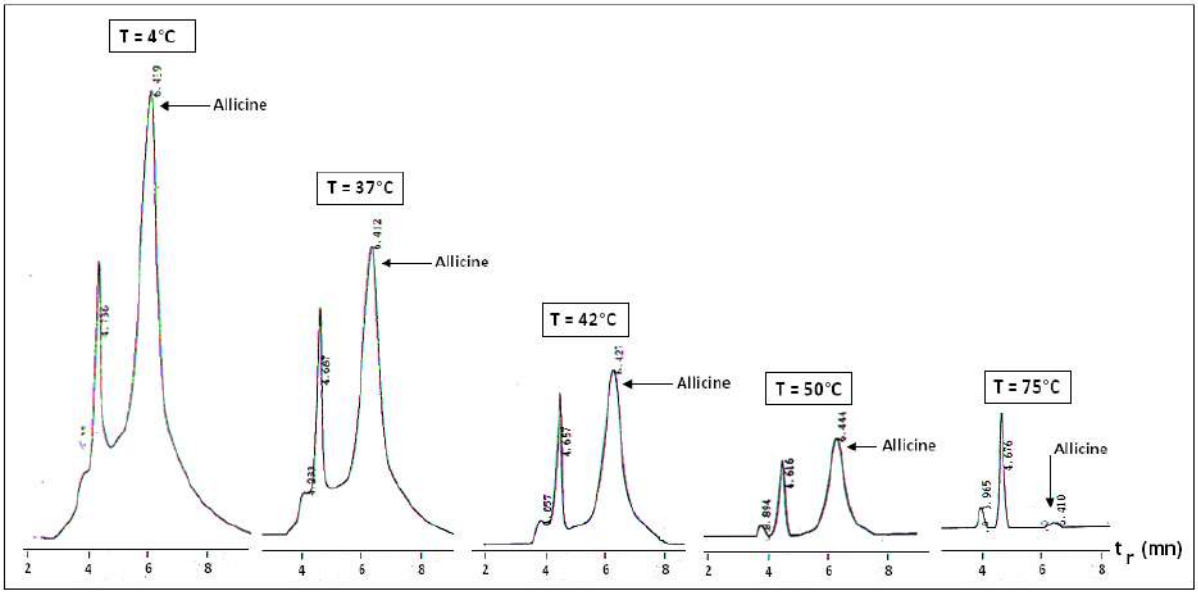


Figure IV.8 : Chromatogrammes montrant la variation de la quantité d'allicine.
en fonction de la température.

IV.5. EFFET ANTIBACTERIEN DE L'ALLICINE

IV.5.1 Choix de la souche

Il faut rappeler que nous avons réalisé des tests d'inhibition de notre extrait d'ail sur différentes souches bactérienne. Après 18h d'incubation, des zones d'inhibition sont observée (figure (IV.9) pour *E coli* et *S aureus* à titre d'exemple). Les diamètres d'inhibition obtenus sont représentés sur le tableau IV.2.

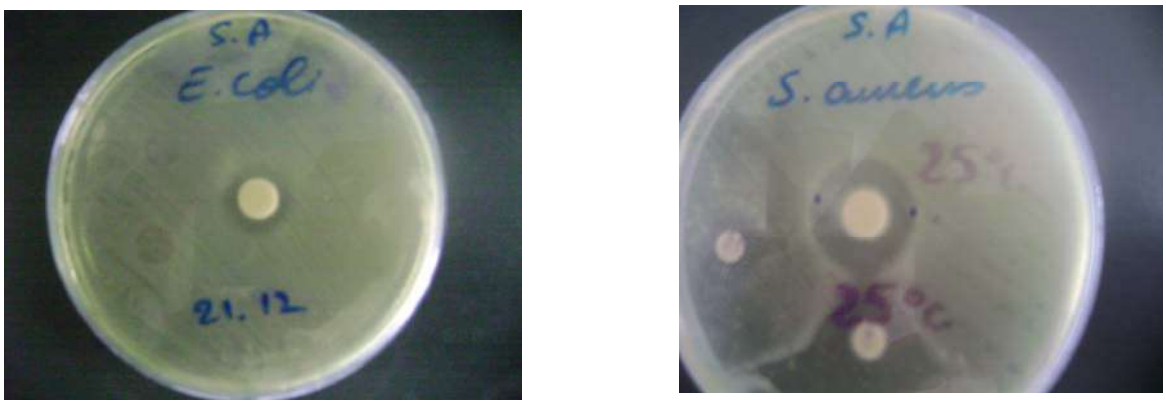


Figure IV.9 : Photos choix de la souche

Tableau IV.2 : Diamètre des zones d'inhibition des souches

Souche	Diamètre d'inhibition (mm)
S. Aureus	21.5
B. Subtilis	24.2
S. Epdermis	24.5
E . Coli	20.9

Le tableau IV.2 montre que les diamètres des zones d'inhibition sont très importants pour *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus Epidermis*. Ces deux genres sont donc les plus sensibles vis-à-vis de notre extrait par comparaison avec *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* qui présentent des zones d'inhibition moindres.

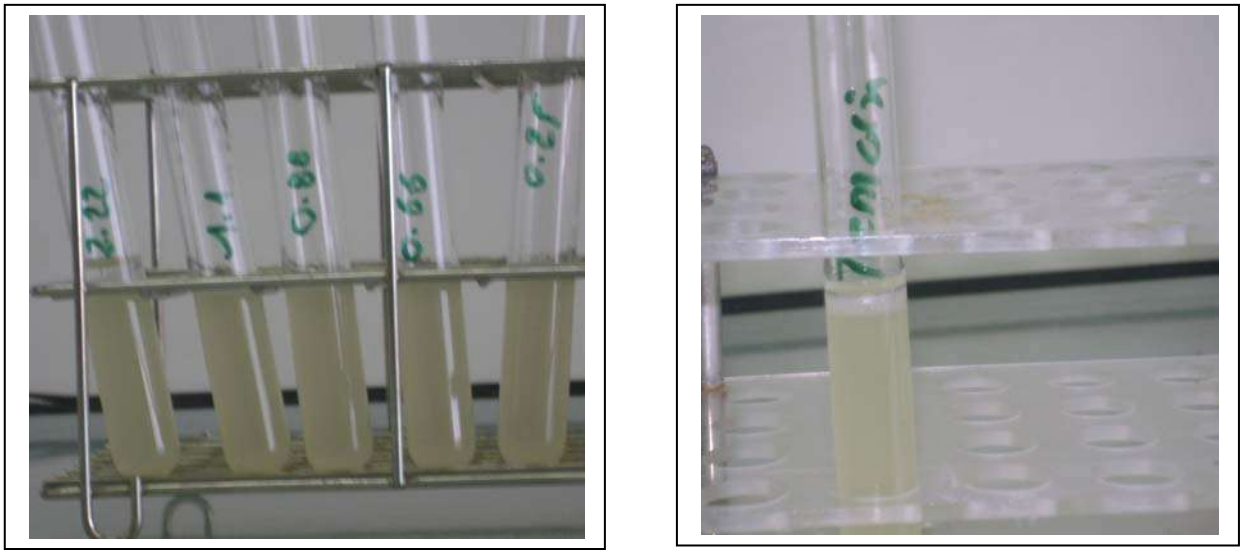
Pour la suite de nos essais et afin de prouver l'efficacité antibactérienne de notre extrait, il faut choisir les souches les moins sensibles : *E. coli* et *S aureus*. *Escherichia coli* constitue un exemple d'un genre Gram négatif non pathogène et *Staphylococcus aureus* est un exemple d'une bactérie Gram positif.

IV.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Afin de prouver le pouvoir antibactérien de notre extrait, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice vis-à-vis de la souche choisie (*Staphylococcus aureus*).

IV.5.2.1. Méthode de dilution en milieu liquide :

Après incubation de *S aureus* en présence de concentrations décroissantes de notre extrait d'ail frais, nous avons obtenu des troubles au niveau de toutes les dilutions (figure (IV.10). L'examen de l'aspect des bouillons a révélé que notre extrait n'est pas miscible avec le milieu de culture. C'est la raison pour laquelle il n'a pas exercé son effet inhibiteur sur la croissance de la souche testée. Il est donc impossible de déterminer la CMI avec la méthode de dilution en milieu liquide. La méthode de diffusion en milieu solide est donc préconisée.



I **II**

Figure IV.10 : Méthode des dilutions en milieu liquide
(**I :** Dilution de concentration décroissante,
II : Solution témoin)

IV.5.2.2. Méthode de diffusion en milieu solide:

Après 18h d'incubation, des zones d'inhibition sont observées. Figures (IV.11, IV. 12). Les diamètres d'inhibition obtenus sont représentés sur le tableau IV.3.



Figure IV.11 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice par la méthode de diffusion en milieu solide sur *S aureus*.



Figure IV.12 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice par la méthode de diffusion en milieu solide sur *E coli*.

Tableau IV.3 : Diamètre des zones d'inhibitions obtenues par la méthode de diffusion en milieu solide

Concentration en extrait (µg/ml)	Concentration en Allicine (µg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)	
		S. Aureus	*E. Coli*
123	98.4	26.6	26.4
61.5	49.2	23.1	19.0
30.75	24.6	16.4	17.4
15.38	12.3	11.6	15.4
07.69	06.15	10.4	12.4
03.85	03.08	---	11.2
01.93	01.54	---	---
00.97	00.77	---	---
00.49	00.39	---	---
00.25	00.19	---	---
00.13	00.098	---	---
00.065	00.049	---	---

Pour *S. aureus*, nous avons constaté une inhibition de la croissance pour les premières dilutions jusqu'à une concentration de 7,69 µg d'extrait/ml (6,15 µg d'allicine/ml). La Concentration Minimale Inhibitrice correspond donc à celle de la 5ème dilution (CMI≈7,5 µg d'extrait/ml, 6,15 µg d'allicine/ml).

Pour E. coli, la CMI est estimée de 3,85 µg d'extrait/ml (3,08 µg d'allicine/ml). La CMI enregistrée pour *E coli* est donc plus faible. L'effet antibactérien de notre extrait vis-à-vis de cette souche est maintenu même pour des concentrations plus faibles que celles obtenues avec *S aureus*. En conclusion, notre extrait pourrait être plus actif sur *E coli* (Gram$^-$) que sur *S aureus* (Gram$^+$).

IV.5.3. Effet des facteurs physico-chimiques sur l'activité antibactérienne

IV.5.3.1. Effet de la température

Les figures IV.13 et IV.14 représentent les zones d'inhibitions de *S aureus* obtenues pour des extraits exposés pendant une heure et six heures à 50°C et 75°C.



Figure IV.13 : Diamètre d'inhibition à T=50°C et T=75°C après une heure d'incubation

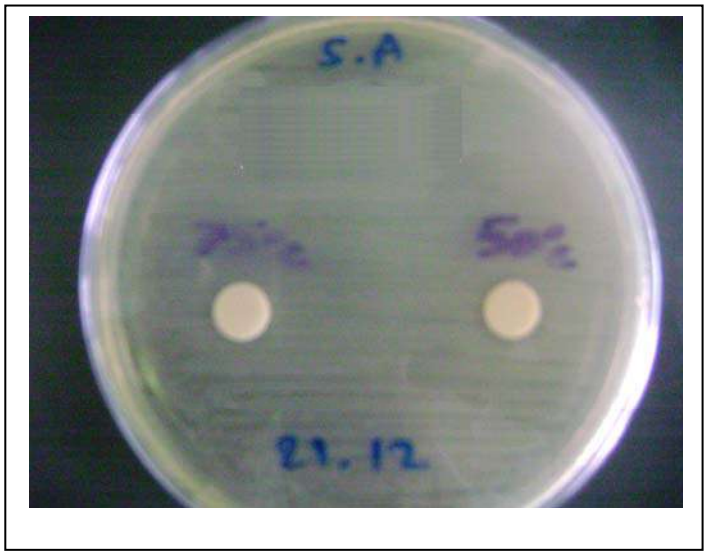


Figure IV.14 : Diamètre d'inhibition à T=50°C et T=75°C après 6 heures d'incubation

La figure IV.15 nous illustre bien la variation des diamètres des zones d'inhibition de *S aureus* au cour de l'incubation des extraits d'ail aux différentes températures.

