RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Yahia FARES de MEDEA

FACULTE DE TECHNOLOGIE

DEPARTEMENT DU GENIE DES PROCEDES ET ENVIRONNEMENT



Thèse de Doctorat en Sciences

En : *Génie des Procédés*

Option : *Génie des Procédés*

Présentée par : Djamel ATSAMNIA

THEME

CONTRIBUTION A LA VALORISATION PHARMACOLOGIQUE DE L'AIL

Devant le jury composé de :

K. BENACHOUR	Prof, *Université Yahia Farés, Médéa*	Président
N. MENOUERI	Prof, *Université Saad Dahleb, Blida*	Examinateur
B. CHEKNANE	MCA, *Université Saad Dahleb, Blida*	Examinateur
S. HANINI	Prof, *Université Yahia Farés, Médéa*	Directeur de thèse

2017-2018

REMERCIEMENTS

J’adresse mes remerciements aux personnes qui m’ont aidé à la réalisation de cette thèse. En premier lieu, je souhaite remercier :

- Monsieur **Salah HANINI**, professeur en Génie des Procédés, mon directeur de thèse qui a accepté de diriger ce travail et pour le temps que vous m’avez accordé ;
- Madame **Karine BENACHOUR**, professeur en pathologie cellulaire qui m’a fait l’honneur de présider le jury. Veuillez trouver ici l’expression de ma sincère reconnaissance ;
- Professeur **Mustapha OUMOUNA**, Doyen de la faculté des sciences. Je vous remercie de m’avoir apporté vos connaissances pendant ces six années passées à travailler à vos côtés.

De même, je remercie très sincèrement le Professeur **Nabil MENOUERI** Directeur de l’institut de microbilogie de Blida et le Docteur **Benmamar CHEKNANE** enseignant à l’université Saad Dahleb de Blida pour avoir accepté d’être examinateurs de ce travail

Mes remerciements vont dès lors à mes amis les plus proches : Dr **Mabrouk HAMADACHE** pour son intérêt pour le sujet, ses précieux conseils, son soutien continu et sa sympathie, ainsi qu’au Dr **Othmane BENKORTBI** pour son encadrement, ses enseignements et ses remarques constructives.

Une mention spéciale est accordée à Monsieur **Dahmane OUKRIF,** chercheur au laboratoire de pathologie cellulaire de Londre, pour son soutien et sa patience, lui qui est présent dans les bons moments comme dans les mauvais. Mais rassures-toi, tu n’as pas fini de me supporter.

Par ailleurs, mes remerciements s'adressent à l'équipe du Laboratoire des Biomatériaux et Phénomènes de Transport (LBMTP) qui s'est montrée disponible à chacune de mes sollicitations et aussi pour son professionnalisme.

Je tiens à remercier le Professeur **Smail MEZIANI** Directeur de l'institut européen des antioxydants (Université de lauraine - Nancy) de m'avoir permis de réaliser les tests antioxydants au sein de son laboratoire.

Je remercie également le Professeur **Jérôme GUITTON**, directeur du laboratoire de toxicologie à l'hôpital Lyon sud. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Soyez assuré de mon profond respect et de ma vive reconnaissance.

A ma famille, principalement à mes parents qui ont cru en moi, qui m'ont aidé pendant toutes ces années et sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui. Je leur en suis extrêmement reconnaissant.

Ma reconnaissance va ensuite à l'ensemble des enseignants de la faculté des Sciences pour leur soutien, les conseils avisés et la bonne humeur.

Cette thèse a bénéficié de collaborations extérieures. Aussi, Je remercie le personnel de l'unité des produits antibiotiques SAIDAL de Médéa pour les quelques jours que j'y ai passé, et en particulier Madame Sonia KESKES la Directrice des laboratoires, ainsi que tout le personnel du service de Microbiologie.

J'inclus dans ces remerciements toutes les personnes que j'ai peut être oublié par inadvertance. Je les remercie pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je vous souhaite à tous une bonne lecture !

Pour finir, j'aimerai remercier mon épouse et mes enfants pour le soutien moral dont ils ont fait preuve tout au long de ce travail.

Sommaire

	Liste des abréviations……..	I
	Liste des figures……..	III
	Liste des tableaux…….	VI
	Introduction……	1
I.	**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**	5
I.1.	Etude ethnobotanique……..	6
I.1.1.	Présentation de L'ail…….	6
I.1.2.	Etude botanique de L'ail……..	7
I.1.2.1.	Description botanique……..	7
I.1.2.2.	Taxonomies et systématiques……..	8
I.1.2.3.	La liliacée……	8
I.1.2.4.	Différentes espèces……..	9
I.1.2.5.	Les différents types d'ail sélection des variétés disponibles	11
I.1.2.6.	Origine géographique……..	11
I.1.3.	Utilisations en médecine traditionnelle……	12
I.1.4.	Données phytochimiques de L'ail……	12
I.1.5.	Données pharmacologiques……..	13
I.1.6.	Les Produits de l'ail……..	13
I.1.6.1.	Ail déshydraté……..	14
I.1.6.2.	L'huile d'ail……..	14
I.1.6.3.	La poudre d'ail……	14
I.1.6.4.	Le macérât……	14
I.1.6.5.	L'extrait d'ail vieilli	15
I.2.	Etudes phytochimiques de l'extrait de l'ail……..	15
I.2.1.	Composés soufrés de l'ail……	15
I.2.2.	Les Thiosulfinates……	16
I.2.3.	Composés soufrés volatiles……..	16
I.2.4.	Les principaux composés soufrés de l'ail……	17
I.2.4.1.	L'alliine…….	17
I.2.4.2.	Allicine…….	17
I.2.4.3.	Le sulfure de diallyle……	17
I.2.4.4.	Le trisulfure de diallyl……..	17
I.2.4.5.	L'ajoène……	18
I.2.4.6.	La S-allyl cysteine……	18
I.2.4.7.	Le disulfure de diallyl……..	18

I.2.4.8. La thiacremonone……. 19

I.2.5. Les composés phénoliques……... 20
I.2.5.1. Les flavonoïdes…… 20

I.2.5.1.1. Les flavonoïdes au sens strict……... 21
I.2.5.1.2. Flavones et flavonols…… 21
I.2.5.1.3. Flavanones et flavanonols…… 22

I.2.5.1.4. Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols…….. 23
I.2.5.1.5. Anthocyanes……. 24
I.2.5.1.6. Chalcones et aurones…… 24
I.2.5.2. Acides phénoliques…….. 25
I.2.6. Les radicaux libres……... 26

I.2.6.1. Production des radicaux libres……. 26

I.2.6.2. Méthodes électrochimiques…….. 27

I.2.7. Mécanismes antioxydants des composés phénoliques……. 27

I.2.7.1. Transfert d'atome d'hydrogène…… 27
I.2.7.2. Transfert mono-électronique d'électron……... 27

I.2.7.3. La chélation des métaux de transition…….. 27

I.3. La pharmacologie de l'ail……. 28
I.3.1. Action de l'ail sur les radicaux libres……... 28
I.3.2. L'ail et le stress oxydatif……... 29

I.3.3. Activité antioxydante de l'ail…… 31
I.3.4. Effet pharmacologie de l'ail sur le cancer…… 32
I.3.5. Effet de l'ail sur le cholestérol…….. 33

I.3.6. Effet de l'ail sur la tension artérielle……. 34
I.3.7. Effet hypatoprotecteur de l'ail…….. 35
I.3.8. Effet Antidiabétique de l'ail……. 36
I.3.9. Effets antimicrobiens de l'ail 37
I.3.10. Mécanismes antioxydants associés à l'effet des composés organosulfurés de l'ail……... 37
I.3.11. Mécanismes Antioxydants des composés phénoliques de l'ail. ……. 39
I.4. La toxicologie de l'ail…….. 40

I.5. Application des réseaux de neurones en pharmacologie……. 42
I.5. 1. Réseaux de neurones…… 42
I.5.2. Les réseaux multicouches…… 44

I.5.3. Application des réseaux de neurones artificiels en Pharmacologie……. 44

II. **PROCEDURE EXPERIMENTALE** 47

II.1. Matériels et Méthodes…….. 48

II.1.1. Matière végétale …….. 48

II.1.2. Produits utilisés…… 48

II.1.3. Matériels microbiologiques…….. 49

II.1.4. Matériels …….. 49

II.2. Protocole expérimental…… 49
II.2.1. Préparation de l'extrait d'ail…… 49
II.2.2. Caractérisation de l'extrait d'ail…….. 51
II.2.2.1. Rendement des différents extraits d'ail……... 51
II.2.2.2. Méthodes d'analyses physicochimiques (spectroscopiques)…… 51
II.2.2.2.1 Spectroscopie UV-visible…… 51
II.2.2.2.2 Spectroscopie IR ……. 52
II.2.2.2.3 Analyse par chromatographie liquide à haute performance…… 52
II.3. Pouvoir antioxydant de l'ail…… 53
II.3.1. Préparation des échantillons d'ail…….. 53
II.3.2. Étude de la teneur en composés phénoliques et du potentiel antioxydant de l'ail…….. 54
II.3.2.1. Teneur totale en phénol…… 54
II.3.2.2. La Teneur totale en flavonoïdes…… 54
II.3.3. Evaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait d'ail…….. 56
II.3.3.1. Test de puissance de réduction de fer -Réduction Power (RP)……... 56
II.3.3.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) 58
II.3.3.3. Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS•+ ……..... 59
II.3.3.4. Préparation des échantillons d'acide ascorbique…….. 60
II.3.3.4.1 Activité anti radicalaire de la vitamine C …… 60
II.3.3.5. Capacité antioxydante en équivalent Trolox…… 61
II.3.3.5.1 Courbe d'étalonnage du Trolox…… 61
II.3.3.5.2 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity) par l'utilisation du $ABTS^{\bullet+}$ ou $DPPH^{\bullet+}$ ……... 61
II.4. Effets préventifs et curatifs de l'extrait d'ail sur l'hépatotoxicité médicamenteuse induite par le paracétamol…… 62
II.4.1 Préparation de l'extrait…….. 63
II.4.2 Matériel animal……... 63
II.4.3 Obtention de la dose toxique du paracétamol. …… 63
II.4.4 Évaluation de la fonction hépatique. ……... 64
II.5 Effet antidiabétique de l'ail…….. 65
II.5.1 Préparation de l'extrait de l'ail……. 65
II.5.2 Réactifs……. 65
II.5.3 Materiel Animal……... 65
II.5.4. Critères de sélection des Rats…….. 66
II.5.5. Induction du diabète……. 66
II.5.6. Test de correction de la glycémie…… 66

II.5.7. Analyse biochimique du sang. …… 67

II.5.8. Analyse des échantillons…….. 67

II.5.9. Analyses statistiques…… 68

II.6. Activité antibactérienne de l'ail……... 68
II.6.1. Préparation de la souche de référence…….. 68
II.6.2. Méthode microbiologique…… 69

II.6.3. Détermination de la CMI…… 69

II.6.4. Modélisation neuronale…… 70
III. **RESULTATS ET DISCUSSION** 72

III.1. Qualité de l'extrait obtenu avec differents solvants…… 73

III.1.2. Caractéristiques physicochimiques de l'extrait d'ail……... 74
III.1.2.1 Spectroscopie UV-Visible……... 74
III.1.2.2. Spectroscopie infrarouge…… 75

III.1.2.3. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) …… 76

III.1.3. Influence de la température sur les paramètres physicochimiques de l'extrait d'ail…….. 76
III.1.3.1. Stabilite thermique de l'allicine……... 77

III.2. Activité antioxydante de l'ail…… 79

III.2.1. Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes. …… 79

III.2.2. Identification chromatographique des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique de l'ail……... 82
III.2.3. Influence de la température sur la teneur en polyphénols…… 84
III.2.4. Influence de la température sur la teneur en Flavonoïdes……... 85
III.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante……... 86

III.2.5.1. Test d'évaluation de la puissance de réduction ferrique (RP) ……. 86
III.2.5.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH……... 88

III.2.5.3. Activité du Piégeage du radicale ABTS…….. 91

III.2.5.4. Capacité antioxydante en équivalent Trolox…… 92

A. Détermination de la courbe d'étalonnage du Trolox…… A

III.2.5.5. Corrélation entre les teneurs (polyphénols et flavonoïdes), les IC_{50} et le $RP_{0.5\ de}$ la capacité du piégeage des radicaux libres……. 94
III.2.5.6. Influence de la température sur l'activité antioxydante…….. 97
III.3. Effets préventifs et curatifs de l'extrait d'ail sur l'hépatotoxicité médicamenteuse induite par le paracétamol…… 100
III.3.1. Corrélation entre l'activité antioxydante et l'activité hèpatoprotectrice de l'extrait d'ail……. 104
III.3.2. Mécanisme antioxydant de l'ail sur l'hépatotoxicité médicamenteuse du foie... 106
III.4. Effet antidiabétique de l'ail…….. 107

III.4.1. Effet de l'alloxane sur le glucose dans le sérum des rats…….. 107
III.4.2. Effet de l'extrait d'ail sur le glucose sérique chez les rats diabétiques……. 107
III.4.3. Effet de la Metformine sur les taux de glycémie chez les rats diabétiques…….. 108
III.4.4. Effet de l'extrait d'ail sur le glucose sérique chez des rats témoins…….. 109
III.4.5. Mécanisme possible de l'action antidiabétique de l'ail…… 112
III.5. Activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'ail…….. 118
III.5.1. Effet de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail…… 119
III.5.2. Modélisation neuronale pour la prédiction de l'activité antibactérienne de l'ail 123
Conclusion……... 128

Liste des abréviations

ABTS	Acide 2, 2- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
$ABTS^{\bullet+}$	Radical 2,2 -azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Aged garlic extract
ANN	Artificial Neural Networks (Réseaux de neurones artificiels)
ANOVA	Analysis of variance
$ArO^{\bullet}$	Forme oxydée du Phénol
ArOH	Phénol
ATCC	American Type Culture Collection
BFGS	Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno
BP	Blood Pressure
CAT	Capacité antioxydante totale
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CoA	Coenzyme A
CRD	Centre national pour la recherche et le développement
D.E.E	Diéthyl ether
D.O	Densité optique
DADS	Diallyl disulfide
DAS	Diallyl sulfide
DL_{50}	Dose létale médiane
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil
$DPPH^{\bullet+}$	Radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil
DPPH-H	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil - forme réduite
DS	Diabète sucré
DATS	Diallyl trisulfide
EtOH	Ethanol
FTIR	Fourier Transform InfraRed
FT-Raman	Fourier Transform Raman
GAE	Gallic acid equivalent
GOT	Glutamate oxaloacétate transaminase
GPT	Glutamate-Pyruvate Transaminase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transférases
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HDL	High density lipoprotein
HEP G2	Hépatome humain
$HO^{\bullet}$	Radical hydroxyle
HOCl	L'acide hypochloreux
HPLC	High performance liquid chromatography
IC_{50}	Concentration inhibitrice médiane
IR	Infrarouge
KBr	Bromure de potassium
LDL	Lipoprotéines de basse densité
$LOO^{\bullet}$	Radical peroxylique
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MeOH	Méthanol
MLP	Multilayer perceptron (perceptron multicouche)
MS	Matière sèche
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NCI	National Cancer Institute
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrique synthase
$O_2^{\bullet-}$	Anion superoxyde
OMS	Organisation mondiale de la santé
$ONOO^-$	Radical peroxynitrite
PC	Poids corporel

pH	Le potentiel hydrogène
PI	Potentiel d'ionisation
PKB	Protéine kinase B
QE	Quercetin equivalent
R	Coefficient de corrélation
$R^{\bullet}$	Radical libre
R^2	Coefficient de détermination
RH	Forme réduite du radicale
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSE	Root-mean-square error
RNA	Réseau de neurones artificiels
ROS	Reactive oxygen species
RP	Reduction power
$RP_{0,5}$	Median reduction power
SAC	S-Allyle-Cystéine
SACS	S-allylcysteine sulfoxide
SAMC	S-Allyle-Mercaptocystéine
SBP	Systolic blood pressure
SEC	S-ethyl cysteine
SM	Spectroscopie de masse
SOD	Super Oxyde Dismutase
TC	Totale cholestérol
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TG	Triglycérides
UV-vis	Ultra violet-Visible

Liste des figures

Figure. I.1.	Les différentes caractéristiques de la plante	6
Figure. I.2	*Allium sativum*	7
Figure. I.3	Classification de l'espèce *Allium Sativum L*	9
Figure. I.4	Différentes espèces Allium sativum	10
Figure. I.5	Mécanisme simplifié de la formation d'allicine à partir d'alliine	13
Figure. I.6	Les principaux composés sulfurés de l'ail	16
Figure. I.7	Chemins de biosynthèse des principaux composés organosulfurés d'Allium sativum L.	19
Figure. I.8	Structure générale et numérotation standard d'un flavonoïde	20
Figure. I.9	Structure des différentes sous-classes de flavonoïdes au sens strict	21
Figure. I.10	Le stress oxydatif au sein des pathologies	30
Figure. I.11	Réduction du stress oxydatif par les composés dérivés de l'ail dans la gestion des maladies associées aux stresse oxydant	31
Figure. I.12	Mécanisme antioxydant associé à la S-allylcysteine (SAC)	38
Figure. I.13	Le mécanisme de réaction du catéchol comme antioxydant	39
Figure. I.14	Mécanisme de réaction du 2-aminophénol comme antioxydant	40
Figure. I.15	Mécanisme de réaction d'une hydroquinone comme antioxyd	40
Figure. I.16	Morphologie d'un neurone biologique	42
Figure. I.17	Modèle du neurone formel	43
Figure. I.18	Schéma d'un réseau multicouche	44
Figure. II.1	Variétés d'ail de la région de Médéa-Algérie (2013)	48
Figure. II.2	Différentes étapes de préparation de l'extrait d'ail	50
Figure. II.3	Etapes de dilution de l'extrait d'ail	53
Figure. II.4	Structure générale du noyau des flavonoïdes (Heim et al., 2002)	55
Figure. II.5	Protocole de détermination du pouvoir réducteur OKTAY *et al.*, (2003)	57
Figure. II.6	Schéma de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant	58
Figure. II.7	Solution méthanolique du DPPH	59
Figure. II.8	Structure du radical-cation ABTS	60
Figure. II.9	Mécanisme impliqué dans l'activation de l'ABTS dans des conditions pro-oxydantes et sous l'action anti-oxydante de Trolox	62
Figure. II.10	Molécule du paracétamol	63
Figure. II.11	Technique du prélèvement sanguin réalisé sur les rats	67
Figure. III.1	Influence de la nature du solvant et du rapport Solvant/Eau sur le rendement de l'extrait de l'ail obtenu.	74
Figure. III.2	Spectre IR de l'extrait d'ail	75
Figure. III.3	Chromatogramme de l'extrait d'ail éthanolique	76
Figure. III.4	Courbe de spectroscopie IR de l'extrait d'ail à différentes températures	77
Figure. III.5	Chromatogrammes montrant la variation de la quantité d'allicine en fonction de la température.	77
Figure. III.6	Cinétique de décomposition de l'allicine dans l'extrait Ethanolique d'ail, pour les températures : T=4°C, T=25°C, T=37°C, T=42°C, T=50°C et T=75°C	79
Figure. III.7	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	80
Figure. III.8	Courbe d'étalonnage de la quercétine	80
Figure. III.9	Chromatogrammes (HPLC) : (a) Quercitine ; (b) Acide gallique	83
Figure. III.10	Chromatogramme d'extrait méthanoïque d'ail	83
Figure. III.11	Concentration des polyphénols en mg EAG/g de MS de l'extrait méthanolique d'ail à différentes températures	84
Figure. III.12	Concentration des flavonoides en µg EQ/ml de l'extrait aqueux d'ail à différentes température	85
Figure. III.13	Système de réduction du complexe Fe3 + / ferricyanure à la forme ferreuse	86
Figure. III.14	Absorbance des différents extraits d'ail à différentes concentrations – Test de puissance réductrice du fer (RP)	87
Figure. III.15	Activité antioxydante de l'extrait d'ail méthanolique	89
Figure. III.16	Activité de piégeage du radical libre DPPH en fonction de la concentration des différents extraits étudiés	89
Figure. III.17	Activité du piégeage du radical libre ABTS en fonction de la concentration des différents extraits étudiés	91
Figure. III.18	Courbe d'étalonnage du Trolox : (a). inhibition $DPPH^{\cdot}$, (b).inhibition $ABTS^{\bullet+}$	92

Figure. III.19	Moyennes d'équivalent Trolox des extraits d'ail (DPPH•)	94
Figure. III.20	Moyennes d'équivalent Trolox des extraits d'ail (ABTS)	94
Figure. III.21	Corrélation entre les valeurs d'IC_{50} et RP_{50} en fonction des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes par rapport au : (a) DPPH IC_{50}, (b) ABTS IC_{50} et (c) RP_{50} du test puissance de réduction (RP).	95
Figure. III.22	Sites réactifs d'un flavonoïde dans l'activité antioxydante de l'ail	97
Figure. III.23	Activité antioxydante de l'extrait d'ail aqueux à différentes températures	97
Figure. III.24	Variation de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'ail à différentes températures (4°C, 25°C, 35°C, 50°C, 75°C, 100°C et 120°C)	98
Figure. III.25	Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot 1	101
Figure. III.26	Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot 2	101
Figure. III.27	Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot 3	102
Figure. III.28	Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot 4	102
Figure. III.29	Corrélation entre le Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin après traitement par extrait d'ail et : a. (GOT, GPT) traitement par quercitrine pur, b. (GOT, GPT) traitement par un extrait de polyphynols, c. (GOT, GPT) traitement par quercitrine et (GOT, GPT) traitement par un extrait de polyphénols	105
Figure. III.30	Rats diabétiques induits par l'alloxane. Chaque colonne représente la moyenne de six rats. I- Après 48 heures d'injection de l'alloxane monohydrate 98%, II- 72 heures Après la première injection ~~de~~ d'alloxane, III- Une semaine après l'injection d'alloxane, IV- Deux semaines après, V- Après trois semaines, VI- Quatre semaines après, VII- Cinq semaines après. Signification statistique vs. normal contrôle ($p < 0.001$).	107
Figure. III.31	Effet de l'administration orale d'extrait aqueux frais d'ail sur des rats diabétiques (alloxaniques) à des doses de 1,5 ml ou 0,75 g / kg pc. Chaque colonne représente la moyenne de six rats. I- Après 48 heures à partir de l'injection d'alloxane monohydraté à 98%, II- Après 24 heures de traitement, III- Une semaine de traitement, IV- Deux semaines de traitement, V- Trois semaines de traitement, VI- Une semaine sans traitement, VII- Deux semaines sans traitement, VIII - trois semaines d'interruption du traitement. Signification statistique vs. normal contrôle ($p < 0.01$).	108
Figure. III.32	Effet de l'administration orale de la Metformine (200 mg / kg) sur le glucose sérique chez les rats diabétiques. Chaque colonne représente la moyenne de six rats. I- 48 heures après l'injection d'alloxan monohydraté 98%, II- après 24 heures de traitement, III- Une semaine de traitement, IV- deux semaines de traitement, V- Une semaine sans traitement, VI- deux semaines sans traitement, VII - Trois semaines d'interruption du traitement, VIII-Quatre semaines d'interruption du traitement. Signification statistique vs. normal contrôle ($p < 0.05$).	109
Figure. III.33	L'effet de l'administration orale d'extrait d'ail à une dose de 1,5 ml ou (0,75 g / kg) sur le glucose sérique chez des rats normaux (non induite par l'alloxane). Chaque colonne représente la moyenne de six rats. I- 48 heures d'observation, II- après 24 heures de traitement, III- Une semaine de traitement, IV- deux semaines de traitement, V- trois semaines de traitement, VI- Semaine sans traitement, VII- Deux semaines d'interruption du traitement. Signification statistique vs. normal contrôle ($p > 0.05$	110
Figure. III.34	Aromatogrammes de l'activité antibactérienne (A) de l'extrait aqueux d'ail pour une concentration C=0.75g/ml ;(B) de l'extrait Methanolique d'ail; (C) de l'extrait Ethanolique d'ail ; (D) une solution d'alliine ; (E) une solution de quercitine ; (F) une solution de polyphenols	118
Figure. III.35	Zones d'inhibition pour *Escherichia coli* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé à différentes températures (8-100°C).	120
Figure. III.36	Zones d'inhibition pour *Bacillus subtilis* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé à différentes températures (8-100°C).	120
Figure. III.37	Zones d'inhibition pour *Staphyloccoucs aureus* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé à différentes températures (8-100°C)	120
Figure. III.38	Influence de la température (4°C, 25°C, 37°C, 42°C et 75°C) en fonction du temps sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail vis-à-vis de *E.Coli*	122
Figure. III.39	Influence de la température (4°C, 25°C, 37°C, 42°C et 75°C) en fonction du temps sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail vis-à-vis de *B.subtilis*	123
Figure. III.40	Influence de la température (4°C, 25°C, 37°C, 42°C et 75°C) en fonction du temps sur	123

l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail vis-à-vis de *S. Aureus*
Figure. III.41 Architecture du Modèle RNA utilisé dans la prédiction de la concentration minimale inhibitrice CMI de l'extrait d'ail vis-à-vis *E.coli*, *B.subtilis* et *S.aureus* 124
Figure. III.42 Corrélation entre les valeurs expérimentales et prédites des (CMI) pour le modèle ANN pour l'ensemble d'apprentissage, de test et de validation (N=30). (a) *E.coli* ($p<0.0001$), (b) *B.subtilus* ($p<0.0001$), (c) *S.aureus* ($p<0.0001$) 126

Liste des tableaux

Tableau. I.1	Les différents types d'ail et une sélection des variétés disponibles	11
Tableau. I.2	Structures chimiques des flavones et des flavon	22
Tableau. I.3	Structures chimiques des flavanones et flavanonols	23
Tableau. I.4	Structures chimiques des flavan-3-ols et flavan-3,4-diols	24
Tableau. I.5	Structures chimiques des anthocyanes	24
Tableau. I.6	Structures chimiques des chalcones et aurones	25
Tableau. I.7	Exemples d'acide phénolique	25
Tableau. I.8	Propriétés antioxydantes de l'ail	32
Tableau. I.9	Effet hypocholestérolémiant de l'ail chez l'homme	34
Tableau. I.10	Dose toxique (DL_{50}) de : l'allicine, DADS et SAC chez les souris	41
Tableau. II.1	Les produits chimiques utilisés pour l'extraction, l'analyse et pour l'étude pharmacologique de l'ail	48
Tableau. II.2	Produits utilisés lors des analyses microbiologiques	49
Tableau. II.3	Appareillages utilisés	49
Tableau. II.4	Conditions d'analyses par HPLC- Allicine - (SAIDAL Médéa)	52
Tableau. II.5	Conditions d'analyse par HPLC- Quercétine, acide gallique - (SAIDAL Médéa)	52
Tableau. II.6	Normes pour la glycémie, le cholestérol et les triglycérides chez les rats	66
Tableau. II.7	Répartition des réactifs dans les tubes	68
Tableau. III.1	Pourcentage d'Allicine dans l'extrait en fonction de la température et du temps de conservation (analyse HPLC)	78
Tableau. III.2	Teneur totale en phénol et en flavonoïde pour les extraits d'ail étudiés	81
Tableau. III.3	Valeurs du pouvoir antiradicalaire des Extrait d'ail et de l'acide ascorbique à 50% d'inhibition	90
Tableau. III.4	Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot des rats témoins (Lot1)	103
Tableau. III.5	Structures des principaux constituants de l'ail responsables de l'activité antidiabétique et antioxydante	115
Tableau. III.6	Diamètre des zones d'inhibitions obtenus par la méthode de diffusion sur gélose.	119
Tableau. III.7	Valeurs prédites et expérimentales pour *E.coli,B.subtilis et S.aureus* pour les trois types d'échantillonnage : Apprentissage, Test et Validation	125
Tableau. III.8	Performance du modèle MLP-ANN pour les trois souches bactériennes	127

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'ail (Allium sativum L. famille Liliaceae) est originaire d'Asie, mais il est également cultivé en Chine, en Afrique du Nord, en Europe et au Mexique. Il est bien connu en Algérie, et diverses parties de cette plante ont longtemps été utilisées dans les médicaments populaires traditionnels en Algérie et dans d'autres cultures.