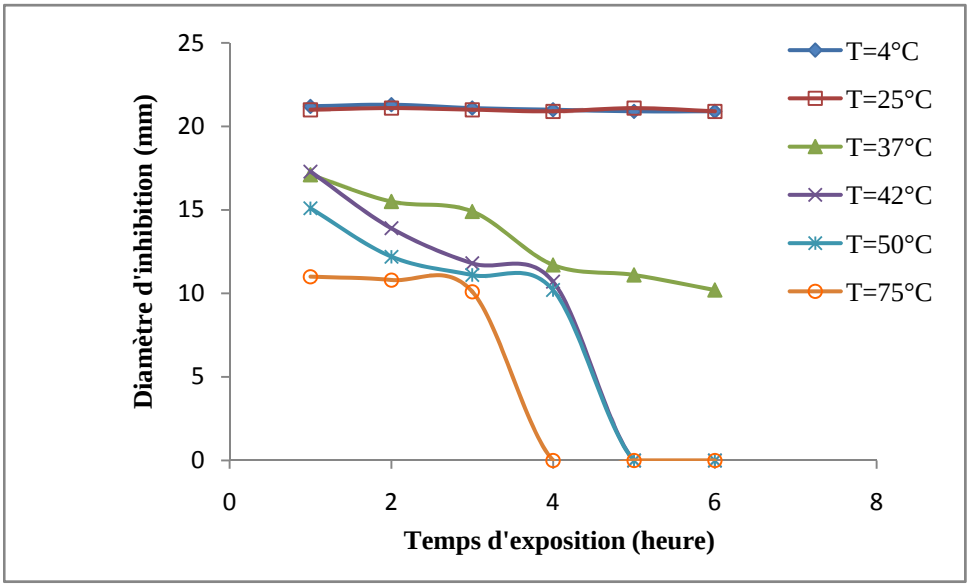


Figure IV.15 : Influence de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail vis-à-vis de *S. aureus*.

Pour des températures de 4°C et 25°C, nous avons enregistré une bonne stabilité de l'activité antibactérienne de notre extrait dans la limite de nos conditions opératoires (Temps d'incubation de 6h). *S aureus* reste sensible à l'extrait d'ail durant toute la durée du traitement. Ceci est probablement dû à une meilleure stabilité chimique des composés responsable de l'effet antibactérien à cette marge de température.

A la température de 37°C, nous avons enregistré une diminution progressive du diamètre d'inhibition durant l'incubation de l'extrait, il varie de 17.1 mm à la première heure jusqu'à 10.2 mm à la sixième heure. Dans ce cas la dégradation des composés antimicrobiens est proportionnelle à la durée du traitement.

Cependant, nous avons noté une réduction considérable des diamètres d'inhibition pour des températures plus importantes (T=42° et T=50°C). Pour une température de 42°C, le diamètre de la zone d'inhibition varie de 17,3 mm à la première heure jusqu'à 10.7mm à la quatrième heure. Nous n'avons pas noté de zones d'inhibition à partir de la cinquième heure. A

75°C, les résultats montrent un effet antibactérien faible qui ne persiste pas plus de trois heures d'incubation.

L'effet de la température sur l'activité antibactérienne de notre extrait est plus marqué vis-à-vis d'E coli (Figure IV.16 et IV.17, tableau IV.4.). En effet, les extraits exposés à des températures de 50°C et 75°C perdent leur effet inhibiteur à partir de 2 heures d'incubation. Pour des températures plus basses (37°C et 42°C), nous avons noté une diminution des diamètres d'inhibition avec l'augmentation de la durée d'exposition. L'effet inhibiteur de notre extrait est stable dans une marge de température de 4°C-25°C.

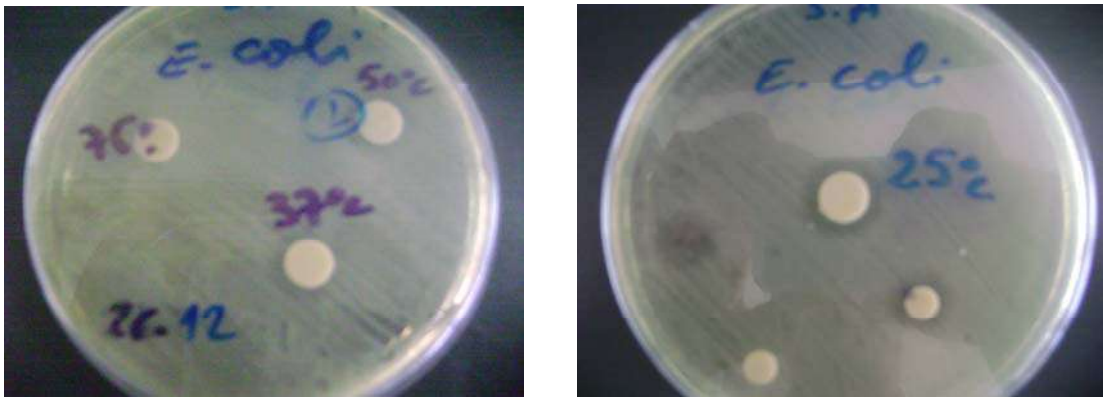


Figure IV.16 : Zones d'inhibition d'*E coli* obtenus pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (25-75°C) pendant une heure.



Figure IV.17 : Zones d'inhibition d'*E coli* obtenus pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (50°C et 75°C) pendant 3 heures.

Tableau IV.4 : Diamètres des zones d'inhibition d'*E coli* enregistrés à différentes températures pour différents temps d'exposition.

	Temps d'incubation		
Température d'incubation	**1 heure**	**2 heures**	**3 heures**
T=4°C	**26,4**	**26**	**26**
T=25°C	**26,4**	**21**	**21**
T=37°C	**18.2**	**12.4**	**/**
T=50°C	**12.4**	**/**	**/**
T=75°C	**10.2**	**/**	**/**

D'après l'étude de la stabilité chimique de notre extrait d'ail par HPLC, nous avons noté que l'allicine présente une instabilité thermique. Sa dégradation donne des dérivés organosulfurés. Et comme l'élévation de la température diminue l'effet antibactérien de l'extrait d'ail, nous pouvons dire que l'allicine est probablement le composé responsable de cet effet antibactérien. Il apparait bien que la dégradation thermique de l'allicine a une influence plus importante sur l'effet antibactérien de l'extrait d'ail vis-à-vis d'*E. coli* par rapport à *S aureus*. L'allicine pourrait donc avoir plus d'action sur les bactéries Gram négatif que sur les bactéries gram positif.

Parmi les études réalisées, on peut citer celle de **Srinivasan et al., 2009** et celle **de Dababneh B.F.A et Al-Delaimy K.S, 2003.** Ils ont étudié l'effet de la température sur l'activité antibactérienne pour différentes températures pour un temps assez long, ils ont trouvé que la concentration inhibitrice d'extrait d'ail était inchangée pour une température de stockage de 4 °C. Par contre, au dessus de 25 °C, il ya une réduction du diamètre d'inhibition.

IV.5.3.2. Effet du pH

L'étude de l'activité antibactérienne en fonction du pH a été initiée dans notre étude. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure (IV.18).

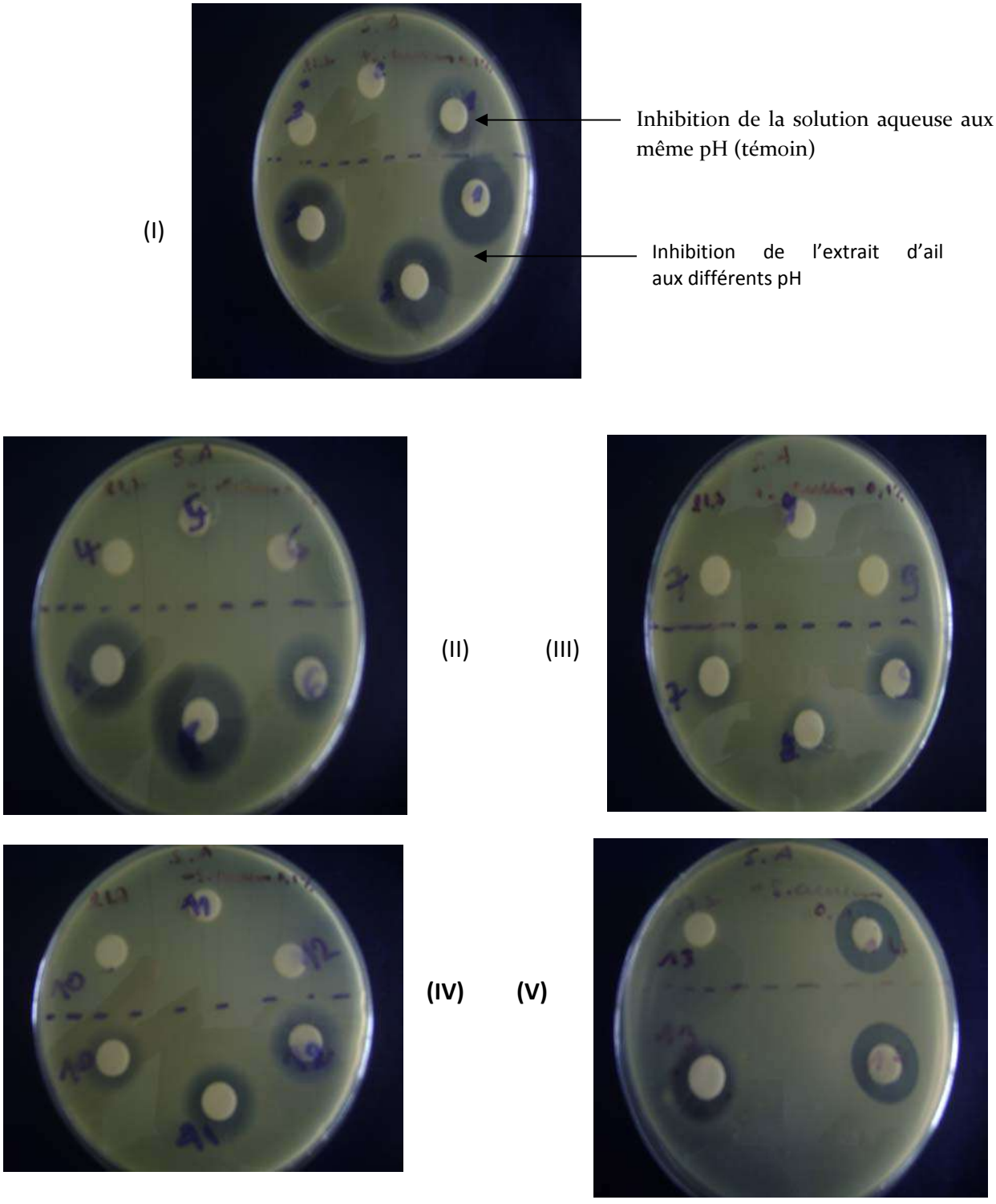
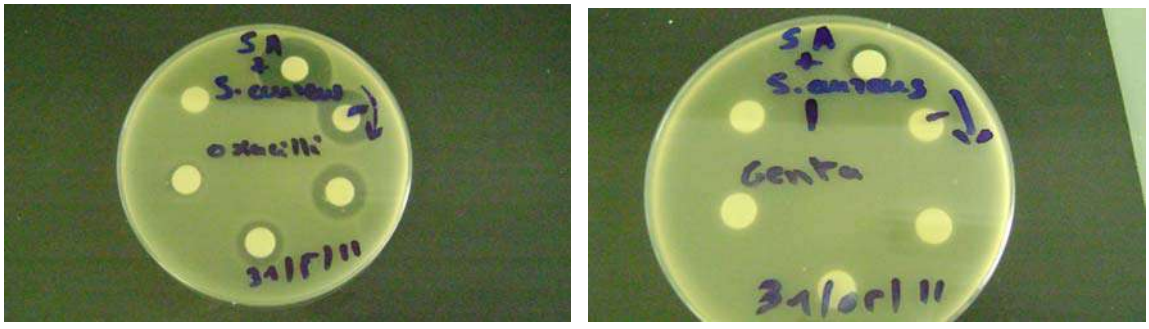


Figure IV.18: Effet du pH sur l'activité antibactérienne de l'allicine : Zones d'inhibitions enregistrées aux différents pH **(I** : pH 1, 2, 3 **; II:** pH : 4, 5, 6 ; **III** : pH : 7.8.9 ; **IV** : pH : 10, 11, 12 **;** **V**: pH : 13, 14)

Les résultats obtenus montrent que le pH du milieu influe sur le diamètre d'inhibition, et par conséquent sur l'activité antibactérienne de l'allicine. Nous notons une activité très basse aux pH extrêmes (pH=1, pH≈14). Les zones d'inhibition sont de plus en plus importantes en passant du pH=2 à pH=5. Ceci nous montre bien une amélioration de l'effet antibactérien de notre extrait. Cependant, l'augmentation du pH au-delà de pH=6 engendre une diminution de l'activité antibactérienne de notre extrait marquée par une diminution des zones d'inhibition. Les extraits soumis à des pH ≥9 présentent une légère amélioration de l'activité antibactérienne. Cependant cette dernière n'est pas aussi importante de celle enregistrée dans une marge de pH situé entre pH=2 et pH=5 qui constitue la marge optimale où notre extrait exprime son maximum d'effet antibactérien. La nature du milieu modifie donc soit la structure chimique de notre extrait ou son mécanisme d'action. Ceci reste à confirmer par une étude ultérieure de la stabilité chimique de l'allicine en fonction du pH par HPLC. Nos résultats sont conformes avec les études réalisées par **Tynicka et al**, **1993.**

IV.5.3.3. Etude comparative entre l'allicine et quelques antibiotiques

Après 18h d'incubation de *S. aureus* à 37°C, des zones d'inhibition sont observées (Figures IV.19a et IV.19b). Les diamètres d'inhibition obtenus sont représentés sur le tableau IV.5.



a **b**

Figure IV.19 : Diamètre d'inhibition (a. Oxacilline ; b. Gentamycine)

Tableau IV.5 : Diamètre d'inhibition de S. aureus obtenus pour des concentrations décroissantes en antibiotiques: détermination de la CMI.