L'ail (Allium sativum L.) a acquis une réputation dans différentes traditions comme une plante médicinale prophylactique et thérapeutique. L'ail a joué d'importants rôles diététiques et médicinaux tout au long de l'histoire. Certaines des premières références à cette plante médicinale ont été trouvées dans Avesta, une collection de saints écrits zoroastriens qui ont probablement été compilés au VIe siècle av. JC (Dannesteter, 2003). L'ail a également joué comme un médicament important pour les Sumériens et les anciens Egyptiens.

La médecine chinoise et indienne ancienne recommandait l'ail pour favoriser la respiration et la digestion et pour traiter la lèpre et l'infestation parasitaire (Rivlin, 2001). Dans la période médiévale, l'ail a également joué un rôle important dans le traitement de différentes maladies. Ibn Sina (980-1037 apr. J.-C), dans son célèbre livre, Al Qanoon Fil Tib, a recommandé l'ail comme composé utile dans le traitement de l'arthrite, du mal de dents, de la toux chronique, de la constipation, de l'infestation parasitaire, des piqûres de serpents et d'insectes, des maladies gynécologiques, ainsi que dans les maladies infectieuses (comme antibiotique). Avec le début de la Renaissance, une attention particulière a été accordée en Europe aux bénéfices pour la santé de l'ail. L'ail a attiré une attention particulière en médecine moderne en raison de la croyance généralisée sur ses effets dans le maintien d'une bonne santé. Dans certains pays occidentaux, la vente de préparations d'ail se classe avec celles des principaux médicaments d'ordonnance. Il existe des preuves épidémiologiques appréciables qui démontrent des rôles thérapeutiques et préventifs pour l'ail. Plusieurs études expérimentales et cliniques suggèrent de nombreux effets favorables de l'ail et de ses préparations. Ces effets ont été largement attribués à i) la réduction des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires, ii) la réduction du risque de cancer, iii) l'effet

antioxydant, iv) l'effet antimicrobien, et v) l'amélioration de la désintoxication et de l'hépato protection (Colín-González, 2012).

La principale caractéristique de la qualité des produits à base d'ail est la saveur distincte des clous d'ail écrasés, à la suite de réactions biochimiques complexes (Queiroz et al., 2014). Les principaux composés responsables de cette saveur sont principalement des acides aminés soufrés, non volatils (thiosulfinates), parmi lesquels l'alliine ou le sulfoxyde de S-allyl-cystéine (ACSO) qui est le précurseur d'arôme d'ail le plus prédominant (Siddiqui, 2016).

Cependant, hormis ses composés volatils, l'ail est également riche en vitamines (en particulier les vitamines du complexe B et de la vitamine C), les antioxydants, les flavonoïdes et les minéraux (en particulier P, K et Se) (Vasquez-Caicedo et al., 2006)

Plusieurs méthodes ont été développées pour déterminer la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits étudiés, car la séparation et l'analyse des antioxydants purs sont difficiles et moins pertinentes commercialement (Ou, et al., 2002 ; Sreeramulu, & Raghunath, 2010). La capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC), la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH et le pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) sont couramment utilisés pour évaluer l'activité antioxydante in vitro.

L'objectif de notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de l'ail par des recherches scientifiques, aussi bien pour une contribution à l'étude de la pharmacologie de cette plante médicinale. La démarche poursuivie dans la réalisation de cette thèse consiste dans un premier temps, au choix du solvant d'extraction qui nous permettra d'avoir l'extrait le plus riche et possédant le meilleur rendement d'extraction. Par la suite, une analyse qualitative et quantitative des différents composés chimiques susceptibles d'avoir une activité pharmacologique a été menée. Parmi ces composés, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ceux doués d'une activité antioxydante, à savoir les polyphenols et les composés thiosulfunates de l'ail. Suite à cela, comme second objectif, on se propose de suivre la stabilité de ces composés à différentes températures afin de déterminer les conditions optimales de conservation de ces principes actifs. Ce suivi sera effectué moyennant l'utilisation de

la chromatographie liquide à haute performance et en utilisant des étalons internes de références. Dans une troisième étape, il sera question d'évaluer successivement l'action antioxydante, hypatoprotectrice, antidiabétique et antibactérienne de l'ail et de confirmer les résultats auxquels ont abouti d'autres chercheurs. L'objectif général est de vérifier s'il y a une interdépendance entre l'activité antioxydante de l'ail et les différentes activités pharmacologiques étudiées.

Par ailleurs, un modèle ANN a été développé pour prédire les propriétés antibactériennes (concentration minimale inhibitrice) et mettre en place une approche pour analyser les valeurs prédites de la CMI et les valeurs obtenues à travers différentes expériences. Pour cela, nous avons opté pour un modèle avec trois sorties simultanées, *dinh E. coli, dinh S. aureus* et *dinh B. subtilis*.

Dans la première partie de ce manuscrit, consacrée à la revue bibliographique, nous traiterons une étude ethnobotanique de la plante étudiée, suivie par des études phytochimiques et pharmacologiques. Une présentation de l'ail, de ses composés, de leurs différentes actions thérapeutiques ainsi que des techniques analytiques et pharmacologiques utilisées.

La deuxième partie de cette thèse regroupe successivement la partie expérimentale de tous nos travaux, les résultats auxquels on a abouti ainsi qu'une discussion de ces résultats. 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.

I. Revue Bibliographique

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Etude ethnobotanique

I.1.1. Présentation de L'ail

L'ail, ou *Allium sativum L.*, est une plante monocotylédone, vivace, donnant des caïeux (gousses d'ail, bulbilles) appréciés dans le domaine culinaire pour leur goût et leur odeur caractéristiques. La partie souterraine se compose d'un bulbe pourvu de nombreuses radicelles fibreuses (Figure I.1). Le bulbe se prolonge à la surface en une tige entourée de feuilles engainantes, linéaires, planes et lisses, mesurant 1 à 2,5 cm de large et 30 à 60 cm de long. Les inflorescences sont des ombelles. De petites bulbilles sont produites dans les inflorescences. Les fleurs sont variables en nombre et parfois absentes. Rarement ouvertes, elles peuvent se défraîchir dans le bourgeon. Les fleurs sont installées au bout de pédicelles minces et se composent d'un périanthe de 6 pièces d'environ 4-6 mm de long, rosâtre ou blanc, en cloche ; de 6 étamines ; et d'un ovaire supère triloculaire. Le fruit est une petite capsule à déhiscence loculicide. Les graines sont rarement observées et jamais produites (Block, 2010).

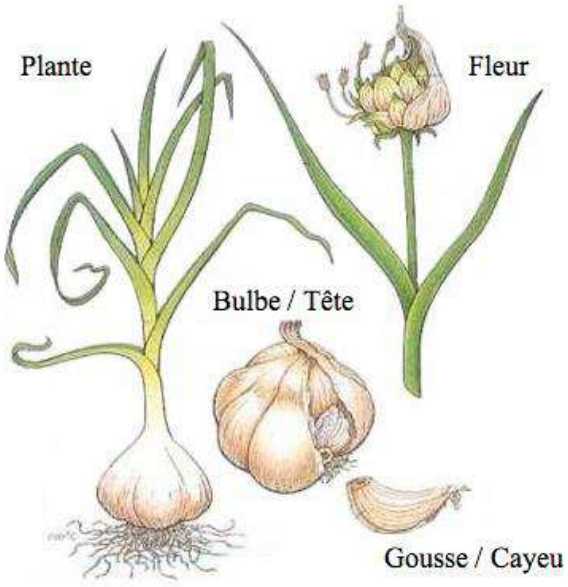


Figure I.1. Les différentes caractéristiques de la plante (Block, 2010).

I.1.2. Etude botanique de L'ail

I.1.2.1. Description botanique

La classification systématique de l'ail est exposée dans la figure I.2. Celle-ci fit récemment l'objet d'une modification toujours sujette à controverse, certains scientifiques classant le genre Allium (Figure I.3) dans la sous-famille des *Liliaceae*, voire des *Amaryllidaceae*, et non dans une famille à part entière, celle des *Alliaceae* (Lambinon et al., 2004).

L`ail est une plante vivace par son bulbe formé de caïeux, il ne dépasse pas une cinquantaine de centimètres de hauteur. Les fleurs blanches ou rosées en ombelle, sont renfermées avant la floraison dans une spathe membraneuse munie d`une pointe très longue, les feuilles allongées et plates



Figure I.2: *Allium sativum* (Block, 201).

L`ail est une plante herbacée à bulbe formé de 3 à 15 gousses appelées aussi caïeux, et qui sont en fait des bourgeons tubérisés par lesquels se fait la multiplication de la plante. L`ail cultivé se divise en deux sous-espèces connues sous le nom d`ail à tige dure (*ophioscorodon*) et ail à tige molle (*sativum*).

La première est résistante au froid et s`acclimate bien à une culture dans les régions plus nordiques. La seconde est mieux adaptée aux régions chaudes et ne produit pas de fleurs, sauf en conditions de stress.

Après la récolte, l'ail doit être guéri par séchage des gaines foliaires extérieures et des mouchoirs de la gousse. Ce processus est plus efficace dans les températures chaudes, l'humidité relative faible et les conditions d'écoulement d'air. En outre, ce processus est

essentiel pour maximiser la durée de vie après la récolte et la qualité du produit. La récolte d'ail se produit à différents stades de développement pour les marchés spéciaux, mais la plupart du produit est collecté lorsque les bulbes sont bien développés ; Cette condition est visualisée lorsque les sommets de la plante sont tombés et sont secs. Le concept de qualité pour l'ail est perçu comme ferme, propre, blanc (ou d'autres couleurs typiques de la variété) et des girofles bien durcies. Les composés soufrés sont les composés bioactifs produits de l'ail (Benkeblia, 2004, Benkeblia et Lanzotti, 2007). Les saveurs puissantes et inhabituelles de nombreuses formes d'ail et leurs applications médicales possibles ont attiré l'attention des physiologistes et chimistes des plantes.

I.1.2.2. Taxonomies et systématiques

Arthur Cronquist (1919, 1992) est un botaniste américain, qui propose un système qui fait encore référence aujourd'hui. La classification d'Arthur Cronquist de 1981 est une classification "intuitive" basée sur des critères de ressemblances morphologiques, anatomiques et chimique réunit dans des groupes communs les végétaux qui présentent entre eux un nombre plus ou moins élevé de ressemblances profondes.

I.1.2.3. La liliacée

Les Liliacées sont surtout des plantes à bulbes, mais parfois à rhizomes, de la famille Liliaceae**.** Les liliacées, des géophytes, sont largement distribuées à travers le monde, principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. On y trouve des plantes très connues en jardinage floral comme les lys, les muguets, les jacinthes, les tulipes, les narcisses et jonquilles, ou encore la colchique. Les plantes de cette famille ont évolué avec une bonne dose de diversité morphologique malgré la similarité génétique.

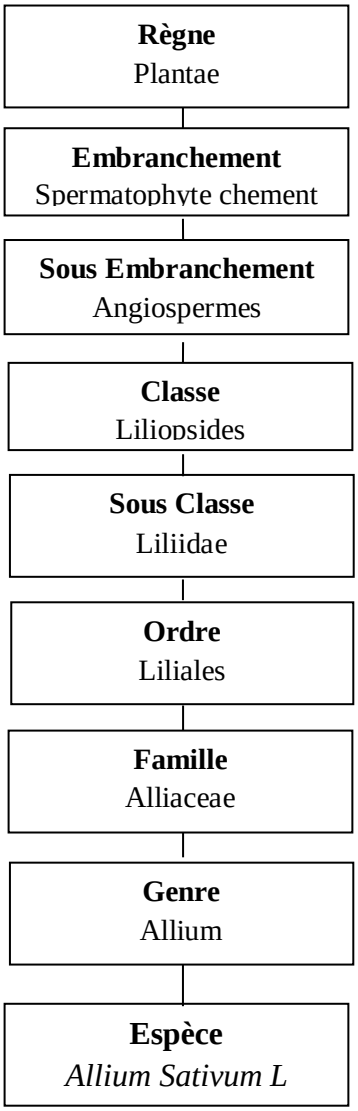


Figure I.3. Classification de l'espèce *Allium Sativum L* (lambino et al ; 2004).

I.1.2.4. Différentes espèces

Le genre Allium est le plus répandu, avec 600-900 espèces. Il existe différentes variétés de l'ail, Allium sativum qui se diffère par la taille, la forme du bulbe, ou encore par la couleur de l'enveloppe (Goetz et Ghédira, 2012). Quelques exemples d'espèces ornementales du genre Allium sont illustrées sur la figure I.4 : (Krzymińska et al., 2008).



Figure I.4: Différentes espèces Allium sativum, (Goetz et Ghédira, 2012).

I.1.2.5. Les différents types d'ail et sélection des variétés disponibles

Les variétés d'automne ail blanc, ail violet se mettent en terre entre octobre et décembre/janvier, les variétés de printemps ail rose entre janvier et mars, l'ail rose dit alternatif, ou ail à bâton, pouvant se planter fin d'automne ou tout début de printemps (Tableau I.1).