Concentration en extrait (µg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)		
	Oxacilline	Pénicilline V	Gentamycine
1000	33.9	∞	19.4
500	33.2	∞	15.6
250	32.8	∞	13.9
125	32.2	34.0	13..2
62.5	28.4	33.0	12.4
31.25	27.1	30.0	11.8
15.62	24.9	32.0	11.2
7.80	19.4	28.0	-
3.91	16.8	25.2	-
1.95	13.2	21.1	-
0.98	10.08	17.4	-
0.49	-	11.8	-

Les Concentrations minimales inhibitrices approximatives sont de 0,98µg/ml et 15,62µg/ml pour Oxacilline et Gentamycine respectivement. La Pénicilline V semble être plus active sur *S. aureus*, car sa CMI est très petite (<0,48µg/ml). La CMI de notre extrait d'ail (7,69µg/ml, 6,15µg d'allicine/ml) semble être inférieure à celle estimée pour la gentamycine et supérieure à celles trouvées pour l'Oxacilline et la Pénicilline V acide. Notre extrait (80% d'allicine) est donc plus actif que la Gentamycine et moins actif que l'oxacilline et la Pénicilline V acide vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

IV.6. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE

IV.6.1. Détermination de la concentration Minimale inhibitrice (CMI)

Après 18h d'incubation, des zones d'inhibition sont observées (Fig.IV .20a et IV.20 b). Les diamètres d'inhibition obtenus sont représentés sur le tableau IV.6**.**

Tableau IV.6 : Diamètre des zones d'inhibitions obtenues pour l'étude antifongique

Concentration en extrait (µg/ml)	Concentration en Allicine (µg/ml)	Diamétre d'inhibition (mm)	
		Candida albicans	*Saccharomyces cerevisia*
123	98.4	31.2	∞
61.5	49.2	25.4	31.20
30.75	24.6	16.9	26.80
15.38	12.3	12.2	20.40
07.69	06.15	11.4	15.00
03.85	03.08	10.1	11.60
01.93	01.54	……	10.20
00.97	00.77	----	10.80
00.49	00.39	----	10.40
00.25	00.19	----	10.20
00.13	00.098	----	….
00.065	00.049	----	….

Pour *Candida albicans*, nous notons une inhibition de la croissance pour les premières dilutions jusqu'à une concentration de 3,85µg d'extrait/ml (3,08µg d'allicine/ml) qui constitue la concentration minimale inhibitrice. Ce résultat porte un intérêt médical, car *Candida albicans* est une levure pathogène. Pour *Saccharomyces cerevisiae*, la CMI est estimée de 0,25µg d'extrait/ml (soit 0,19 µg d'allicine/ml). Notre extrait d'ail est donc plus actif sur *Saccharomyces cerevisiae.*



Figure IV.20a : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice par la méthode de diffusion en milieu solide sur *Candida albicans*





Figure IV.20b : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice par la méthode de diffusion en milieu solide sur *Saccharomyces cerevisiae*.

IV.6.2. Effet de la Température sur l'effet antifongique :

La variation des diamètres d'inhibition en fonction de la durée d'incubation pour les différentes températures est représentée sur les figures IV.21, IV.22, IV.23 et IV.24.

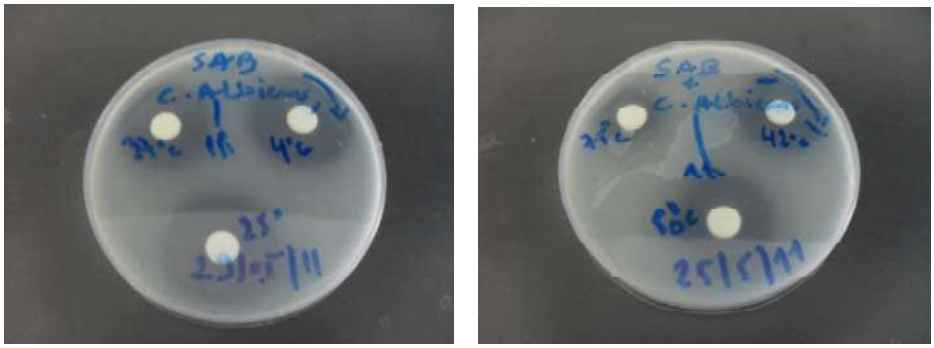


Figure IV. 21 : Zones d'inhibition pour *Candida albicans* obtenus pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (25-75°C) pendant une heure**.**

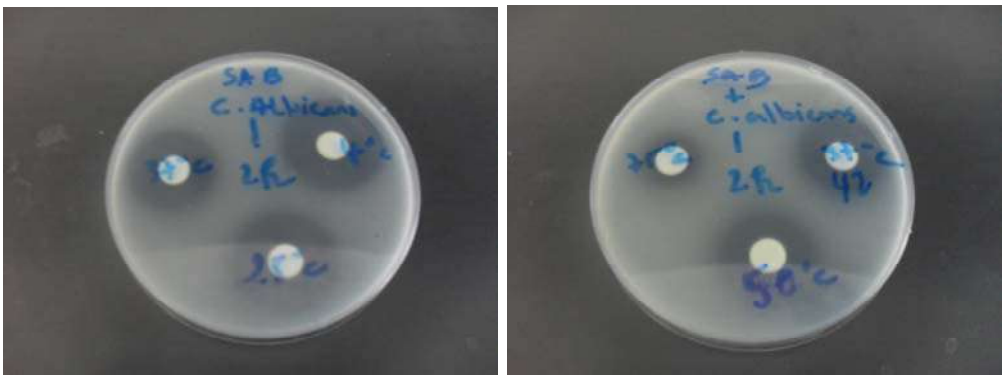


Figure IV. 22 : Zones d'inhibition pour *Candida albicans* obtenus pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (25-75°C) pendant deux heures.

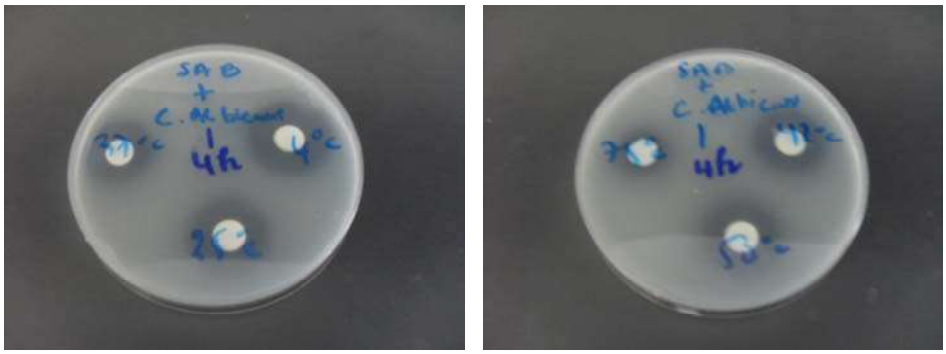


Figure IV. 23 : Zones d'inhibition pour *Candida albicans* obtenus pour les extraits d'ail incubés aux différentes températures (25-75°C) pendant quatre heures

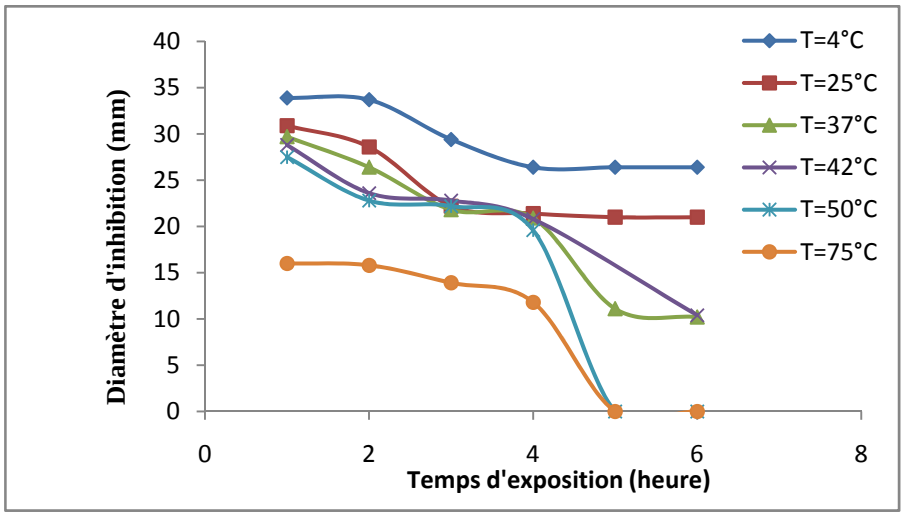


Figure IV.24 : Influence de la température sur l'activité antifongique de l'extrait d'ail vis-à-vis de *Candida albicans*.

Pour des températures de 4°C et 25°C, nous avons enregistré une légère diminution l'activité antifongique qui se manifeste par une diminution des zones d'inhibition au bout de 4h d'incubation. Cette baisse est due probablement à la dégradation de quelques composés organosulfurés autre que l'allicine doués de pouvoir antifongique (**Lawson et al., 1991)**. L'activité antifongique est par la suite stable jusqu'à six heures d'incubation. Plusieurs études ont prouvé le pouvoir antifongique de l'allicine comme composé principal de l'extrait d'ail. La stabilité de l'effet antifongique enregistré à partir de 4heure est probablement due à une meilleure stabilité chimique de l'allicine déjà prouvé par HPLC.

Pour des températures de 37°C et 42°C, nous avons enregistré une diminution significative des diamètres d'inhibition durant l'incubation de l'extrait, ils varient de 29 mm à la première heure jusqu'à 10mm à la sixième heure. Cependant, nous avons noté une réduction considérable des diamètres d'inhibition pour des températures plus importantes (T=50°C et T=75°C). L'effet antifongique est faible et ne persiste pas plus de Cinque heures d'incubation (surtout pour 75°C).

A des températures élevées, l'allicine subit une dégradation (Cf. Chromatogrammes HPLC) ; ceci entraine une diminution du pouvoir antifongique de l'extrait d'ail.

IV.7. ETUDE IN VIVO DE L'ACTIVITE HYPOGLYCEMIANTE ET HYPOCHOLESTEROLEMIANTE DE L'ALLICINE

IV.7.1. Activité hypoglycémiante

IV.7.1.1. Essais d'induction du Diabète chez les rats

L'alloxane exerce une toxicité sélective sur les cellules pancréatiques productrices d'insuline, il est utilisé en laboratoire pour induire un diabète sur des modèles animaux. L'hyperglycémie provoquée par voie sous cutanée suite a une injection de 1ml de monohydrate d'alloxane de concentration 40 mg/ml chez des rats a jeun entraine une élévation considérable du taux de glucose dans le sang au bout de 48 h. Il faut signaler que cette induction a provoquée une mortalité variable selon la résistance relative à l'alloxane qui diffère d'un animale a un autre et aussi selon l'importance des dommages engendrés par ce produit sur les cellules pancréatiques de type β. Nous avons enregistré une élévation de La glycémie de 1.01g/l à 4.75 g/l.