Tableau. I.1. Les différents types d'ail et une sélection des variétés disponibles

Variétés	Aspect du bulbe	Couleur des caïeux	Dormance	Meilleur période de plantation	Récolte
Ail blanc d'automne	Gros et irrégulier	Ivoire	Faible	Début octobre - mi décembre	Demi mai (en vert), mi-juin à mi-juillet (sec)
Ail violet d'automne	Gros et irrégulier	Violette	Faible	Début octobre - mi décembre	Début juin à mi-juillet (en sec)
Ail rose a bâton (hampe floral rigide)	Moyen très structuré	Rose pale Au rouge vineux	Elevée	Début décembre - fin février	juillet
Ail rose sans bâton	Moyen et régulier	Blanc rosé	Elevée	Début janvier - fin Mars	Demi-juillet à mi-août

I.1.2.6. Origine géographique

L`ail provient à l`origine d`Asie centrale. Il y a environ 10 000 ans, il s`est répandu progressivement, en Arabie, en Égypte et dans le Bassin méditerranéen, transporté par les marchands au gré des routes commerciales. Ce bulbe est sans doute l`un des légumes les plus anciennement cultivés par l`homme qui l`utilisait autant pour son alimentation que pour sa santé.

Un lointain ancêtre, *Allium longicuspis*, croît encore dans les steppes sauvages en Afghanistan et en Iran. L`ail des bois ou trilobé, *Allium tricoccum*, une espèce indigène en Amérique du Nord, pousse en colonies dans les érablières et les sous-bois. À la suite d`une récolte commerciale intensive, il est devenu de plus en plus rare. Au Québec, il bénéficie d`une protection juridique, à titre d`espèce vulnérable. Du côté de l`Europe et de l`Asie, l`ail des ours, *Allium ursinum*, se rencontre aussi à l`état sauvage. Cependant, l`ail cultivé, *Allium sativum*, ne dérive pas directement des espèces sauvages, mais plutôt d`une très lente évolution génétique issue d`un travail de

sélection par l`homme. Son nom viendrait du mot celtique "all" qui signifie chaud, brûlant.

I.1.3. Utilisations en médecine traditionnelle

En médecine traditionnelle, l'ail est utilisé pour renforcer le système immunitaire, éliminer les vers intestinaux, soigner les maladies bronchiques, la grippe, le rhume et l'otite, ainsi que les troubles digestifs et les infections urinaires**.** Avant l'invention des antibiotiques, une gousse d'ail suffisait pour traiter des maladies comme la typhoïde et la tuberculose grâce à la présence d'alliine dans sa composition.

De nos jours, cette plante médicinale est recommandée pour décupler les actions des antibiotiques chimiques et limiter leurs effets secondaires**.** Lors de la première Guerre Mondiale, cette médication naturelle a été fortement utilisée pour panser les blessures et augmenter l'efficacité des médicaments utilisés**.**

Des études scientifiques (Yeh & Liu, 2001) ont également prouvé l'efficacité de l'ail à abaisser le taux du mauvais cholestérol dans le sang, à diminuer la tension artérielle élevée et à réduire la glycémie**.** Grâce à cette dernière propriété, cette plante potagère peut aider énormément les sujets souffrant de diabète de type 2.

I.1.4. Données phytochimiques de l'ail

De nombreux chercheurs ont étudié la nature des composés volatils dans l'ail, dont on sait qu'ils possèdent de nombreuses activités bénéfiques pour la santé humaine. L'importance des thiosulfinates dans la saveur des distillats d'ail a été connue depuis les études de Cavallito et Bailey en 1950. Cavallito et Bailey ont découvert la thiosulfinate diallytique (allicine) comme responsable de la saveur d'ail frais, et Stoll et Seebeck (1951) a élucidé sa biochimie. La saveur caractéristique, l'arôme et les principes actifs de l'ail sont présents uniquement après rupture des membranes cellulaires, ce qui permet à l'enzyme alliinase de dégrader le sulfate de S (+) -allyl-l-cysteine (alliine), produisant de l'allicine et d'autres composés contenant du soufre. Un schéma simplifié de formation d'allicine à l'ail est illustré à la figure I.5. Bloc et O'Connor, en 1974, résume la chimie complexe des alkyl thiosulfinates et Block et

al.1992, a proposé une méthode HPLC (High Performance Liquid Chromatography), appropriée pour la quantification du thiosulfinate d'alkyle dans l'ail ainsi que dans d'autres Liliaceae.

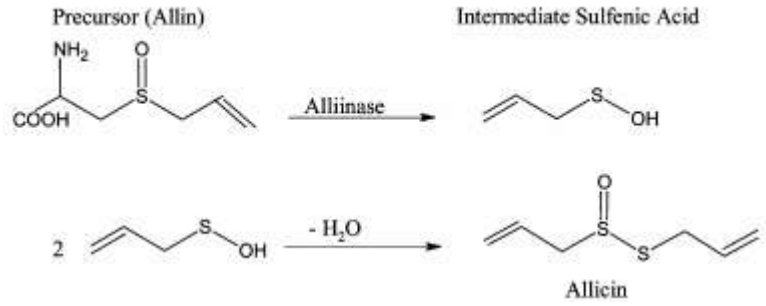


Figure I.5. Mécanisme simplifié de la formation d'allicine à partir d'alliine.

I.1.5. Données pharmacologiques

Même aujourd'hui, l'utilisation médicale de l'ail est répandue et croissante. Les études cliniques et précliniques ont montré une relation étroite entre les habitudes alimentaires, y compris l'apport en ail et l'apparition des maladies. De plus, l'ail a été largement étudié pour les bénéfices pour la santé, ce qui a entraîné plus de 1000 publications au cours de la dernière décennie. Il est considéré comme l'un des meilleurs aliments préventifs pour la maladie, en fonction de ses effets potentiels et variés (Amagase, 2006). Un large éventail d'effets thérapeutiques, tels que l'hypolipidémie, l'anti-athérosclérose, l'hypoglycémie, l'anticoagulant, l'antihypertenseur, l'antimicrobien, l'antidote (pour l'empoisonnement des métaux lourds) et l'hépatoprotection, ont été rapportés (Agarwal, 1996 ; Rivlin, 2001). En outre, il empêche les symptômes du rhume et de la grippe par l'amélioration immunitaire et présente des activités anticancéreuses et chimio préventives (Agarwal, 1996 ; Amagase, 2006 ; Banerjee, 2003 ; Thomson & Ali, 2003).

I.1.6. Les Produits de l'ail

Les produits à l'ail sont généralement disponibles sous forme d'huiles volatiles, de jus, d'extraits sous forme liquide et séchée et sous forme de macérés pour l'utilisation dans les produits pharmaceutiques.

I.1.6.1. Ail déshydraté

Généralement, les variétés blanches et jaunes ayant une forte pungence et des teneurs élevées en matières solides sont utilisées pour la déshydratation. Les racines sont lavées et la partie contaminée des ampoules est éliminée. L'ail est tranché et haché et soumis à une déshydratation dans des tunnels à air chaud. Pour éliminer la charge microbienne, un processus de décontamination supplémentaire est requis. Enfin, les gousses d'ail déshydratées vont être broyées, pulvérulentes ou granulées et stockées.

I.1.6.2. L'huile d'ail

L'huile d'ail est un produit obtenu par distillation à la vapeur de la matière première hachée. Il comprend 0,1-0,2% d'huile essentielle à base de coupe fraîche. La puissance de saveur est égale à celle de 900 mg d'ail frais / 200 g de poudre déshydratée. Il a une saveur piquante très forte, donc il ne peut pas être utilisé directement ; il doit être dilué dans de l'huile végétale ou utilisé sous forme encapsulée.

I.1.6.3. La poudre d'ail :

La poudre d'ail déshydratée est généralement utilisée comme condiment dans les aliments. Les gousses d'ail doivent être pulvérisées, broyées, séchées pour en extraire la poudre. Le principal composé contenu dans la poudre d'ail et dans l'ail frais est l'alliine. Elle contient certains constituants similaires à ceux de l'ail cru, même si les concentrations peuvent varier considérablement. De plus, l'inactivation de l'alliinase se fait lorsque le pH est inférieur à 3 (Amagase et al., 2001). Il est totalement décomposé à 20°c en 20 heures (Fischer, 1995).

I.1.6.4. Le macérât

L'extrait d'huile d'ail est également utilisé comme condiment. Le macérât d'huile est fait de mélanges de gousses d'ail entièrement broyées encapsulées dans l'huile végétale. Pendant le processus de fabrication, l'alliine peut être convertie en allicine. Comme l'allicine est instable, il se décompose rapidement, le macérât contient principalement des composés tels que les vinyl dithiines et les ajoènes (Amagase et al., 2001).

I.1.6.5. L'extrait d'ail vieilli

Une solution d'extraction composée d'eau distillée et diluée dans 15-20% d'éthanol doit être utilisée pour extraire l'ail dit vieilli (Amagase et al., 2001). Cet extrait doit être âgé d'au moins 10 mois à température ambiante (Ide and Lau, 2001). Ce stockage conduit à une altération de la composition de l'ail (Qidwai and Ashfaq, 2013). Pendant ce processus, l'odeur, les composés irritants sont convertis en composés soufrés stables et sûrs. Les composés d'Ail vieilli sont des composés solubles dans l'eau et une petite quantité de composés est soluble dans l'huile. Les composés solubles dans l'eau sont S-Allyle-Cystéine (SAC) et S-Allyle-Mercaptocystéine (SAMC), avec une perte importante de l'activité de l'allicine (Amagase et al., 2001). L'extrait d'ail vieilli est très utilisé. Principalement la SAC qui est le premier composé organosoufré soluble dans l'eau, celui –ci peut être détecté dans le sang, le rein et le foie. Il est sans odeur et possède une très bonne stabilité et de nombreux effets bénéfiques pour la santé (Suleria et al., 2015), contrairement à l'allicine qui ne se retrouve pas dans le sang. Les ajoènes et les vinyldithiines sont absents dans l'extrait d'ail vieilli (Amagase et al., 2001).

I.2. Etudes phytochimiques de l'extrait de l'ail

L'ail à une importance remarquable dans la pharmacologie des plantes médicinales.

Les principaux composés de l'ail se divisent en deux groupes : les composés soufrés et les composés phénoliques.

I.2.1. Composés soufrés de l'ail

Le contenu des composés organosulfurés dans les bulbes d'ail change pendant la culture et le stockage (Queiroz et al., 2014). Ses activités biologiques dépendent de nombreux facteurs, y compris le pays d'origine et les diverses méthodes de traitement de nouveaux composés organosulfurés. Par conséquent, le développement de nouvelles méthodes de détermination des composés organosulfurés dans l'ail est apparemment d'une grande importance pour évaluer la qualité biologique de l'ail. Les composés soufrés de l'ail sont classés en deux catégories les Thiosulfinates et les composés soufrés volatiles.

I.2.2. Les Thiosulfinates

La formation des thiosulfinates telles que l'allicine, se fait par l'action des enzymes (Tan et al., 2013). D'autres thiosulfinates présents dans l'ail sont le méthyl-méthyl allyle et trans-1 propényl-thiosulfinate d'allyle ces thiosulfinates est de nature instable (Ramirez et al., 2016).

I.2.3. Composés soufrés volatiles

Le disulfure de diallyse (DADS), le sulfure de diallyle (DAS), le trisulfure de diallyle (DTS) et le dioxyde de soufre sont formés par la décomposition de l'allicine (Figure I.6). Les principaux composés volatiles identifiés à partir de l'ail désorganisé et de l'huile essentielle d'ail sont : DAS, DADS, DATS, le disulfure de méthyl allyle, les vinyl-allyl trisulfures et les ajoenes. Les composés de sulfure majeurs de l'huile d'ail sont DAS (5%), allyl (37%), diméthyle (6%), mono-hexasulfures et une petite quantité de di-tri- et les tétra sulfures (Amagase, 2006 ; Canizares et al., 2004).

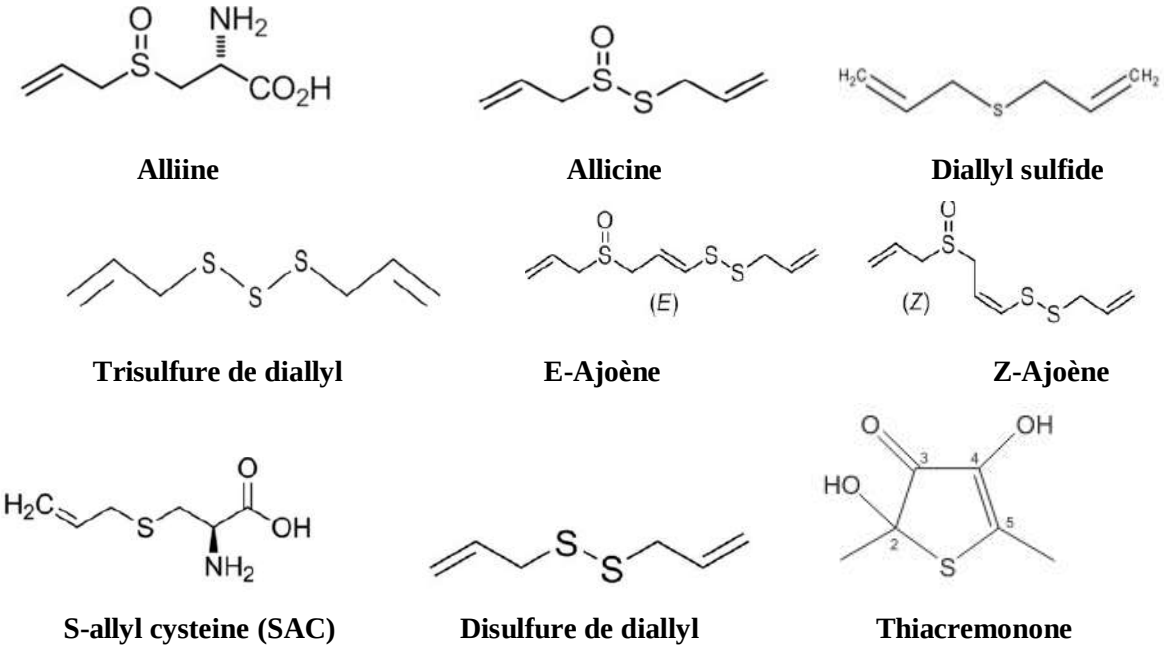


Figure I.6. Les principaux composés sulfurés de l'ail.