IV.7.1.2. Essais de correction de la glycémie par l'extrait d'ail frais

Afin d'explorer l'effet de l'allicine sur la glycémie, nous avons procédé à un traitement d'un lot alloxanique (lot 1) par l'extrait d'ail frais maintenu à une température de 4°C**.** Les résultats obtenus sont représentés sur la figure V.25.

Chez les rats alloxaniques l'administration quotidienne d'une quantité de 1.5 ml d'ail frais soit 0.515 g d'allicine entraine une baisse significative de la glycémie au bout de 24 h de traitement (de 4.474 g/l à 2.006 g/l), la glycémie est ensuite stabilisée au bout d'une semaine de traitement, pour atteindre 1.044 g/l à la deuxième semaine de traitement, puis 0.867g/l à la troisième semaine de traitement.

Suite à une semaine d'arrêt de traitement, nous avons constaté une ré-augmentation progressive de la glycémie : les taux enregistrés sont de 1.23g/l, 1.33g/l et 1.35g/l à la première semaine, la deuxième semaine, et la troisième semaine d'arrêt du traitement respectivement.

En parallèle, un deuxième lot est traité par l'extrait d'ail exposé à une température de 75°C pendant 30 minutes. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure IV.26.

Lot 1 :

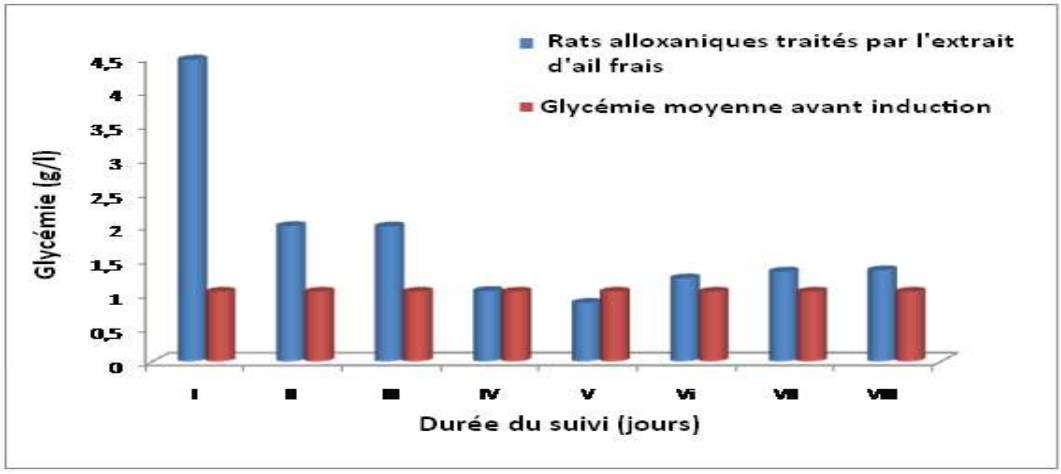


Figure IV.25 : Etat des Rats alloxaniques traités par l'extrait d'ail maintenu à 4°C.

N.B : Valeurs moyenne de 5 rats.
I – Après 48 h de l'injection de monohydrate d'alloxane 98% **II**- après 24 h du traitement
III- une semaine du traitement **IV**- deux semaines du traitement **V**- trois semaines du traitement
VI : Une semaine d'arrêt du traitement. **VII :** Deux semaines d'arrêt du traitement**.**

Lot 2

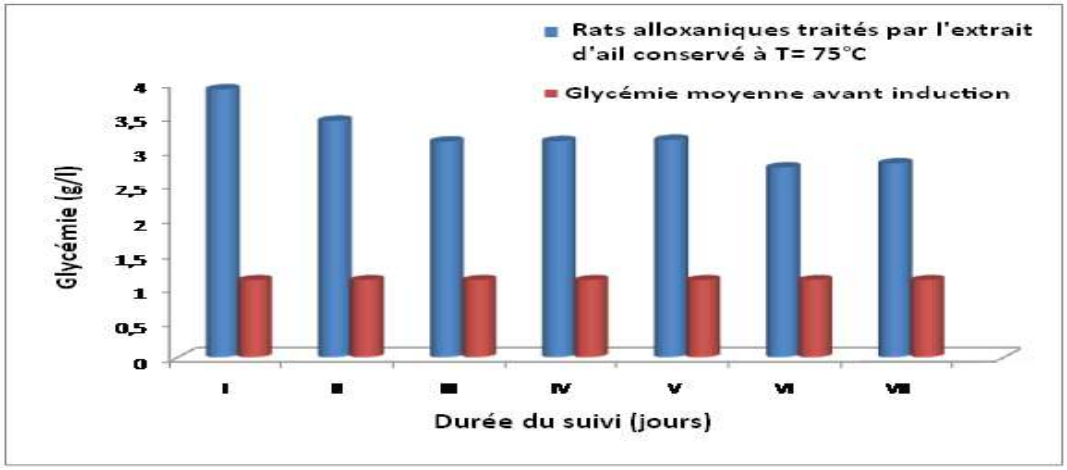


Figure IV.26 : Etat des Rats alloxaniques traités par l'extrait d'ail exposé à une température de 75°C.

N.B : Valeurs moyenne de 5 rats.
I - Après 48 h de l'injection de monohydrate d'alloxane 98%
II - après 24 h du traitement **III** - une semaine du traitement **IV**- deux semaines du traitement
V- trois semaines du traitement **VI :** Une semaine d'arrêt du traitement.
VII : Deux semaines d'arrêt du traitement**.**

Contrairement aux rats du premier lot, les rats alloxaniques du deuxième lot, ne manifestent pas une modification significative de la glycémie. Après 48 h de l'injection de l'alloxane le taux de glucose dans le sang atteint une valeur maximale moyenne égale à 3.914g/l. Le traitement par l'extrait d'ail (maintenu à 75°C) entraine une légère baisse de la glycémie : les valeurs enregistrées sont de 3.44 g/l, 3.14 g/l, pendant 24 h et après une semaine du traitement t. La glycémie se stabilise par la suite à la deuxième et à la troisième semaine du traitement. Le manque d'efficacité du traitement engendré par l'extrait d'ail (à 75°C) est du à la dégradation du thiosulfinate (allicine), déjà démontré par les chromatogrammes réalisés suite à l'exposition de notre extrait à des températures supérieur de 75°C. Un troisième lot est aussi traité par un médicament connu par son effet hypoglycémiant (Metformine HCl 850 mg). Ce lot a pour but de comparer l'effet de notre extrait avec celui d'un antidiabétique de référence. Les résultats sont représentés sur la figure IV.27.

Lot 3 :

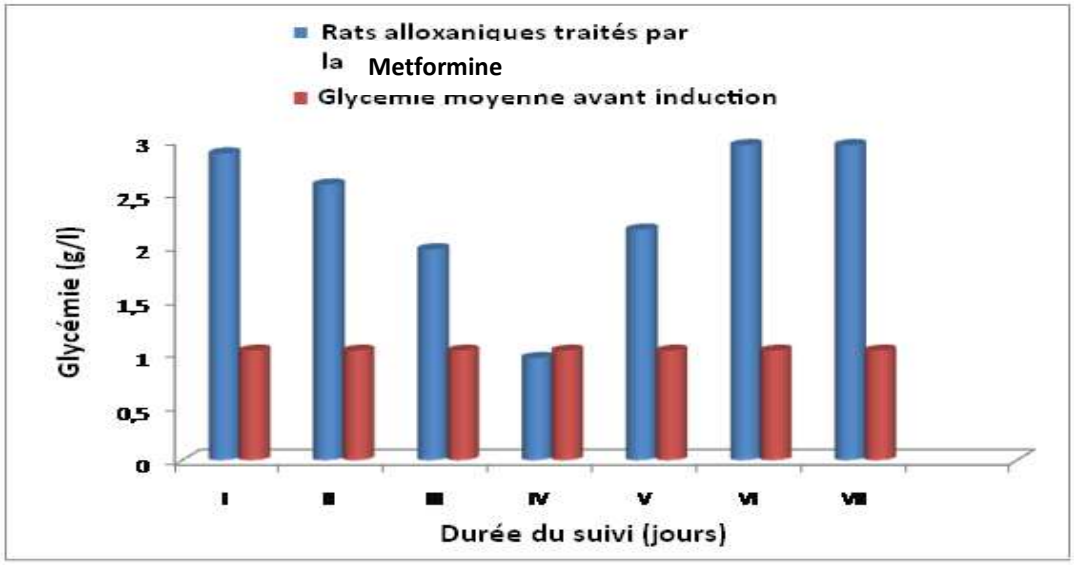


Figure IV.27 : Etat des Rats alloxaniques traités par la Metformine HCl.

N.B : Valeurs moyenne de 5 rats.

I : Après 48 h de l'injection e l'alloxane
II : après 24h de traitement **III :** Une semaine de traitement **IV** : Deux semaines de traitement
V: Trois semaines de traitement **VI :** Une semaine d'arrêt de traitement.
VII : Deux semaines d'arrêt de traitement**.**

Des rats alloxaniques reçoivent par gavage une dose quotidienne de 200 mg/kg d' une solution de Metformine HCl 98%. Nous avons noté une légère baisse de la glycémie après 24 h de traitement **(**de 2.878 au pic glycémique obtenu après 24 h de l'injection de l'alloxane à 2.586 à 24 h de traitement**).** Le déclin de la glycémie est plus observé par la suite : les glycémies enregistrées sont de 1.98 g/l et 0.98 g/l après une semaine et deux semaines de traitement respectivement. Nous signalons que la glycémie enregistrée à la deuxième semaine de traitement est comparable à celle des rats normo-glycémiques. A la lumière de ces resultats, nous pouvons dire que l'effet de notre extrait (maintenu à température comprise entre 4°C et 25°C) est comparable à celui du produit antidiabétique. Il faut signaler que l'arrêt du traitement entraine la réapparition de l'hyperglycémie (jusqu'à 3.62g/l à la 4ème semaine d'arrêt du traitement).

Nous avons préparé un quatrième lot constitué de rats alloxatiques n'ayant pas subit un traitement spécifique. Ce lot constitue un témoin positif. Les résultats des différentes prises de glycémie durant 5 semaines d'observation sont représentés sur la figure IV.28.

Lot 4 :

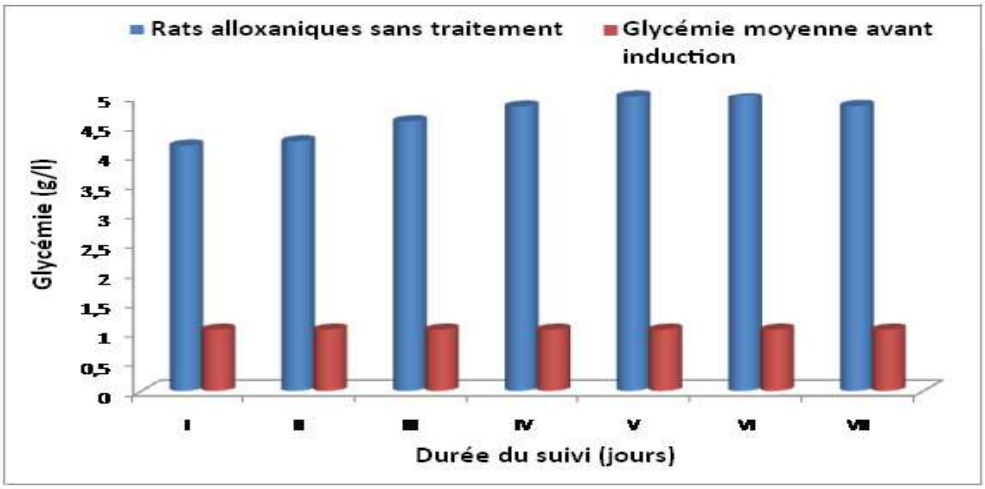


Figure IV.28 : Etat des Rats alloxaniques sans traitement durant 5 semaines,

N.B : Valeurs moyenne de 5 rats.
I : Après 48 h de l'injection de l'alloxane **II** : Après 24h de la première prise de glycémie.
III : Une semaine. **IV** : Deux semaines. **V:** Trois semaines. **VI** : Quatre semaines
VII : Cinq semaines.

Après induction d'alloxane, les rats ne reçoivent aucun traitement. La glycémie prend une allure ascendante durant les cinq semaines d'observation, elle varie de 4.16 g/l après 48 h d'injection d'alloxane pour atteindre un pic hyper glycémique de 5 g/l après 3 semaines. La glycémie est ensuite stable jusqu'à la dernière prise glycémique.