I.2.4. Les principaux composés soufrés de l'ail

I.2.4.1. L'alliine

L'alliine est le composé organosulfuré le plus abondant dans l'ail non écrasé. C'est un dérivé de l'acide aminé cysteine (Figure I.6). ASiddiqui (2016) a constaté que la quantité d'alliine détectée dans des gousses d'ail frais est de 6-14 mg/g.

I.2.4.2. Allicine

L'allicine ou le diallylthiosulfinate est caractérisée par le groupe fonctionnel thiosulfinate, R-S (O) -S-R (Figure. I.6). Le composé d'allicine n'est pas présent dans l'ail avant qu'un dommage tissulaire ne se produise, il est obtenu par l'action de l'enzyme alliinase sur l'alliine (Omar et Al-Wabel, 2010) (Figure I.5). On considère que 1 mg d'alliine équivaut à 0,45 mg d'allicine (European Scientific Cooperative of Phytotherapy). La quantité d'allicine connue sous le nom de composé bioactif majeur dans l'extrait d'ail est d'environ 2,3-9 mg d'allicine / g d'ail (Tyagi et al, 2014). Cette quantité diffère d'une région à une autre.

I.2.4.3. Le sulfure de diallyle

Le sulfure de diallyle (DAS) est un composé facilement transformé en allicine (Sengupta et al., 2004) (Figure I.6). Kimbaris et al. (2006) ont constaté que l'huile d'ail contient 23 μg/g de DAS par extraction simultanée, et par analyse par spectroscopie FT-Raman. Ils ont constaté aussi que l'extrait d'ail obtenu à partir du méthanol, d'éthanol et de l'éther diéthylique, étaient composés environ 10-20, 0-20 ou 0-20 μg/g de DAS, respectivement.

I.2.4.4. Le trisulfure de diallyl

Le trisulfure de diallyse (DATS) commence sa synthèse biochimique avec la γ-glutamyl-S-alk (en) yl-L-cysteine, qui est hydrolysée et oxydée pour produire de l'alliine (Cho et al., 2012) (Figure I.7). L'alliin est le précurseur inodore du DATS. Le traitement de l'ail (coupé ou mâché) génère une enzyme vacuolaire (allinase), qui agit sur l'alliine pour donner naissance à l'allicine et autres alkyl-alcane-thiosulfinates (Cho et al., 2012). L'allicine et les thiosulfinates connexes sont décomposés pour produire divers composés organosulfurés, y compris DATS. Kimbaris et al. (2006) ont constaté

que les extraits d'ail, d'acétate d'éthyle ou d'hexane d'ail étaient composés de DATS environ 0-200, 10-220 ou 1-180 µg/g, respectivement.

I.2.4.5. L'ajoène

L'ajoène (4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triène-9-oxyde) est le produit de dégradation de l'allicine (Figure I.7). La température de conservation est un facteur très important pour la formation d'ajoene. Lorsque la température de stockage est de 40, 60 et 80 ° C, la quantité de concentration d'ajoène augmente graduellement, la plus grande quantité d'E-ajoene (172,0 µg/g d'ail) et Z-ajoene (476,3 µg/g d'ail) trouvés dans l'ail est à 80 ° C, température optimale (Naznin et al., 2008).

I.2.4.6. La S-allyl cysteine

La S-allyl cysteine (SAC), est le produit majeur obtenu lors de la transformation de la γ-glutamyl-S-allyl-L-cystéine, c'est les composés organosulfurés hydrosolubles, et sa concentration augmente grâce à une extraction à long terme dans un milieu aqueux (Tableau 1). Dans une étude faite sur des animaux, le SAC est détecté dans le sang et sa concentration sanguine et ses paramètres pharmacocinétiques sont bien associés à des doses de SAC administrées par voie orale (Amagase, 2006). Amagase et Milner ont constaté que l'ail vieilli contient environ 0,45 mg/g du SAC (Amagase & Milner, 1993).

I.2.4.7. Le disulfure de diallyl

Le disulfure de diallyl (DADS) est un composé organosulfuré trouvé dans les plantes du genre Allium (Figure I.7). Il est l'un des principaux composants de l'huile d'ail distillée. Il s'agit d'une eau jaunâtre en liquide soluble caractérisée par une forte odeur d'ail. Il est produit pendant la décomposition de l'allicine, qui est libérée lors de l'incision de l'ail et d'autres plantes de la famille des Alliaceae (Amagase et al., 2001). Le DADS a de nombreux avantages pour la protection de l'ail, mais c'est aussi un allergène qui provoque une allergie à l'ail. Très dilué, il est utilisé comme arôme dans la nourriture. Kimbaris et al. (2006) ont constaté que les extraits d'ail, d'acétate d'éthyle ou d'hexane étaient composés respectivement de 80-280, 60-231 ou 70-260 µg/g de DADS.

I.2.4.8. La thiacremonone

La thiacremonone (2,4-dihydroxy-2,5-diméthyl-thiophène-3-one) a été isolée et identifiée comme un principal nouveau composé organosulfuré, il représente – environ 0,3% dans l'ail, il est obtenu à haute température et à haute pression (Yun et al., 2014). Les échantillons chauffés ont été jumelés puis filtrés sur un entonnoir Buchner sous vide. L'extrait d'ail chauffé a été réparti consécutivement dans un entonnoir de séparation en utilisant de l'acétate d'éthyle. Généralement il a été récemment constaté que l'ail chauffé contient environ 0,7 µg de la thiacremonone/g d'ail (Yun et al., 2014).

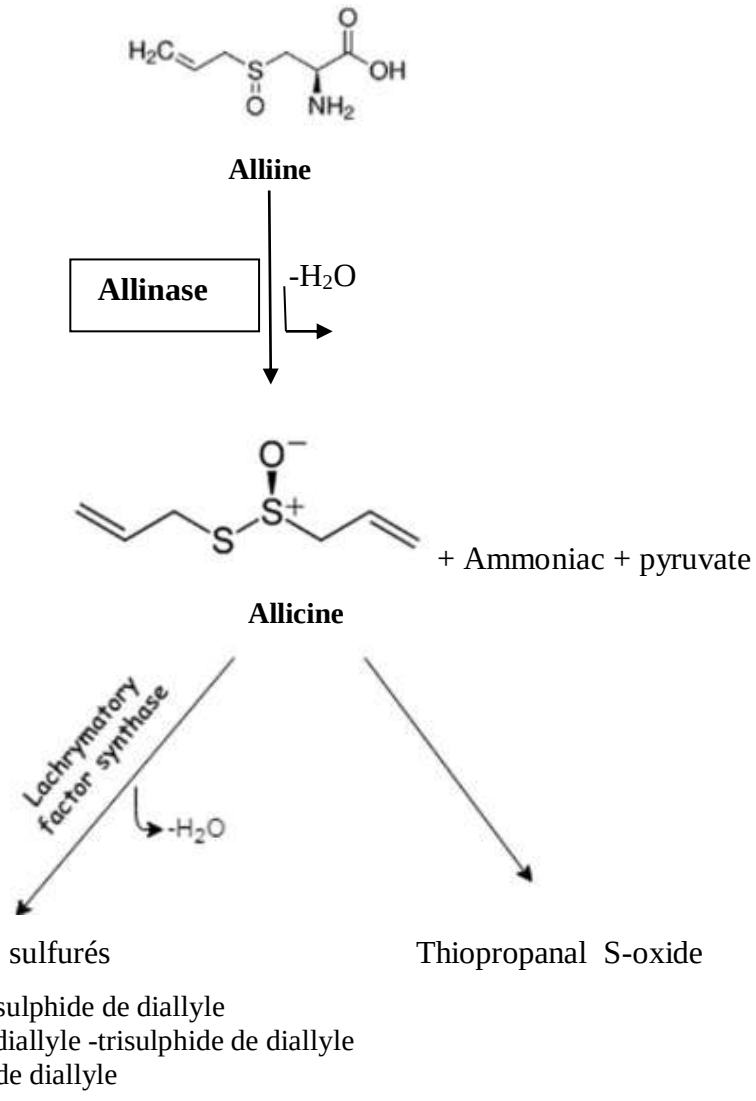


Figure I.7. Chemins de biosynthèse des principaux composés organosulfurés d'Allium sativum L.

I.2.5. Les composés phénoliques

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées, …).

I.2.5.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très importantes en phytothérapie qui proviennent du métabolisme végétal, on les retrouve dans différentes parties de la plante au niveau des fruits, des fleurs ou des feuilles. Ce sont des pigments communs des végétaux qui sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles (Figure I.8). au niveau cellulaire on les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes *(*Vasquez-Caicedo et al., 2006*)*. On distingue différentes structures des flavonoïdes parmi lesquels se trouvent : les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols, les flavanes, les flavan - 3-oles, les chalcones, les aurones, les isoflavones, les 3-arylcoumarines, les coumestanes, les roténoïdes.

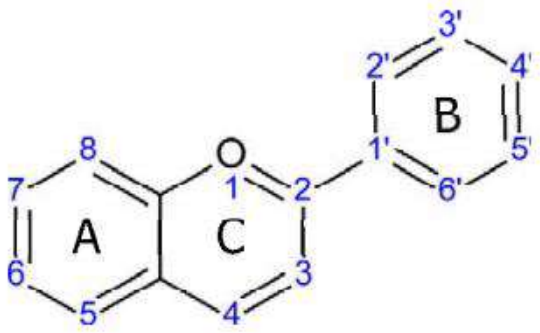


Figure.I.8. Structure générale et numérotation standard d'un flavonoïde.

Deux types de flavonoïdes ont été relevés, celui des flavonoïdes au sens strict dont la structure porte le noyau aromatique B en position 3 sur la chaine C3 et celui des isoflavonoïdes dont le noyau aromatique B est en position 2 sur la chaine C3.

I.2.5.1.1. Les flavonoïdes au sens strict

Les flavonoïdes au sens strict "stricto sensu" dérivent d'une structure 1,3-diphénylpropane (Figure I.9). L'enchaînement propanique est le plus souvent sous forme d'hétérocycle pyranique, à l'exception des chalcones et des aurones. Ce type de flavonoïdes résultent de la condensation de 3 unités C2 (sous forme de 3 malonyl-CoA) qui va former le noyau A et d'un acide cinnamique activé pour la formation du noyau B, et la chaîne propanique.

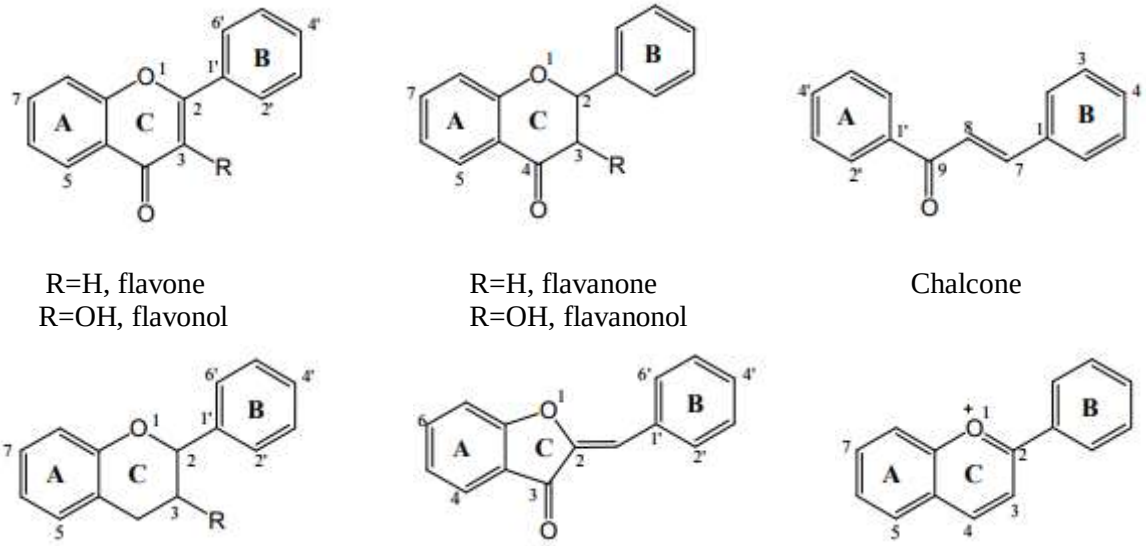


Figure I.9. Structure des différentes sous-classes de flavonoïdes au sens strict.

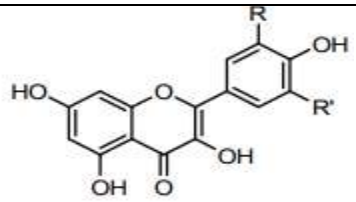
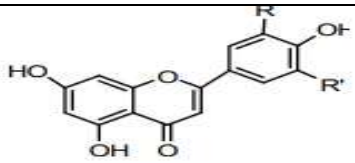
Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C.

I.2.5.1.2. Flavones et flavonols

Généralement le noyau A des flavones et flavonols est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Les groupements hydroxyles peuvent être libres ou méthylés.

Le noyau B est monosubstitué en position 4', ou disubstitué en positions 3' et 4', ou trisubstitué en positions 3', 4' et 5'. Ces substituants peuvent être des groupes OH ou OCH_3. Le noyau C est monosubstitué par un des groupements : OH, OCH_3 ou O-Gly.

Tableau. I.2. Structures chimiques des flavones et des flavonols.

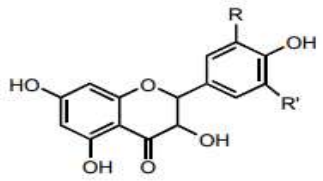
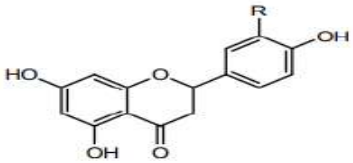
Classes	Structures générales	R	R'	Nom
Flavonols		H	H	Kaempférol
		OH	H	**Quercétine**
		OCH_3	H	Isorhamnétine
		OH	OH	Myricétine
Flavones		H	H	Apigénine
		OH	H	Lutéoline
		OCH_3	OCH_3	Tricine

Ces composés constituent le groupe le plus hydroxylé de la famille des flavonoïdes. Ils existent sous deux formes, aglycones hétérosides.

I.2.5.1.3. Flavanones et flavanonols

Les flavanones et les flavanonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence d'un carbone asymétrique en C2. Ils se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3, avec les memes variations structurales que celles décrites pour les flavones et flavonols (Figure I.11).

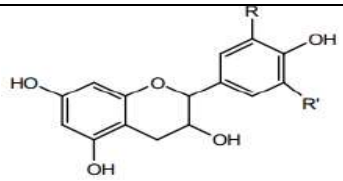
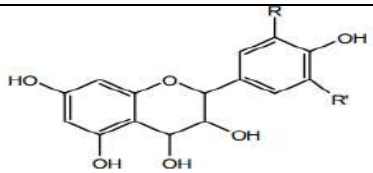
Tableau. I.3. Structures chimiques des flavanones et flavanonols.

Classes	Structures générales	R	R'	Nom
Flavanonols		OH	H	Taxifoline
		OH	OH	Ampéloptol
Flavanones		H	-	Naringénine
		OH	-	Eriodictyol

I.2.5.1.4. Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols

Ce type de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en position C4 (Figure I.12). Les flavan-3-ols (catéchines) possèdent deux atomes asymétriques en positions C2 et C3. Chaque composé existe sous forme de quatre stéréoisomères: (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (+)-épicatéchine, (-)-catéchine. Les deux premier sont les formes les plus répandues. Les flavan-3,4-diols se distinguent des catéchines par la présence du OH en position 4.

Tableau. I.4. Structures chimiques des flavan-3-ols et flavan-3,4-diols.

Classes	Structures générales	R	R'	Nom
Flavan-3-ols		H	H	Afzeléchine
		OH	H	Catéchine
		OH	OH	Gallocatéchine
Flavan-3,4-diols		H	H	Leucopélargonidine
		OH	H	Leucocyanidine
		OH	OH	Leucodelphinidine

I.2.5.1.5. Anthocyanes

Les anthocyanes ou anthocyanosides sont des pigments naturels solubles dans l'eau, rouge en milieu acide et bleu en milieu alcalin. Ils sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium avec 3 cycles aromatiques (Figure I.13) conjugués.

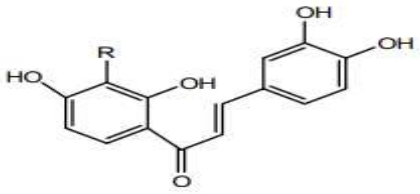
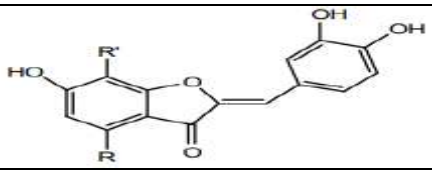
Tableau. I.5. Structures chimiques des anthocyanes.

Classe	Structure générale	R	R'	Nom
Anthocyanes		H	H	Pélargonidine
		OH	H	Cyanidine
		OCH_3	H	Péonidine
		OH	OH	Délphinidine
		OCH_3	OCH_3	Malvidine
		OH	OCH_3	Pétunidine

I.2.5.1.6. Chalcones et aurones

Les chalcone sont des composés organiques aromatiques naturellement synthétisé par de nombreuses plantes. Ils sont constitués par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée (Figure 8). Le noyau B est non substitué, les substitutions de cycle A sont identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone.

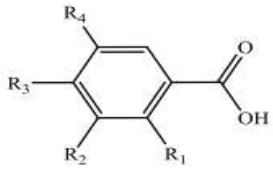
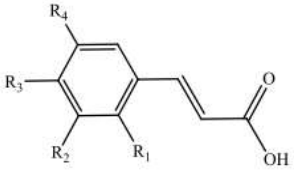
Tableau. I.6. Structures chimiques des chalcones et aurones.

Classes	Structures générales	R	R'	Nom
Chalcones		H	-	Butéine
		OH	-	Okanine
Aurones		H	H	Sulphorétine
		OH	H	Aureusidine
		H	OCH_3	Leptosidine

I.2.5.2. Acides phénoliques

Ce groupe phenolique est caractérisé par la présence d'un cycle aromatique portant d'une part un groupement acide carboxylique, et d'autre part un ou plusieurs hydroxyles (Tableau. I.7). La classe des acides phénoliques est subdivisée en 2 sous classes, les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Parmi ceux.ci, on peut citer l'acide gallique, une des acides phénoliques les plus simple, mais souvent décrit comme puissant antioxydant surtout sous sa forme conjuguée avec un autre noyau phénolique comme un flavanol (Makris et Kefalas, 2004).

Tableau. I.7. Exemples d'acide phénolique.

Classe	Structure	R1	R2	R3	R4	Nom
Dérivés de l'acide benzoïque		H	H	H	H	Acide benzoïque
		OH	H	H	H	Acide sallicylique
		H	H	OH	H	Acide *p*- hydroxybenzoïque
		H	OH	OH	OH	Acide gallique
		H	OH	OH	H	Acide protocatéchique
Dérivés de l'acide cinnamique		H	H	H	H	Acide cinnamique
		OH	H	H	H	Acide *o*-coumarique
		H	OH	H	H	Acide *m*-coumarique
		H	H	OH	H	Acide *p*-coumarique
		H	OH	OH	H	Acide caféique

I.2.6. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés (Nombre d'électrons impair) dans leur orbite externe. Les radicaux sont formés par gain ou perte d'un électron. Ils peuvent être chargés positivement (radical cationique), chargés négativement (radical anionique) ou neutres (radical neutre). Les radicaux libres sont généralement formés via la NADPH cytochrome P450 réductase ou d'autres réductases contenant de la flavine.

Les xénobiotiques qui, sur l'activation métabolique, produisent des radicaux libres sont les quinines, les acrylamines, les nitroaryls et le tétrachlorure de carbone. La plupart des radicaux libres sont organiques. Ils produisent une toxicité par peroxydation des composants cellulaires. Par exemple, le carbone de tétrachlorure forme les radicaux trichlorométhyle, qui provoquent la peroxydation des lipides polysaturés et se lient de manière covalente aux protéines et aux lipides insaturés.

Une classe importante de radicaux libres est formée de radicaux libres inorganiques, tels que le peroxyde d'hydrogène et les anions superoxyde (O_2^-). Ces fragments oxydants peuvent causer d'énormes dégâts tissulaires, entraînant une mutation ou un cancer. Leur toxicité potentielle est bien supérieure à celle des électrophiles.

I.2.6.1. Production des radicaux libres

A. Méthodes chimiques

L'oxydoréduction : l'exemple le plus important est la réaction de Fenton. En 1876, H. J. H. Fenton décrivit l'oxydation de l'acide tartrique par addition de fer (II). Il mit en évidence l'action catalytique du fer en 1895. C'est une réaction qui permet la production du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène en présence d'un métal (Cu, Fe).

$$H_2O_2 + Fe^{2+}\ (Cu^{+}) \rightarrow HO^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}\ (Cu^{2+})$$ Réaction de Fenton.

I.2.6.2. Méthodes électrochimiques

La production du radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$) s'effectue par une réaction appelée Electro-Fenton. Elle consiste à réduire électrochimiquement via des électrodes de mercure ou de graphite, le fer ferrique en fer ferreux et l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Ce système permet de produire les deux espèces nécessaires à la réaction de Fenton.

$$Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$$

$$O_2 + 2\ e^- + 2\ H^+ \rightleftharpoons H_2O_2$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$$

I.2.7. Mécanismes antioxydants des composés phénoliques

Les principaux oxydants dans les milieux biologiques sont les radicaux libres et les métaux de transition. Les polyphénols désactivent les radicaux libres via trois mécanismes :

I.2.7.1. Transfert d'atome d'hydrogène

L'antioxydant phénolique agit avec le radical libre par transfert d'un atome d'hydrogène via la rupture homolytique de la liaison O-H.

$$ArOH + R^{\bullet} \longrightarrow ArO^{\bullet} + RH$$

Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical néfaste, et le radical $ArO^{\bullet}$ (forme oxydée de l'antioxydant). Bien que cette réaction donne naissance à un autre radical libre, celui-ci est moins réactif.

I.2.7.2. Transfert mono-électronique d'électron

Dans ce mécanisme, un électron est transféré au radical libre $R^{\bullet}$. L'anion R^- et le cation radical $ArOH^{+\bullet}$ ainsi formés sont généralement des entités stables.

$$ArOH + R^{\bullet} \longrightarrow ArOH^{+\bullet} + R$$

Le potentiel d'ionisation est le facteur déterminant du pouvoir piégeur d'électrons. Un potentiel bas implique un arrachement facile d'électron et en conséquence une réaction avec le radical libre.

I.2.7.3. La chélation des métaux de transition

C'est un mécanisme indirect. Il consiste à la chélation des métaux de transition tels que le fer ou le cuivre. Cette chélation sert à empêcher la réaction de Fenton dans les

milieux biologiques. L'exemple le plus important est la réaction de Fenton. C'est une réaction qui permet la production du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène en présence d'un métal (Cu, Fe).

$$H_2O_2 + Fe_2+ (Cu^+) \rightarrow HO^\bullet + OH^- + Fe^{3+} (Cu^{2+})$$

I.3. La pharmacologie de l'ail

I.3.1. Action de l'ail sur les radicaux libres

La formation des radicaux libres influe sur la stabilité du génome et c'est le principal facteur causant la promotion du vieillissement, des maladies dégénératives et du cancer. Les espèces réactives d'oxygène ont été identifiées comme un facteur médiateur majeur dans divers domaines pathologiques des maladies telles que le cancer, l'ischémie, les maladies inflammatoires, le diabète et l'athérosclérose (Wilson & Demmig-Adams, 2007 ; Vina et al., 2006). Le niveau d'espèces réactives d'oxygène augmente dans des conditions telles que l'inflammation, lors de l'exposition aux rayonnements ionisants, des polluants, de l'exercice et de l'utilisation de certains médicaments déclenche la ROS (Espèces réactives de l'oxygène).

Dans toutes ces conditions, une protection antioxydante supplémentaire est nécessaire, sinon cela entraînera un stress oxydatif. ROS est normalement neutralisé par des enzymes antioxydantes cellulaires et de petites molécules telles que le glutathion et par la présence de vitamines et de minéraux (Berger, 2005 ; Ji & Peterson, 2004).

Plusieurs chercheurs ont signalé que l'ail est efficace contre certaines maladies dans lesquelles ROS est considéré comme un facteur causal majeur. Les études concluent que l'ail peut fonctionner en raison de son activité de réduction sur ROS ou en interagissant avec eux pour minimiser leur impact négatif sur les cellules saines. La puissance antioxydante de divers composés d'ail diffère selon sa structure chimique et les procédures de normalisation adoptées (Amagase, 2006).

Les composés organosulfurés présents dans l'ail sont les antioxydants puissants qui contribuent également à stimuler les enzymes antioxydantes dans le foie (Ide & Lau, 2001). Puisque l'activité antioxydante est principalement due au statut électronique du matériau, les réactions in vivo qui se déroulent dans le corps doivent être prises en

compte tout en considérant les composés actifs de l'ail (Figure. I.11). L'extrait d'ail vieilli est relativement plus riche en antioxydants que l'ail frais. L'extrait d'ail vieilli aide à stimuler les antioxydants cellulaires, ce qui aide à maintenir un système immunitaire sain. Il empêche également la toxicité du médicament en augmentant les peroxydes, ce qui contribue à éliminer les peroxydes toxiques du corps. L'huile d'ail possède également des avantages potentiels pour la santé en tant que correcteur de radicaux libres et offre une protection contre la toxicité des métaux et de divers produits chimiques (Amagase et al., 2001 ; Borek,2001). D'autres études d'intervention à long terme sont nécessaires pour établir les effets bénéfiques de l'ail.

I.3.2. L'ail et le stress oxydatif

Le stress oxydatif peut résulter d'une augmentation de la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS), de la rupture de l'équilibre rédox, de la biodisponibilité diminuée d'oxyde nitrique (NO) ou une diminution de la capacité antioxydante dans différents tissus (Tebay et al., 2015). En outre, les ROS sont des molécules de signalisation importantes qui jouent un rôle critique dans la régulation de la fonction endothéliale et du tonus vasculaire (Tebay et al., 2015). La formation de ROS dans la vascularisation est catalysée par plusieurs enzymes telles que le phosphate de dinucléotide du nicotinamide adénine (NADPH) et la synthèse de NO synthétique (NOS) désaccouplée. L'activation de ces enzymes dans des conditions pathologiques augmente les niveaux de ROS, qui à leur tour active plusieurs facteurs de signalisation cellulaire tels que le facteur nucléaire-KB (NF-kB), MAPK, Akt / PKB et les tyrosine kinases (Tebay et al., 2015). En outre, les molécules pro-oxydantes produites dans le système vasculaire telles que O_2, H_2O_2, OONO et OH peuvent également induire un stress oxydatif, en particulier s'il existe un déséquilibre entre la concentration d'oxydants et les antioxydants dans le cytosol et d'autres compartiments cellulaires (Tebay et al., 2015). En outre, un stress oxydatif accru peut induire une dysfonction des mécanismes cellulaires, une inflammation, une augmentation de la contraction des radicaux libres et peut finalement conduire à une pathologie (Figure I.10).