Un cinquième lot constitué de rats n'ayant pas subit d'induction de diabète a été préparé. Ce lot a subit un traitement par l'extrait d'ail (à 4°C), il constitue un témoin négatif. Les résultats des prises glycémiques durant 5 semaines d'observation sont représentés sur la figure IV.29.

Lot 5 :

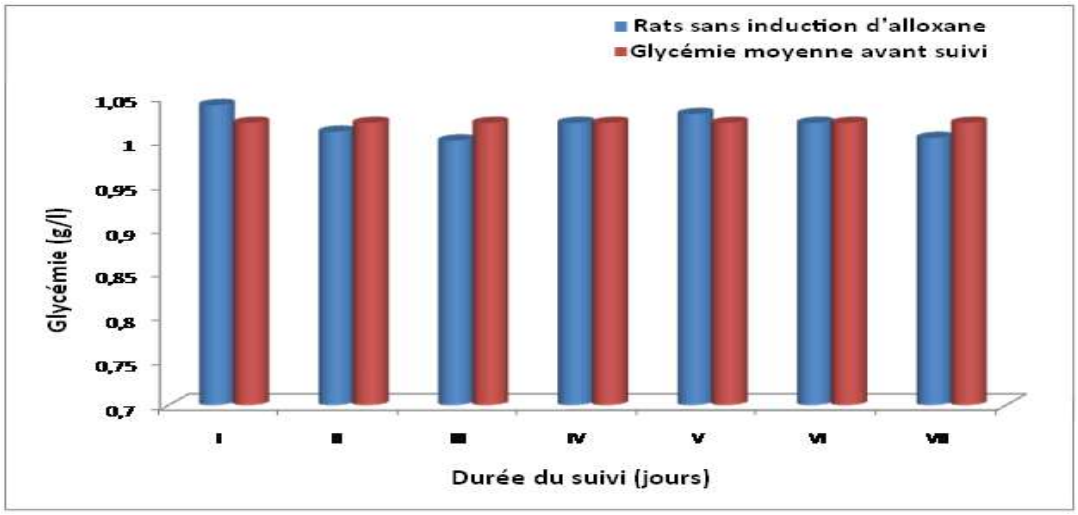


Figure IV.29 : Etat des Rats non alloxaniques ayant subit un traitement à l'extrait d'ail (4°C)

N.B : Valeurs moyenne de 5 rats.
I : 48h d'observation. **II :** Après 24h du traitement. **III :** Une semaine. **IV :** Deux semaines.
V: Trois semaines. **VI :** Une semaine d'arrêt du traitement. **VII :** Deux semaines d'arrêt du traitement**.**

Un prélèvement sanguin a été effectué chez tous les rats non induit par l'alloxane et traités par 1.5 ml d'extrait d'ail frais, pendant les mêmes périodes du prélèvement que les lots des rats alloxaniques. Nous avons remarqué que la glycémie est pratiquement stable durant les trois semaines d'administration de l'extrait d'ail (à 4°C). Il en est de même pour la période suivant

l'arrêt du traitement. Ceci indique que notre extrait n'a pas d'effet hypoglycémiant pour les sujets normaux.

IV.6. SUIVI PHYSIOLOGIQUE DES DIFFERENTS LOTS DE RATS

Le pic hyper-glycémique engendré par l'alloxane est accompagné d'un changement physiologique des rats : une diminution du poid et une perturbation nutritionnelle. Le poids moyen de chaque lot a été déterminé par peser quotidienne des animaux appartenant au même lot.

La figure (IV.30) représente les poids de chaque lot en fonction du temps : nous avons constaté que les rats alloxaniques se distinguent par une consommation très réduite en aliment par rapport aux rats normo glycémiques.

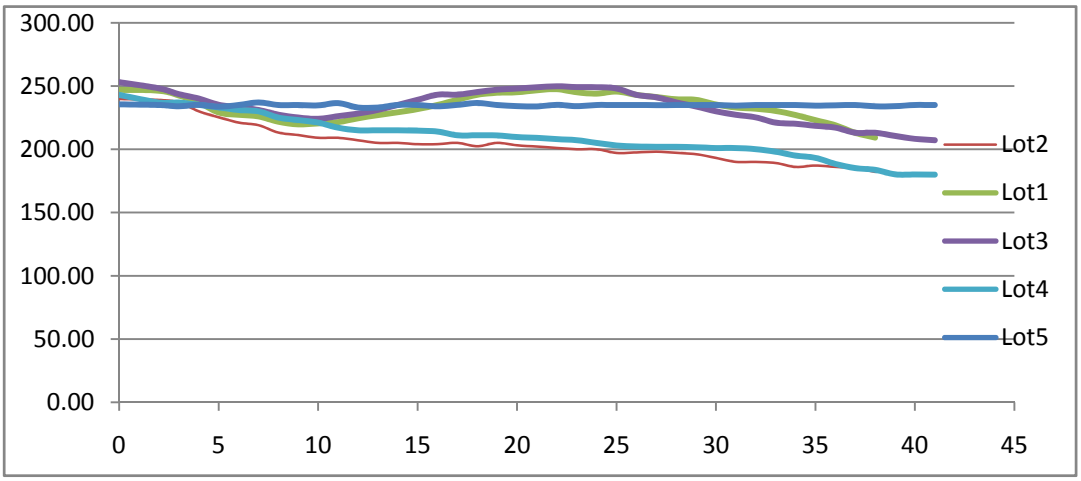


Figure IV.30 : variation du poids des rats pour chaque lot durant la période d'observation

IV.7. ETUDE COMPARATIVE

Plusieurs auteurs on cité l'effet inducteur du diabète suite à l'administration de l'alloxane :

Dhanabal et al., 2005, l'induction du diabète due à l'alloxane monohydrate entraine une hyperglycémie après 48 h d'injection, accompagnée d'une chute significative de l'insulinémie.

- **Lenzenet al., 1996,** ce composé entraine une destruction des cellules beta du pancréas, ce phénomène s'explique par le fait que l'alloxane produit du peroxyde et d'autres radicaux libre. Il est responsable de cette nécrose des cellules beta pancréatiques,
- **Abir et al., 2005**, ce mécanisme entraine une chute dans la sécrétion de l'insuline et une auto- oxydation du glucose et aggrave le système redox.

Le traitement des Rats alloxaniques à l'ail frais entraine une baisse significative de la glycémie. Selon la bibliographie, ce mécanisme d'action n'est pas encore clair : **Liu et al., 2005** suggèrent que l'action hypoglycémiante de l'ail pourrait probablement être due à une augmentation de la sécrétion de l'insuline par les cellules beta. Cette suggestion n'explique pas nos résultats, puisque le lot des rats non alloxanique, traité par l'extrait d'ail (à 4°C) n'a pas manifesté des hypoglycémies. Ceci nous laisse suggérer que l'élévation de la glycémie enregistrée après arrêt du traitement est due à un effet régulateur n'impliquant pas l'insuline dans l'effet hypoglycémiant.

En comparant l'effet hypoglycémiant engendré par l'extrait d'ail (4°C) et celui engendré par l'extrait exposé à 75°C, nous pouvons dire que l'allicine pourrait être le composant responsable de l'effet hypoglycémiant puisque ce dernier a subit une dégradation à 75°C .

IV.8. ACTIVITE HYPOCHOLESTEROLEMIANTE

IV.8.1. Induction de l'hyper-cholestérolémie chez les rats

Après un programme de nourriture riche en cholestérol (jaune d'œuf) et durant une période de six semaines la cholestérolémie a été multipliée par 4 cette induction à été suivi avec une augmentation dans le poids des rats sans aucun taux de mortalité.

IV.8.2. Essais sur des rats hyper-cholestérolemiques

Les résultats des études faites sur des rats hyper-cholestérolemiques ainsi que pour un lot de rat normocholesterolémiques est representés sur le graphe suivant figure IV.31.

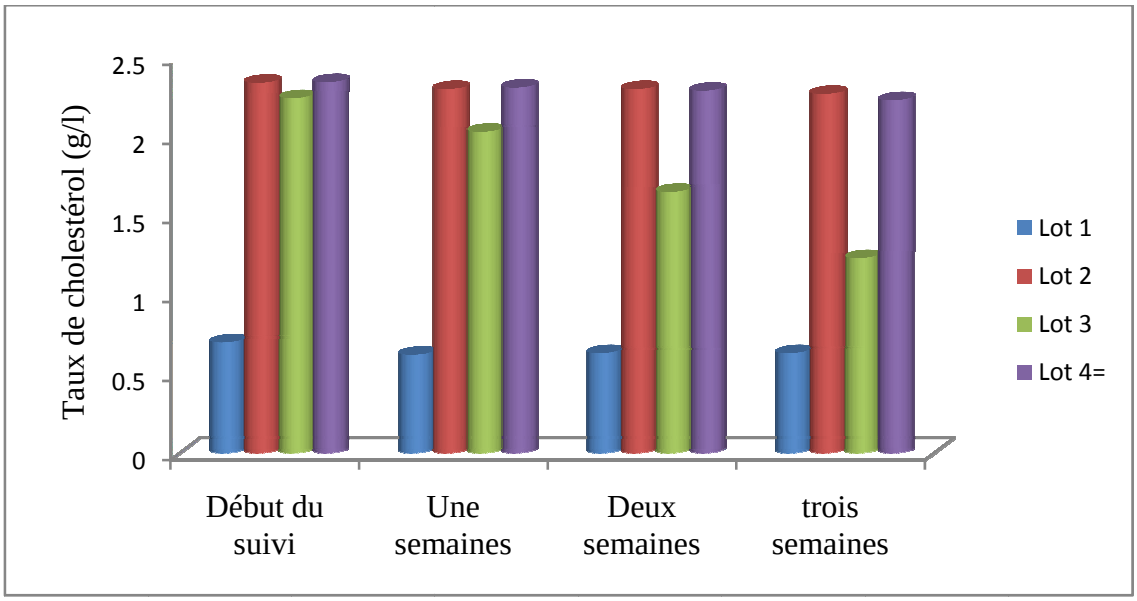


Figure IV. 31 : Effet hypolipidémiant des rats hypercholestérolemiques et normocholesterolémiques

Lot1 : Rats non induits et traités par l'extrait d'ail (4°C),
Lot2 : Rats hypercholesterolémiques sans traitement,
Lot3 : Rats hypercholesterolémiques traités par l'extrait (4°C),
Lot4 : Rats hypercholesterolémiques traités par l'extrait (75°C).

Un prélèvement sanguin a été effectué chez tous les rats non induit par le cholestérol et traités par 1,5 ml d'extrait d'ail frais (4°C) (témoin négatif, lot1). Pendant les trois semaines du traitement, nous avons enregistré que le taux du cholestérol dans le sang est pratiquement stable durant la période du traitement avec l'extrait d'ail (à 4°C). Il en est de même pour les rats hypercholesterolémiques qui n'ont pas subis de traitement avec l'extrait d'ail frais (4°C) : ce lot de rats constitue un témoin positif (lot 2).

Chez les rats hypercholesterolémiques du lot3, l'administration quotidienne d'une quantité de 1.5 ml d'ail frais (4°C) soit 0.515 g d'allicine entraine une réduction progressive du taux du cholestérol dans le sang au bout des trois semaines de traitement (de 2.24 g/l à 1.23 g/l). Les baisses enregistrées sont de 10% pour la première semaine, de 18.5% à la deuxième semaine et de 25% pour la troisième semaine. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par **Durak, 2004**, chez rats hypercholesterolémiques recevant des extraits d'ail pendant 4 mois.

Contrairement aux rats du lot 3 traités par l'extrait d'ail frais (4°C), les rats du lot4 traités par l'extrait d'ail (75°C), ne manifestent pas une modification de la cholestérolémie durant trois semaines de traitement. Ce manque d'efficacité du traitement est dû probablement à la dégradation du thiosulfinate (allicine) responsable de l'effet hypocholestérolémiant, déjà démontré par les chromatogrammes réalisés suite à l'exposition de notre extrait à des différentes températures.

Les mécanismes de l'action hypocholestérolémiante de l'extrait d'ail ne sont pas complètement connus. L'hypothèse la plus souvent avancée est celle d'une inhibition de l'activité enzymatique de l'HMG CoA réductase, enzyme limitante de la synthèse intracellulaire du cholestérol (**Liu et al., 2002**), soit, dans une étape ultérieure de la synthèse, de la squalènemonooxygenase (**Gupta et al., 2001 ; Singh et al., 2006**).

De plus, la protection par l'extrait d'ail des lipoprotéines contre l'oxydation, démontrée également par de nombreuses études, reste un mécanisme indirect essentiel de la régulation de la synthèse intracellulaire du cholestérol (**Lau, 2001**) car les LDL oxydées ne vont pas être reconnues par leurs récepteurs, ce qui conduira à une activation de l'HMGCoA réductase et à l'hypercholestérolémie.

CONCLUSION

La nature de par sa composante végétale, animale et sous marine est une source inépuisable de substances thérapeutiques. Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'ail, plante comestible qui nous est familière et que l'on retrouve dans la majorité de nos plats.

Notre travail avait un double objectif, à savoir : confirmer par l'expérience certaines propriétés connues de l'ail et essayer d'expliquer expérimentalement certaines autres propriétés que l'on attribue traditionnellement à cette plante. Toutes ces expériences ont été menées moyennant l'utilisation d'outils d'analyses modernes comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) d'une part et les méthodes d'analyses biologiques et microbiologiques d'autre part.

Du point de vue choix de la méthode d'extraction, nous nous sommes inspirés des données bibliographiques. En effet, deux modes d'extraction ont été utilisés : l'hydrodistillation et l'extraction par solvant à froid. Notons que pour l'extraction par solvant, une légère modification a été apportée au mode opératoire relaté dans la bibliographie. L'aspect organoleptique des deux extraits et le fait que le principe actif prépondérant de l'ail (l'allicine) soit instable à hautes températures a fait que notre choix du procédé d'extraction se porte sur celui par solvant à froid. D'ailleurs, la suite des expériences nous a confortés dans notre choix. Une optimisation, portant sur les volumes relatifs des deux solvants d'extraction, suivie par HPLC nous a permis de déterminer les volumes adéquats pour l'obtention d'une quantité maximale d'allicine.

Dans une seconde étape, nous avons étudié la stabilité thermique de l'allicine. Plusieurs extraits conservés à différentes températures ont été utilisés. Les résultats obtenus à l'aide de la HPLC nous ont permis de constater que l'allicine est d'autant plus stable que la température

de conservation est très petite. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour une température de 4°C et une proportion en allicine avoisinant les 80%.

Suite à cela, des tests antibactériens et antifongiques ont été menés avec les mêmes extraits cités précédemment. Ces tests ont confirmé les résultats de la stabilité thermique d'une part et le fait que l'allicine soit le principal constituant doué d'une activité thérapeutique.

Les multiples expériences entreprises, sur des rats à glycémie normale et ceux à glycémie élevée, ont dévoilé deux choses : la première est que l'allicine présente un caractère hypoglycémiant effectif vis à vis des rats diabétiques alors que certains auteurs avaient des soupçons sur ce rôle. La seconde, que nous considérons étant la plus importante à nos yeux est que l'allicine ne joue qu'un rôle de régulateur de la glycémie vu que l'administration d'allicine aux sujets normaux n'a en aucun cas affecté sa valeur.

La seconde application de l'extrait d'ail, donc de l'allicine, a trait à l'étude d'une éventuelle propriété cholestérolémiante. La teneur en cholestérol des rats soumis à l'administration de l'extrait d'ail a accusé une décroissance notable. Cependant, cette diminution du taux de cholestérol n'est pas du même ordre de grandeur que celle observée pour la glycémie.

En conclusion, nous pensons que ces expériences menées in vitro et in vivo nous ont édifiées sur certaines des nombreuses actions thérapeutiques de l'ail. Les résultats trouvés ne sont qu'un prélude à d'autres travaux et recherches qui s'avèrent indispensable mais qui nécessitent plus de moyens et de temps.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADLER AJ., HOLUB BJ. Effect of garlic and fish oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations in hypercholesterolemic men Am. J. Clin. Nutr., 1997, 65, 445-450.

AFZAL. M, ALI. M, THOMSON. M, ARMSTRONG. D. Garlic and its medicinal potential. Inflammopharmacology, 2000, Vol. 8, No. 2, pp. 123–148.

AMAGASE H., PETESCH B.L, MATSURA H., Intake of garlic and its bioactive components J. Nutr., 2001, 131, 3S, 955S-962S

AMAGASE, H., SCHAFFER, E. M. AND MILNER, J. A. Dietary components modify the ability of garlic to suppress 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary DNA adducts, 1996, J. Nutr. 126, 817–824.

ANDERSON J.W., DAVIDSON M.H., BLONDE L. Long-term cholesterol-lowering effects ofPsyllium as an adjunct to diet therapy in the treatment of hypercholesterolemia Am. J. Clin. Nutr., 2000,11, 6,1433-1438

ANDRO A. R., ZAMFIRACHE M. - M., BOZ I., PĂDURARIU C., BURZO I., BADEA M. L. Comparative research regarding the chemical composition of essential oils from some Lamiaceae taxa, Buletinul AŞM, Nr. 2010, 2 (311): 161 – 164

ANTON R. Reflexions sur quelques nouvelles acquisitions en phytotherapie. J. Pharm. Belg, 1987, 42:138-51.

ANTONOT ET MARCHAL, , Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology, 1998* **7**: 639-655.

AOUADI R., AOUIDET A., ELKADHI A. Effect offresh garlic *(Allium sativum)* on lipid metabolism in male rats Nutr. Res., 2000, 20, 2, 273-280

ASTASHKIN. E.I, KHOKHLOVA. O.A, TIL'KUNOVA. N.A, ZALEPUGIN. D, GLEZER. M.G. Allicin Suppresses the Production of Oxygen Radicals by Human Neutrophils Induced by Various Stimulating Agents, Cell Biology, 2002, 27, 57-63.

BAGHALIAN. K, ZIAI. S.A, NAGHAV. M.R, BADI. H.N. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (Allium sativum L.) ecotypes Scientia Horticulturae 103, 2005 155–166.

BERNHARD, R. A. (1970) *Phytochemistry*, 9, 2019-2027.

BLOCK, E., AHMAD.R. Antithrombotic organosulphur compounds from garlic, structural mechanistic and synthetic studies, (1986) *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 7045-7055.

BLOCK, E., IYER, R., SAHA, C. Lipoxygenase inhibitors from the essential oil of garlic Markovnikov addition of the allyldithio radical to olefins (1988) *J. Am. Chem. Soc*., 110, 7813-7827..

BLOCK. E., NAGANATHAN, S., PUTMAN, D., ZHAO, S-H. The organosulphur chemistry of the genus Allium. Implications for the organic chemistry of sulphur (1992) *J. Agric. Food Chem*., 40, 2418-2430.

BOUKHATEM. M.N., HAMAIDI. M.S., SAIDI. F., HAKIM. Y. Extraction, composition et valorisation de l'eau aromatique de géraniumrosat (Pelargonium graveolens) dans la dermopharmacie .Revue « Nature et Technologie ». n° 02/Janvier 2010. Pages 59 à 64

BRODNITZ, M. H., PASCALE, J. V., VAN DERSLICE, L. (1971) *J. Agric. Food Chem*., 19, 273.

BROWN L., ROSNER B., WILLEL W.W. Cholesterol-lowerig effects of dietary fiber : a meta-analysis Am. l Clin. Nutr., 1999, 69, 1,30-42

BRUNETON. J Eléments de phytochimie et de pharmacognosie Paris: Technique et Documentation-Lavoisier, 1987.- 585 p.

BRUNETON. J Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales Paris: Tec&Doc; Cachan: EM inter, 1999.- 1120 p.

CALVEY, E. M., ROACH, J. A. G., BLOCK, E. (1994) *J.Chrom. Sci.* 32, 93.

CARSON, J. F.,WONG, F. F. (1961) *J.Agr.Food Chem*., 9, 140.

CAVALLITO C., BAILEY J.H., Allicin, the antibacterial principle of Allium sativum. Isolation, physical properties and antibacterial action, J. Am. Chem. Soc. 66 (1944) 1944–1952.
concentrations in hypercholesterolemic men Am. J. Clin. Nutr., 1997, 65, 445-450

CRAVEIRO., A A, MATOS., F J A., ALENCAR., J W ., LUMEL, M M . Microwave Oven Extraction of an Essential Oil, Flavour and Fragrance Journal, 1989, **4**, 43–44.

CUI J, HUANG L., ZHAO A. Guggulsterone is a Farnesoid X Receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump J. Biol. Chem., 2003, 278,12,10214-10220

CURRIER, H. B., (1945) *Food Research,* 10, 177.

CUTLER. R, WILSON. P. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. british journal of biomedical science 2004 61 (2) 309-315.

DABABNEH B.F.A., AL-DELAIMY K.S. Inhibition of Staphylococcus aureus by garlic extract.Lebensm.-Wissenschaft und-Technol.2003, 17: 29-31.

DAIF, Nadia L'ail, *Allium sativum 1.* (Liliacées) : de la tradition à ses perspectives en thérapeutique moderne Th. : Pharm. : Nancy 1 : 1993 ; 12., 104 f.

DHANABAL, S.P., M. SURESHKUMAR, M. RAMANATHAN AND B. SURESH. Hypoglycemic effect of ethanolic extract of *Musa sapientum* on alloxan induced diabetes mellitus in rats and its relation with antioxidant potential. J. Herb Pharmacother., 2005, 5: 7-19.

DEBELMAS.AM. Guide des plantes dangereuses - 2e éd. Paris: Maloine, 1983.- 200 p.

DELAVEAU. P. Ail: *Allium sativum L.* (Liliacées) Actual. Pharm., 1982, 184, 67-68

Driss. L. Interactions entre plantes medicinales et medicaments : cas de ferula communis l. : une plante anticoagulante. Département de Pharmacie-toxicologie, 2009. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, , RABAT-INSTITUTS, MAROC.

DRON, A., GUYER, D., GAGE, D., LIRA, C., Yield and Quality of Onion Flavor Oil Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Other Methods, Journal of Food Process Engineering, 1997, 20, 107.

DURAK I, KAVUTCU M, AYLAÇ B, AVCI A,DEVRIM E, OZBEK H, OZTURK HS. Effects of garlic extract consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in humans with high blood cholesterol. J Nutr Biochem.2004; 15(6):373-7

FERARY, S., THIBOUT, E., AUGER, J. (1996) *Rap. Comm. Mass Spec*., 10, 1327-1332.

GARNIER. G, BEZANGER. B, DEBRAUX. G. Ressources médicinales de la flore française 1 Paris: Vigot, 1961.-1511 p.

GIRRE. L Connaître et reconnaître les plantes médicinales Rennes: Ouest France, 1980.- 333 .

GIRRE. L La santé par les plantes Rennes: Ouest-France, 1992.- 221 p.

GIRRE. L Les plantes et les médicaments: l'origine végétale de nos médicaments Paris: Delachaux et Niestlé, 2001.- 253 p.

GRUN-THOMAS. S. Etude de trois plantes médicinales et condimentaires : l'ail, le safran, le romarin Th. : Pharm. : Nancy 1 : 1998 ; 63., 137 f.

GUENTHER, E. "The Essential Oils." New York: Robert E. Krieger Publishing Company. 1972, Vol 1. 3-225.

GUPTA K.C., VISWANATHAN R. Combined action of streptomycin and chloramphenicol with plant antibiotics against Tubercle bacilli. 1. Streptomycin and chloromphenicol with cepharanthene. II.Streptomycin and allicin. *Antibiot Chemother.*, 1953, **5**: 24-27.

GUPTA N., PORTER T.D. Garlic and garlic-derived compounds inhibit Human Squalene Monooxygenase J. Nutr., 2001, 131,6,1662-1667

HAN. J, LAXSON. L, HAN. G, HAN. P. A spectrophotometric method for quantitative determination of alliciin and total garlic thiosulfinates. Analytical biochemistry 1995, 225, 157-160.

HUNTER. R, CAIRA. M, STELLENBOOM. N. Thiolsulfinate Allicin from Garlic Inspiration for a New Antimicrobial Agent. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005, 1056: 234–241.

IBERL. B., WINKLER. G., MÜLLER. K., KNOBLOCH. K, Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC, Planta Med. 1990, 56, 320–326.

JANSEN. H., MÜLLER. B., KNOBLOCH. K. Allicin Characterization and its Determination by HPLC, Planta Med. 1987, 53, 559–562.

JENKINS DJ.A., WOLEVER T.M.S, VIDGEN E. Effect of Psyllium in hypercholesterolemia at two monounsaturated fatty acid intakes Am. J. Clin. Nutr., 1997, 65,1524-1533

KAMAGATE ,KONE D., COULIBALY N.T., BROU E., SIXOU M. Étude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies strictes de la flore sous-gingivale, 1994.