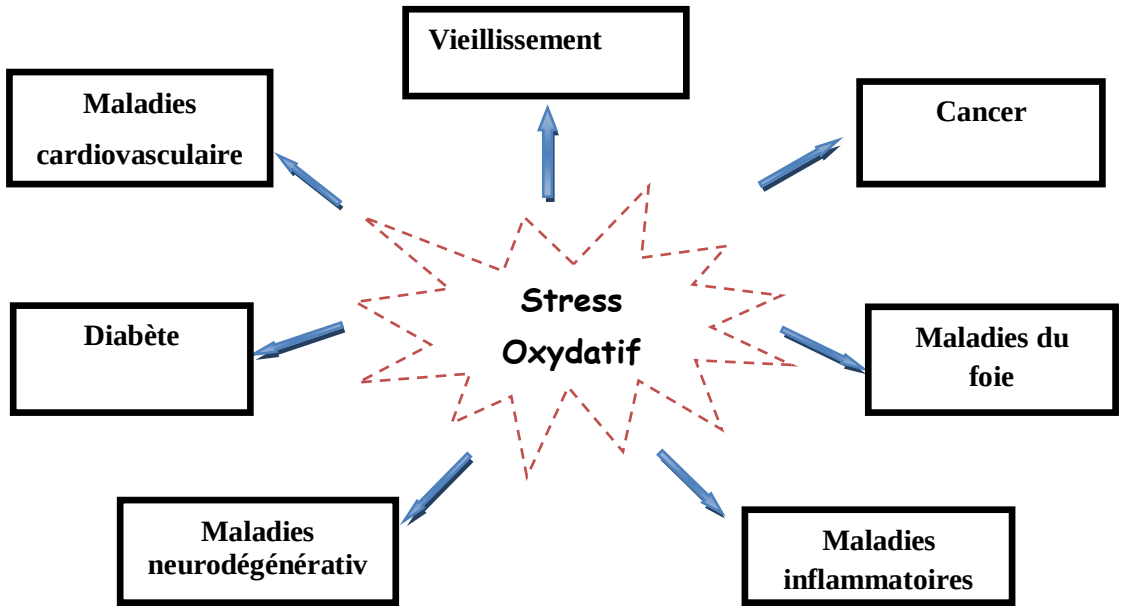


Figure. I.10. Le stress oxydatif au sein des pathologies.

Cet effet est dû à l'amélioration des mécanismes antioxydants et de la réduction de l'activité de la NADPH oxydase. D'autres preuves accumulées indiquent que les antioxydants et les piégeurs de radicaux provenant des aliments à base de plantes peuvent abaisser la pression sanguine chez les animaux modèles ainsi que chez les patients malades (Sobenin et al., 2008 ; Ried et al., 2010). Par conséquent, l'attention a été accordée à des approches qui améliorent ou combattent le dysfonctionnement cellulaire dans le cas de l'hypertension, le diabète, l'hépatite et autres, en améliorant l'équilibre redox et l'homéostasie cellulaire.

La S-allyl cysteine (SAC), un composé d'organosulfure abondant dans l'ail vieilli, connaît des propriétés antioxydantes in vivo et in vitro (Ried et al., 2010). En effet, le SAC a démontré qu'il atténue le stress oxydatif chez les rats Wistar mâles avec insuffisance rénale aiguë (Ried et al., 2010). Cet effet a été attribué à la capacité du SAC à piéger les espèces réactives d'oxygène (ROS) telles qu'O_2 et H_2O (Figure. I.12) (Ried et al., 2010). Des études sur plusieurs modèles d'animaux démontrent que l'effet hypotenseur de l'ail pourrait être dû à sa capacité à réduire le stress oxydatif et maintenir l'homéostasie cellulaire au niveau des organes touchés par une modification des mécanismes cellulaire et tissulaire.

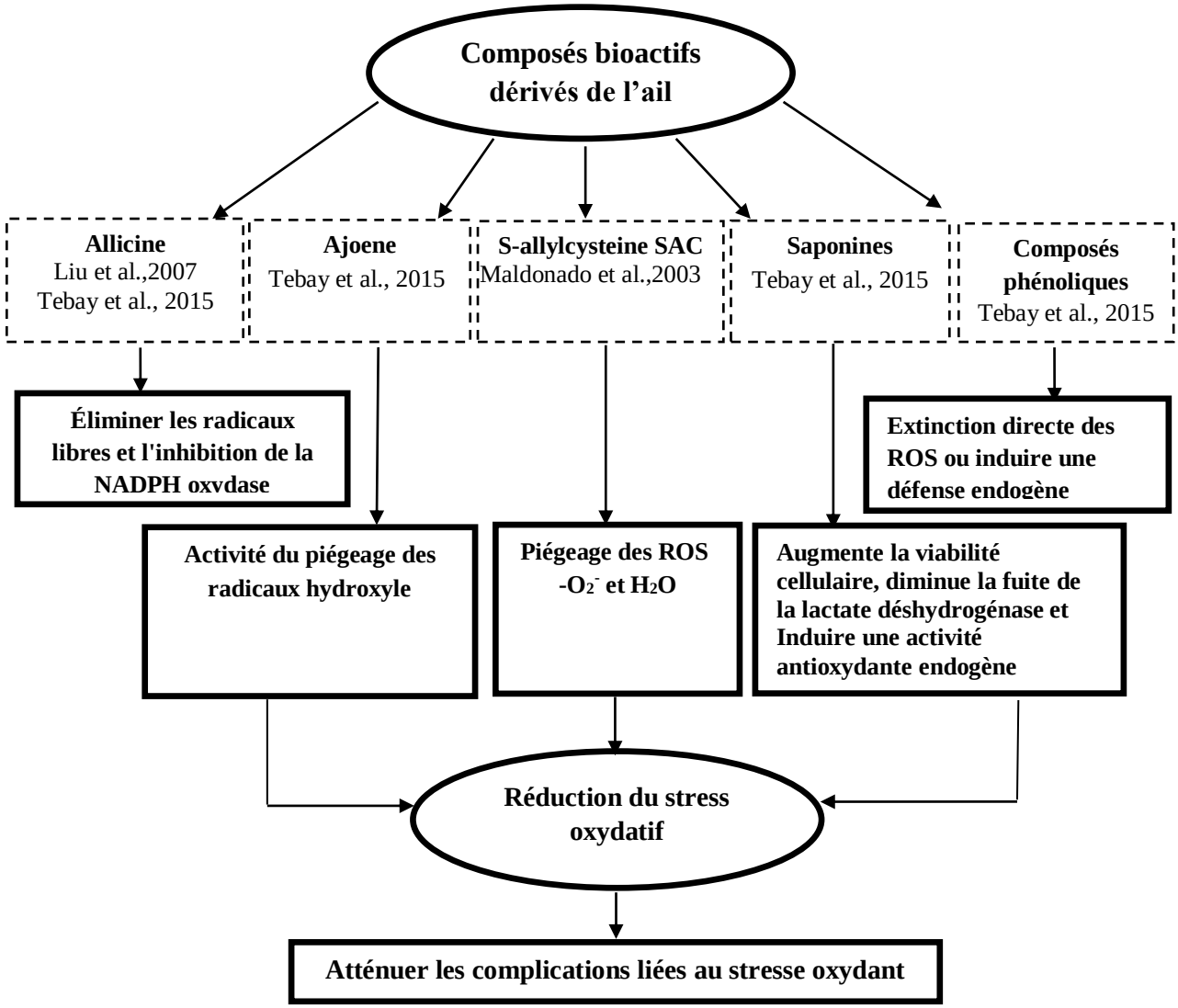


Figure. I.11. Réduction du stress oxydatif par les composés dérivés de l'ail dans la gestion des maladies associées aux stresse oxydant. Les fonctions biochimiques et les propriétés antioxydantes des bioactifs de l'ail comme la SAC, l'allicine, les saponines, l'ajoene et les composés phénoliques, dans l'atténuation des complications liée au stress oxydatif.

I.3.3. Activité antioxydante de l'ail

Les produits dérivés de l'ail comme l'extrait d'ail vieilli se révèlent avoir une activité antioxydante plus élevée par rapport aux produits obtenus à partir de l'ail frais. Cela pourrait être dû à la procédure d'extraction suivie. Certains des composés récemment identifiés dans l'extrait d'ail vieilli sont le N-fructosyl glutamate, la N-fructosyl arginine et la N-fructosyl lysine (Meitinger et al., 2014). Les produits phytochimiques

présents dans l'extrait d'ail âgé agissent de manière synergique et exercent leur activité antioxydante en favorisant le balayage des radicaux libres oxygénés au moyen de l'amélioration de l'enzyme antioxydante cellulaire, de la superoxyde dismutase, de la catalase, de la peroxydase de glutathion et de l'augmentation du taux de glutathion dans les cellules pour favoriser les mécanismes de défense importants dans les cellules vivantes. Un des avantages potentiels de l'extrait d'ail vieilli est la diminution des maladies cardiovasculaires et cérébrales en supprimant et en inhibant la peroxydation lipidique et l'oxydation de LDL (Amagase et al., 2001 ; Lau, 2006). Le tableau I.8 résume certains propriétés antioxydantes des différentes formes et composés d'ail.

Tableau. I.8. Propriétés antioxydantes de l'ail.

Composés organosulfurés	Effet antioxydant	Références
Huile d'ail	Réduit la toxicité du tributylétain	Liu and Xu (2007)
Extrait d'ail vieilli	Inhibe la formation des radicaux libres dérivés de la glycation Inhibe la peroxydation des lipides et l'oxydation des LDL	Ahmad and Ahmed (2006) Lau (2006)
Extrait d'ail aqueux	Protège les tissus contre les dommages oxydatifs induits par la nicotine	Augusti (1996)
Di-allyl-tri-sulfure	Réduit les lésions hépatiques causées par le tétrachlorure de carbone	Fukao et al. (2004)
Allicine	Piège les radicaux hydroxyles	Prakasam et al., 2005a
6. S-ethyl cysteine (SEC)	Protection contre les oxydations liées aux lipides	Tsai et al., (2005)

I.3.4. Effet pharmacologie de l'ail sur le cancer

Au cours des 30 dernières années, il y a eu de nombreux études épidémiologiques indiquant qu'un régime riche en ail diminue le risque de cancers tels que le gastrique, l'estomac et le côlon.

Les extraits DAS, DADS, DATS, ajoene, SAC et allicine sont documentés pour inhiber le développement des tumeurs pulmonaires, hépatiques, prostatiques et cutanées (Shankar et al., 2008 ; Chandra-Kuntal & Singh, 2010 ; Wu et al., 2011).

- Un Traitement topique DAS (10 mg/kg, 3 fois / semaine pendant 28 semaines) induit une apoptose et inhibe la croissance tumorale chez les Rats, y compris

des tumeurs cutanées induites par DMBA chez des souris albinos suisses (Kalra et al., 2006).

- Un traitement par DADS (42 mg/kg, 3 fois par semaine pendant 21 semaines) protège contre la leucémie promyélocytaire humaine (Zhao et al., 2006).
- Le Traitement avec DATS (environ 80 mg/kg, 3 fois/semaine pendant 13 semaines) supprime le développement du cancer de la prostate dans l'adénocarcinome transgénique des souris prostatiques (Chandra-Kuntal & Singh, 2010).
- Le traitement par SAC (240 mg/kg et 480 mg/kg) dans un modèle in vivo de souris nées a montré un effet anti-tumoral, et une diminution de 42 et 64% de la croissance tumorale par inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses (Tang et al., 2010).
- Des composés organosulfuré analogue peuvent également supprimer la prolifération de cellules cancéreuses, y compris le colon humain, le poumon, la prostate, le foie, le sein, les kératinocytes, la leucémie et les cellules cancéreuses gastriques. Ce profil biologique de l'ail donne de nouvelles idées sur la compréhension des mécanismes moléculaires qui donne de nouveaux points de vue sur la compréhension des mécanismes moléculaires et de son action antitumorale potentielle (Xu et al., 2004). Comme mécanisme possible de cette inhibition, il a été suggéré que les sulfures d'allyle peuvent agir pour augmenter l'activité de la S-transférase de glutathion (GST) qui catalyse la conjugaison de composés électrophiles avec GSH (Kalra et al., 2006 ; Tang et al., 2010).

I.3.5. Effet de l'ail sur le cholestérol

Des preuves expérimentales indiquent que l'ingestion d'ail diminue le taux de cholestérol sanguin et inhibe la synthèse du cholestérol (Tableau I.9). Plusieurs études expérimentales ont indiqué que l'ail et ses constituants inhibent les enzymes clés impliquées dans le cholestérol et la synthèse des acides gras dans les hépatocytes des rats (Liu & Yeh, 2001 ; Yeh & Liu, 2001). Une autre étude montre que l'extrait d'ail

réduit la synthèse du cholestérol jusqu'à 75% sans preuve de toxicité cellulaire. Ces résultats indiquent que les composés contenant un groupe allyl-disulfure ou allyl-sulfhydryle sont probablement responsables de l'inhibition de la synthèse du cholestérol par l'ail et que cette inhibition est probablement médiée à l'alpha-méthyl oxydase du stérol 4. De plus, Il a été montré que les composés plus hydrosolubles comme le SAC présent dans l'extrait d'ail vieilli sont moins cytotoxiques et plus efficaces pour inhiber la biosynthèse du cholestérol que les composés organosulfurés lipidiques tels que DAS (Yeh & Liu, 2001).

Tableau. I.9. Effet hypocholestérolémiant de l'ail chez l'homme.