KASUGA. S., UDA. N., KYO. E. Pharmacologie activities of Aged Garlic Extract in comparison with other Garlic Preparations J. Nutr., 2001, 131, 3S, 1080S-1084S

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

KOHMAN, E. F., (1947) *Science*, 106, 625.

KYUNG-HO.M , JAE-GYUN. K , WEIGUO. Z , DIXIT. A, LEE. G, KIMA. H. H, CHUNG. H.L. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (Allium sativum L.). Scientia Horticulturae, 2009, 122, 355–361.

LAU. B.H. Suppression of LDL oxidation by garlic. J Nutr 2001.131, 985-988.

Larousse, encyclopédie des plantes médicinales 1996

LATA S., SAXENA K.K., BHASIN V. Beneficial effects of *Allium sativum, Allium cepa* and *Commiphora mukul* on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis : a comparative evaluation

LAWSON. L.D, WANG. Z.J, HUGHES. B.G. HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates, Planta Med. 1991, 57, 363–370.

LAWSON, L., WANG, Z-Y. J., HUGHES, B. G. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. in: Koch H.P, Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum L 1990, 56, 363.

LEE, S -J., UNAMO, K., SHIBAMOTO, T. LEE, K-G. Identification of volatile components in basil (Ocimum basilicium L.) and thyme leaves (Thymus vulgaris L.) and their antioxidant properties. Food Chemistry, 2005, 91, 131- 137

LECLERC. H. Précis de phytothérapie: essai de thérapeutique par les plantes françaises Paris: Masson, 1976.- 363 p.

LIU. L, YEH. Y.Y. S-alk(en)yl cysteines of garlic inhibit cholesterol synthesis by deactivating HMG-CoA reductase in cultured rat hepatocytes. J Nutr. 2002, 132, 1129–34.

MARLET. F The active fraction of psyllium seed husk Proc. Nutr. Soc., 2003, 62, 1, 207-209

MATSUURA H. Saponins in Garlic as modifiers of the risk cardiovascular disease J. Nutr., 2001, 131, 3S, 1000S-1005S

MAYEUX, P. R., AGRAWAL, K. C., TOU, J-S, H. (1988) *Agents and Actions*, 25, 182-190.

MEYER. W. Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils Perfumer & flavorist 1984, 9, 93 – 104.

MIETHING, H. (1985) *Dtsch. Apoth,. Ztg*., 125, 2049-2050.

MORTIER F. PREPARATION DES EXTRAITS DESTINES A L'EVALUATION PHARMACOLOGIQUE 1990**.** Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université de Nancy I, France.

NIKOLIC. V, STANKOVIC. M, NIKOLIC. L.J, CVETKOVIC. D. Allylthiosulfinate: beta-cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization and microbiological activity,Pharmazie. 2004, 59, 10–14.

OBATA K., IKEDA K., YAMASAKI M. Dietary fiber, Psyllium, attenuates salt-accelerated hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats J. Hypertens., 1998, 1959-1964

PABLO. I, GRACIA. I, GOMEZ. L, GARCI. A, BOIXEDA. A. Thermal Degradation of Allicin in Garlic Extracts and Its Implication on the Inhibition of the in-Vitro Growth of Helicobacter pylori. Biotechnol. Prog. 2004, 20, 32−37

PARIS.R, MOYSE.H. Précis de Matière Médicale - 2e ed. rev. Paris: Masson, 1981

PEYRON. L., RICHARD. H. L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types 'extraits. Epices et aromates. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., 1992, Paris

PLATENIUS, H. (1935) *J. Agric. Res*., 51, 847.

RAMESH. M., SHAHRBANOO. O., ALI. H., ALIREZA. G., ABBAS. J. Cytotoxic Effects of Essential Oils of Some Iranian *Citrus* Pee Iranian J Pharmaceutical Res. 2005, 3, 183.

REVERCHON. E., DONSI G., OSSEO. L. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products.,J. Supercrit. Fluids, 1997, 10, 1-37.

REZZOUG S.A., BOUTEKEDJIRET C. ALLAF K. . Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. , 2005, Sous presse

ROSS. Z.M, O'GARA. E.A, HILL. D.J, SLEIGHTHOLME. H. V. Antimicrobial Properties of Garlic Oil against Human Enteric Bacteria: Evaluation of Methodologies and Comparisons with Garlic Oil Sulfides and Garlic Powder applied and environmental microbiology, Jan. 2001, p. 475–480.

SAGHIR, A. R., MANN, L. K, (1964) *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 84, 386.

SARKER. P.K, RAHMAN. M.M, DAS. B.C. Effect of intercropping of mustard with onion and garlic on aphid population and yield. 2007, J. bio-sci. 15: 35-40.

SCHAUENBERG. P. Guide des plantes médicinales Paris: Delachaux et Niestlé, 1977.- 396 p.

SHAFIUR. M, HUMOUD. Q, BENGTSSON. G. DRYING KINETICS AND ALLICIN POTENTIAL IN GARLIC SLICES DURING DIFFERENT METHODS OF DRYING. BIOLOGICAL SYSTEMS ENGINEERING. 2010 25 798-813.

SIMANDI, B., SASS-KISS, A., CZUKOR, B., DEAK, A., PRECHL, A., CSORDAS, A., SAWINSKY, J., Pilotscale Extraction and Fractional Separation of Onion Oleoresin Using Supercritical Carbon Dioxide, Journal of Food Engineering, , 2000, 46, 183.

SINGH D.K,PORTER T.D. Inhibition of sterol 4 alpha methyloxidase is the principal mechanism by which garlic decreases cholesterol synthesis. J Nutr 2006,136:759S-764.

SRINIVASAN. D., SANGEETHA . S., LAKSHMANAPERUMALSAMY. P. In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature . Electronic Journal of Biology, 2009, Vol. 5(1): 5-10

STASHENKO EE, MARTINEZ R, PINZDN MH, RAMFREZ J. Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated orange oil (Citrus sinensis). J. Chromatogr A, 1996. 752: 217-222.

STOLL, A., SEEBECK, E. Chemical investigations of alliin, the specific principle of garlic (1949) *Helv. Chim. Acta*, 32, 197.

TAIRA : toujours d'actualité: l'Ail Monit. Pharm. Lab., 1991, 1942,23-24

THOMPSON COON R.s., ERNST E. Herbs for serum cholesterol reduction : a systematic review l Fam. Pract., 2003, 52, 6

TURLEY S.D., DIETSCHY M. Mechanisms ofLDL-cholesterol-lowering action ofpsyllium hydrophillic mucilloid in the hamster Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1255, 177-184

TYNECA Z., SYCZESNIAK Z., GELOWNIAK. The effect of various environmental conditions on the antimicrobial activity of Allium ursinum. *Planta Med*., 1993 **59**: (Supplement Issue) A701.

UEDA, Y., KAWAJIRI, H., MIYAMURA, N., MIYAJIMA, R. Content of some sulfur containing components and free amino acids in various strains of garlic. Nippon Shokukin Kogyo Gokashi , 1991, 38, 429–434.

VALNET. J. Aromathérapie - Traitement des maladies par les essences de plantes Paris: Maloine, 1974.- 418 p.

VALNET. J. Traitement des maladies par les légumes, les fruits, les céréales Paris: Maloine, 1982.- 525 p.

VEGA-LOPEZ S., FREAKE H.C., FERNANDEZ M.L. Sex and hormonal status modulate the effects ofPsyllium on plasma lipids and monocyte gene expression in Humans J. Nutr., 2003, 133,67-70

VELISEK, J., KUBEC, R., DAVIDEK, J. Chemical composition and classification of culinary and pharmaceutical garlic-based products. Z. Lebensem Unters Forsch. A. 1997, 204, 161–164

VERNIN, G., METZGER. J., FRAISSE, D., SCHARFF, C. 1986 *Planta Med*., 96-101.

WANG Z., DING L., LI T., ZHOU X., WANG L., ZHANG H., LIU L., LI Y. Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum L*. and *Zanthoxylum bungeannum* Maxim. Journal of Chromatography A, 2006, 1102: 11–17.

WICHTL.M, ANTON. R. Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique - 2ème édition Paris: Ed. Tee & doc-Lavoisier; Cachan: Ed. médicales internationales, 2003.- 692p.

YEH Y.Y, LIU L. Cholesterol-lowering effect of Garlic Extracts and Organosulfur compounds : Human and Animal Studies 1. Nutr., 2001, 131, 3S, 989S-993.

Site Internet :

LEFRANCOIS, Pierre et RUBY, Françoise (page consultée le 5 avril 2010). Guggul,
[En ligne]. Adresse URL :
http://www.reseauproteus.net/fr/solutions/plantessupplements/fiche.aspx?doc=guggu

PROTEUS, Ail (page consultée le 5 avril 2010). Psyllium, [En ligne]. Adresse URL:
http://www.reseauproteus.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Fiche.aspx?doc=ail_ ps

ANNEXES

Annexe I

Etude chromatographique

Influence du rapport phase aqueuse phase organique

Chromatogramme I : V(H_2o) = 20ml V(D.E.E) = 200ml (solvants d'extractions)

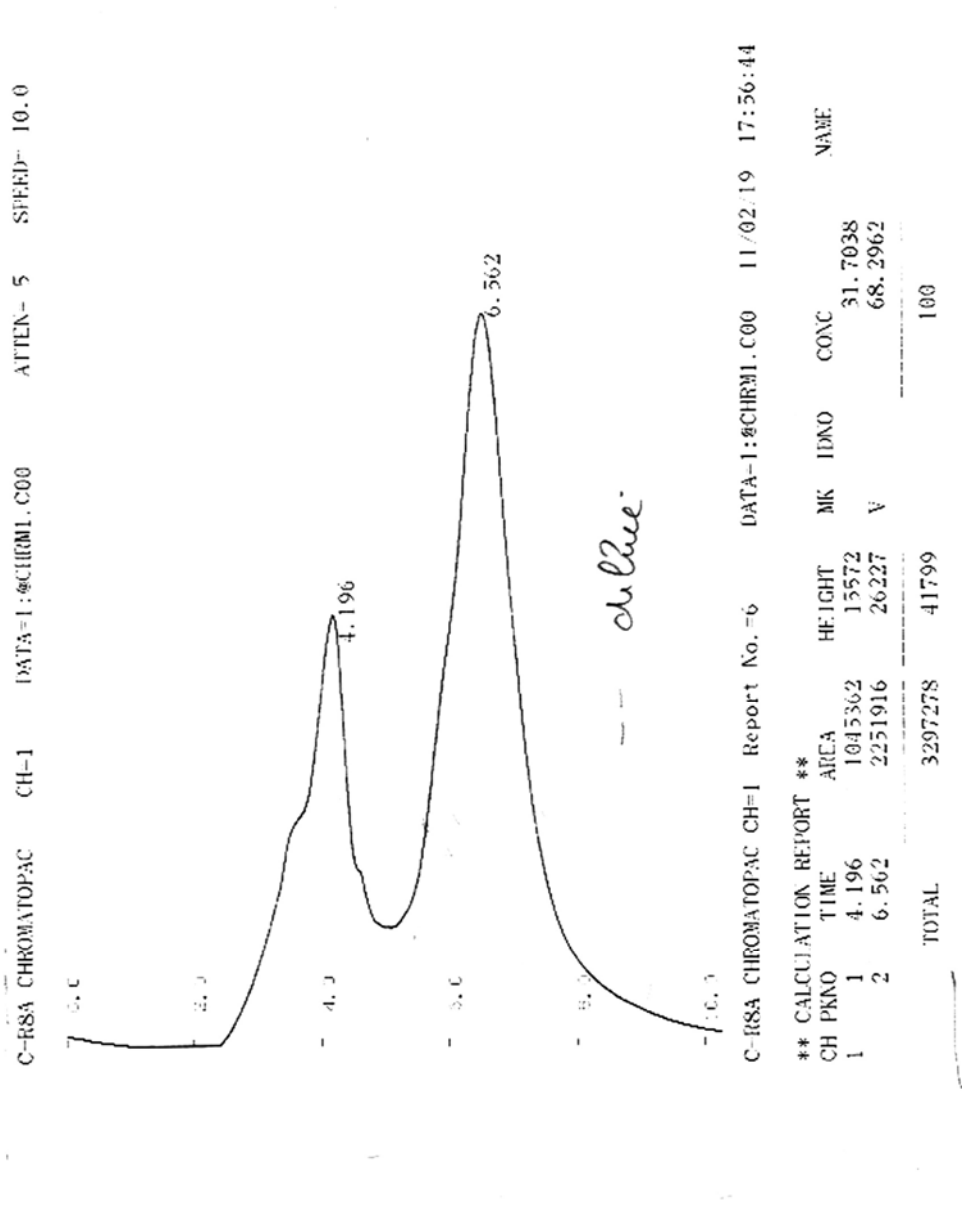


Figure A1.1 : Chromatogramme montrant l'Influence du rapport phase aqueuse phase organique

Chromatogramme II : V(H_2o) = 20m V(D.E.E) =100ml (solvants d'extractions)

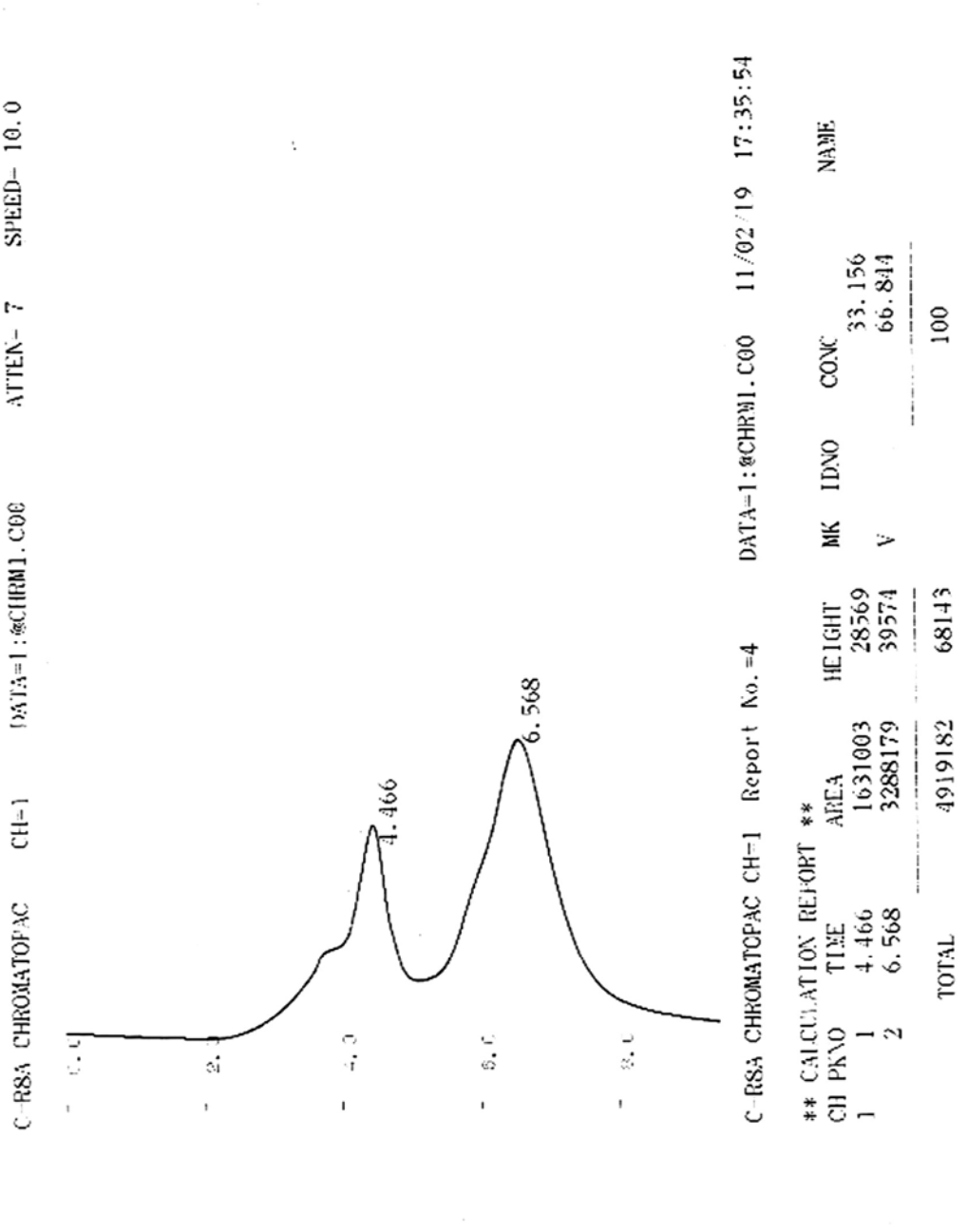


Figure A1.2 : Chromatogramme montrant l'Influence du rapport phase aqueuse phase organique (V_{DEE}=100ml)

Chromatogramme III : V(H_2o) = 20m **V(D.E.E) = 50ml** (solvants d'extractions)

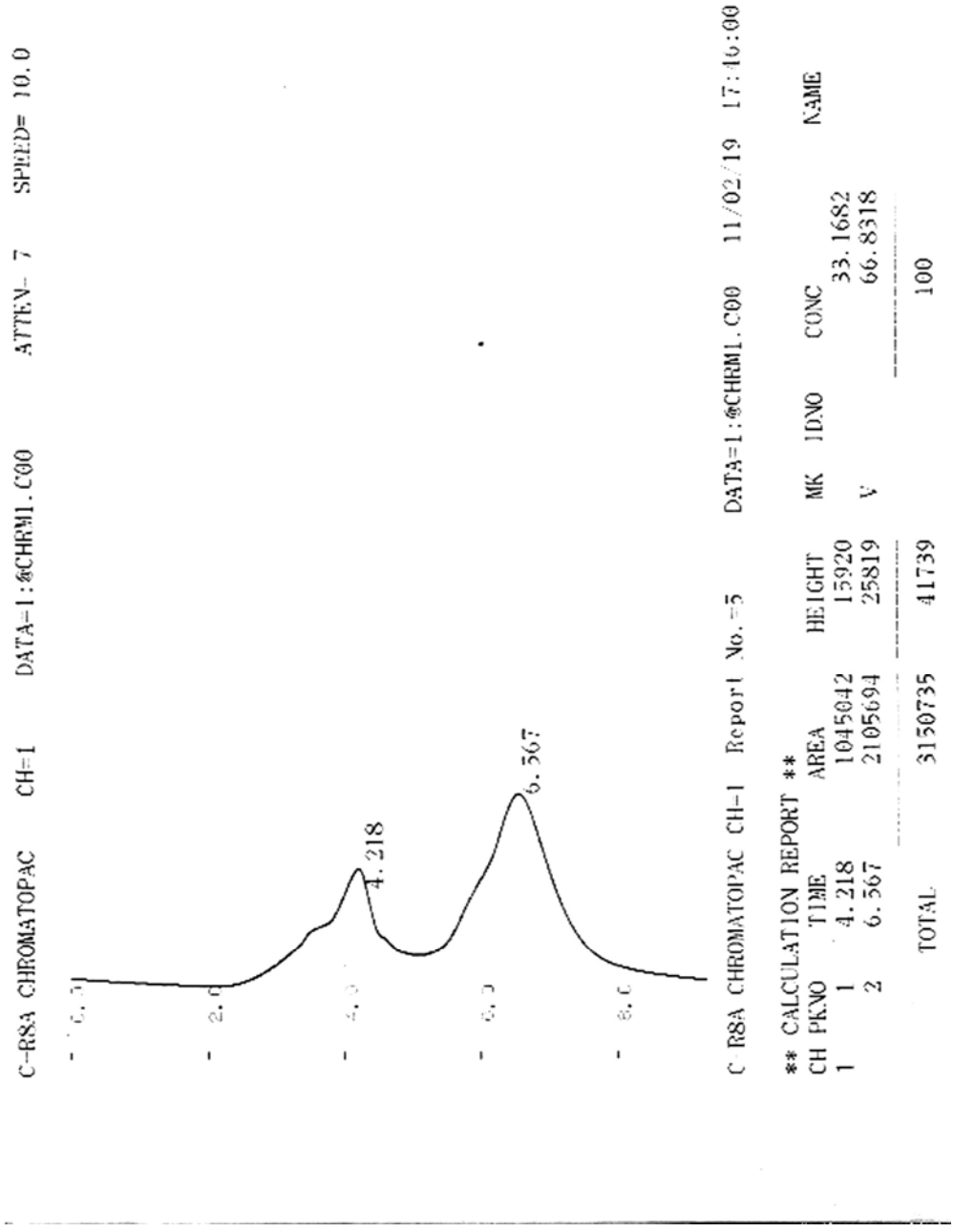


Figure A1.3 : Chromatogramme montrant l'Influence du rapport phase aqueuse phase organique (V_{DEE}=50ml)

Annexe 2

1. Etude de l'activité antibactérienne de l'allicine

S. aureus

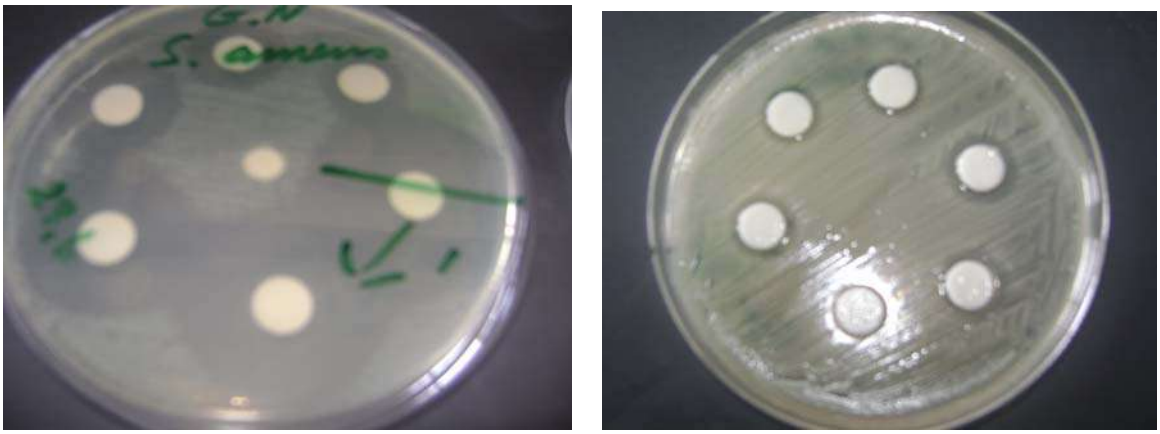


Figure A2.1 : Activité antibactérienne **(**ensemencement par écouvillonnage)

Tableau A2.1 : Valeurs des CMI (ensemencement par écouvillonnage)

Concentration en extrait (µg/ml)	Concentration en Allicine (µg/ml)	Diamètre d'inhibition (mm)	
		S. Aureus	*E. Coli*
123	98.4	∞	26.4
61.5	49.2	∞	19.0
30.75	24.6	32.6	17.4
15.38	12.3	26.4	15.4
07.69	06.15	22.4	12.4
03.85	03.08	15.8	11.2
01.93	01.54	13.4	---
00.97	00.77	12.8	---
00.49	00.39	11.2	---
00.25	00.19	10.9	---
00.13	00.098	10.2	---
00.065	00.049	---	---

Tableau A2.2 : Solvants utilisés pour l'étude comparative entre l'allicine et quelques antibiotiques)

	pH=6	pH=8
Constituants	**Quantités**	**Quantités**
Phosphate de potassium dibasique	2g	0.73g
Phosphate de potassiummonobasique	8g	0.53g
Eau distillée	1000ml	1000ml

2. Etude de l'activité Antifongique de l'allicine

Milieu de culture « **gélose sabauraud »** (pharmacopée europienne)

Tableau A2.3: Composition du milieu de culture gélose sabauraud
Formule en g/l d'eau distillée

Constituants	Quantités (g)
peptone	10
glucose	20
agar	20

Candidat albicans



Figure A2. : Activité antibactérienne **(**ensemencement par écouvillonnage)

Saccharomyces cerevisiae.



Figure A2.3 : Activité antibactérienne **(**ensemencement par écouvillonnage)

Tableau A2.4 : Valeurs des CMI (ensemencement par écouvillonnage)

Concentration en extrait (µg/ml)	Concentration en Allicine (µg/ml)	Diamétre d'inhibition (mm)	
		Candida albicans	*Saccharomyces cerevisiae*
123	98.4	∞	∞
61.5	49.2	∞	∞
30.75	24.6	∞	∞
15.38	12.3	∞	∞
07.69	06.15	∞	∞
03.85	03.08	∞	∞
01.93	01.54	23.4	∞
00.97	00.77	15.2	∞
00.49	00.39	11.4	∞
00.25	00.19	----	∞
00.13	00.098	----	∞
00.065	00.049	----	∞