Doses	**Durée de traitement**	**Effet *Cholestérolémiant***	**Références**
900 mg/j Comprimé à l'ail	24 semaines	TC, TG and LDL ; HDL	Ashraf et al., 2011
300 mg/j Allicor (NAT-Farma, Moscow, Russia)	12 mois	TC, TG and LDL	Sobenin et al., 2010
600 mg/j Comprimé en poudre	12 semaines	TC, TG and LDL ; HDL	Sobenin et al., 2008
800 mg/j Comprimé d'ail en poudre	6 semaines	TC, TG and LDL ; HDL	Kojuri et al., 2007
600 mg/j Comprimé (Garlex-Bosch Pharmaceuticals)	12 semaines	TC and LDL ; HDL	Ashraf et al., 2005
920 mg/j (alliin 43.2 mg/d) Poudre d'ail	2 semaines	TC and LDL ; TG and HDL	Turner et al., 2004
800 mg/j Comprimé en poudre	3 mois	TC, TG, LDL and HDL	Sobenin et al., 2010
880 mg/j Ail en comprimé en poudre	12 semaines	TC and LDL ; TG and HDL	Ashraf et al., 2011
7200 mg/j AGE capsule	5 mois	TC and LDL ; TG and HDL	Yeh & Liu, 2001

I.3.6. Effet de l'ail sur la tension artérielle

Chez les patients atteints d'hypertension non contrôlée (SBP = 140 mm Hg au départ), la pression artérielle systolique était en moyenne de 10,2 +/- 4,3 mm Hg (P = 0,03) plus basse dans le groupe des patients qui consommaient quatre capsules d'extrait d'ail vieilli (960 mg contenant 2,4 mg de SAC) par jour, pendant 12 semaines par rapport aux témoins au cours de la période de traitement de 12 semaines (Ried et al., 2010). L'ail réduit la pression artérielle (BP) chez les rats grâce à l'amélioration de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) aussi bien que chez l'humain (Sobenin et al., 2008 ; Qidwai et al., 2013 ; Ried et al., 2010). L'ail semble exercer cet effet en modulant l'activité de plusieurs mécanismes qui sont vitaux dans l'homéostasie de la BP en faveur de l'hypotension. Un mécanisme possible par lequel l'ail pourrait induire son effet

hypotenseur pourrait être à travers les actions vasodilatatrices directes et indirectes du NO. L'eau potable a été remplacée par une solution de L-Arg (10 mg/ml, prise moyenne de 300 mg / jour) de 7 à 14 jours. Un jour après la chirurgie, il y a eu une réduction significative de la pression sanguine moyenne dans le groupe traité par L-Arg par rapport au témoin (129 ± 7 vs 168 ± 6 mm Hg) (Gouvea et al., 2003).

I.3.7. Effet hépatoprotecteur de l'ail

Des études précliniques ont montré que l'ail améliore le stress oxydatif induit par l'alcool au niveau du foie (Zeng et al., 2008 ; Nencini et al., 2010). L'ail réduit également l'augmentation de la peroxydation lipidique induite par l'éthanol et augmente les taux d'antioxydants tels que le glutathion (GSH), l'acide ascorbique, la catatase et la glutathion réductase (GR) dans le foie du rat (Nencini et al., 2010). L'ail et ses composés organosulfurés augmentent l'activité du Système antioxydant associé au GSH dans le foie du rat (Wu et al., 2009) et ils ont la capacité de fournir des effets protecteurs contre le stress oxydatif induit par des produits chimiques (Agarwal et al., 2007), mais aussi le traitement des lésions hépatiques d'origine médicamenteuse (Xiao et al., 2013).

En conséquence, Kiruthiga et al. (2007) ont constaté que l'ail diminuait de manière significative la peroxydation lipidique et augmentait le GSH, la catalase et la SOD. La propriété antioxydante de l'ail a précédemment été attribuée principalement à ses quatre composants chimiques majeurs, c'est-à-dire allinin, SAC, DADS et allicine.

Les lésions hépatiques induites par le tétrachlorure de carbone (CCl_4) peuvent être traitées par SAC qui est considéré comme un schéma utile pour le traitement des maladies chroniques du foie (Kodai et al., 2007). Dans un modèle animal expérimental, on a observé que l'homogénat d'ail à l'état pré-préparé présentait des effets bénéfiques contre la lésion hépatique induite par l'isoniazide + la rifampicine (Pal et al., 2006). Des études, menées sur des souris, des rats et des poulets, ont rapporté qu'un gavage oral d'huile d'ail offre une protection importante contre la toxicité des hépatotoxines, y compris les métaux lourds (El-Akabawy et El-Sherif, 2016). Les crapauds et les rats préalablement traités à l'ail ont présenté une action

protectrice contre l'aflatoxine et les tumeurs hépatiques induites chimiquement (Vijayanandraj et al., 2014). Une hépatotoxicité aiguë induite chimiquement chez les rats peut être évitée par l'ail vieilli et le sulfure de diallytique (Kodai et al., 2007).

Le mécanisme de l'action biologique des dérivés soufrés de l'ail dans les cellules de l'hépatome humain (HEP G2) a été proposé par Iciek et al. (2012). Ils ont constaté que DATS présentait l'activité biologique la plus élevée dans les cellules HEPG2 par un mécanisme conduisant à la formation de peroxyde d'hydrogène, en abaissant le niveau de thiol et en augmentant l'inhibition de la prolifération cellulaire.

I.3.8. Effet Antidiabétique de l'ail

Le diabète est un trouble endocrinien commun qui conduit à des troubles métaboliques (Ahmed & Ahmed, 2006). Il est un fait connu que la sécrétion d'insuline adéquate est nécessaire pour guérir le diabète. Les chercheurs ont essayé des thérapies alternatives utilisant des plantes médicinales comme un traitement supplémentaire à côté de l'insuline (Demerdash et al., 2005). L'ail contient une variété de composés dont les effets bénéfiques ont déjà été prouvés par diverses études impliquant des modèles humains et animaux. La plupart des études ont montré que l'ail peut aider à réduire les taux de glycémie chez les rats diabétiques, les souris, les lapins et augmente la sécrétion plasmatique d'insuline chez les rats diabétiques (Banerjee & Maulik, 2002). L'allicine aide à augmenter la quantité de catalase et de glutathion peroxydase. Il est également rapporté qu'un autre composé SACS (S-allylcysteine sulfoxide) stimule la sécrétion d'insuline dans les cellules β de rats normaux (Liu et al., 2005).

Les composants bioactifs de l'ail comme le sulfoxyde de s-allylcysteine (SACS) ont présenté un effet hypoglycémiant en stimulant la production d'insuline ou en interférant avec l'absorption de glucose alimentaire (Srinivasan, 2005). Le diabète sucré non contrôlé est considéré comme un facteur majeur dans le développement de complications liées au diabète. Les rapports de l'OMS ont indiqué que l'ail peut être utilisé pour traiter l'hyperglycémie (Ryan, Pick et Marceau, 2001). Des études menées sur des patients diabétiques utilisant de l'huile d'ail ont rapporté qu'il contribue à

corriger l'hyperglycémie. L'ail peut exercer une action hypoglycémiante par deux mécanismes différents :

- le premier par l'augmentation de la sécrétion pancréatique d'insuline.
- le second par la libération de l'insuline liée ou par l'amélioration de la sensibilité de l'insuline.

I.3.9. Effets antimicrobiens de l'ail

L'huile d'ail et les alcools allyliques dérivés de l'alliine provoquent une inhibition de la croissance dans les levures (Chung et al., 2007). L'activité antimicrobienne diminue au fur et à mesure que la période de stockage augmente et, aussi, pendant une période de chauffage prolongée. Il est donc conseillé d'utiliser de l'ail frais (Sallam et al., 2004). À l'aide de leur effet antimicrobien et antioxydant, l'ail frais et la poudre d'ail contribuent à la préservation des produits à base de viande (Kozlowska et al., 2015). L'extrait d'ail brut a montré une activité contre les bactéries Gram-positives et gram-négatives à température ambiante, mais l'effet n'était pas significatif lorsqu'il est bouilli pendant 5 min avant le test (Maldonado et al 2005). L'extrait d'ail vieilli présentait une activité dépendante de la dose contre 3 souches différentes de helicobacter pylori à une concentration de 2 à 5 mg/ml. L'ail a également inhibé la croissance de 20 souches différentes de mycobactérie intracellulaire qui ont été isolées du sida (Madineh et al., 2017). Pour traiter les infections chez le lapin, ils ont utilisé un extrait aqueux d'ail qui a montré des actions antibactériennes importantes contre Shigella Flexneri et ont guéri les infections après 3 jours de traitement (Anibijuwon et al., 2012).

I.3.10. Mécanismes antioxydants associés à l'effet des composés organosulfurés de l'ail

Plusieurs études ont montré que l'extrait d'ail inhibent les dommages oxydatifs impliqués dans le vieillissement et dans différentes maladies. D'après ces travaux, les différents mécanismes de l'activité antioxydante de l'ail ont été attribués à ses composés sulfurés. Un exemple illustré sur la (Figure. I.12) montre le mécanisme

antioxydant associé aux effets protecteurs d'un composé sulfuré très répandu dans les différents extraits d'ail, le S-allylcysteine SAC.

Le SAC peut éliminer l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), le radical peroxynitrite ($ONOO^-$) et le radical peroxylique ($LOO^{\bullet}$) produit dans les cellules neuronales, ainsi que l'acide hypochloreux (HOCl) et l'oxygène singulet (O_2) produit dans des cellules microgliales (lignes bleues). De plus, le SAC présente également des propriétés chélatantes sur les ions Fe^{2+} et Cu^{2+} (ligne rouge), évitant ainsi la réaction de Fenton. Le SAC inhibe également la translocation NF-kB dans le noyau (ligne verte), ce qui empêche la signalisation apoptotique. COX^{-2}: cyclooxygenase^{-2}, NOX: NADPH oxydase, nNOS: oxyde nitrique synthase neuronale,

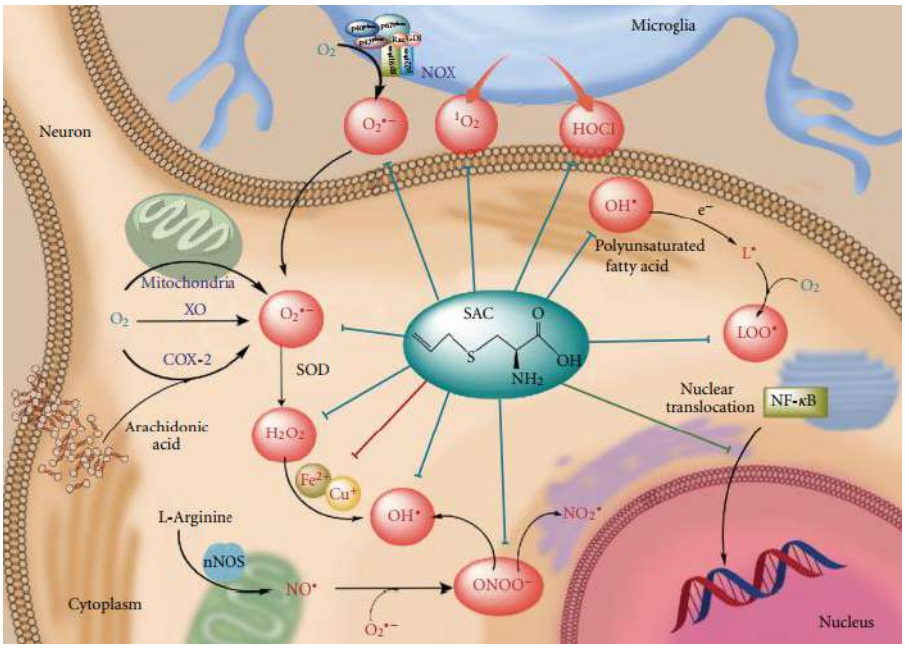


Figure. I.12. Mécanisme antioxydant associé à la S-allylcysteine (SAC) (Ana et al., 2012)

Le SAC contient un groupe thiol responsable de sa capacité antioxydante car ce nucléophile peut facilement faire don de son proton à une espèce électrophile, les neutralisant ou les rendant moins réactifs. Le SAC est le composé le plus étudié d'AGE et ses propriétés antioxydantes ont été rapportées dans plusieurs études. Le SAC empêche facilement les lipides (Ana et al., 2012), l'oxydation des protéines (Maldonado et al., 2003) et la nitration (Kim et al., 2006) en soutenant son activité antioxydante. En fait, le SAC est connu pour éliminer l'anion superoxyde ($O2^{\bullet-}$)

(Medina et al., 2007), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Maldonado et al., 2003), un radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$) (Ana et al., 2012) et l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$) (Kim et al., 2006). Medina-Campos et al. (2007) signalent que le SAC récupère l'acide hypochloreux (HOCl) et l'oxygène singulet (O_2). De plus, ces auteurs ont comparé l'activité du balayage du SAC par rapport aux composés de référence (molécules qui éliminent une espèce d'oxygène réactif spécifique) par la valeur IC_{50} pour chaque espèce réactive. Le SAC a neutralisé HOCl d'une manière similaire à celle de l'acide lipoïque et il était plus efficace de nettoyer $1'O_2$ que l'acide lipoïque et le glutathion réduit.

I.3.11. Mécanismes Antioxydants des composés phénoliques de l'ail.

Le composé le plus actif en tant qu'antioxydant est celui qui possède plus d'un groupe actif (par exemple, NH_2 ou OH) en position ortho. Ainsi, le composé antioxydant le plus actif est le catéchol (Figure I.13), qui possède deux groupes hydroxyles en position ortho (Valgimigli et al., 2008). La première chaîne portant le radical peroxyle était piégée par transfert d'atomes H à partir du OH phénolique labile et la seconde par réaction avec le radical phénoxyle résultant. Les catéchols sont capables de piéger deux radicaux péroxyles dans la plupart des conditions comme suit :

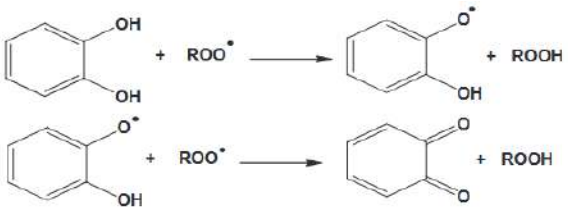


Figure I.13. Le mécanisme de réaction du catéchol comme antioxydant (Valgimigli et al. 2008).

L'aniline à une valeur PI plus faible, elle a donc la propriété d'abstraction électronique la plus facile. Ainsi, le mécanisme de réaction du 2-aminophénol pourrait être expliqué comme suit (Figure I.14) :

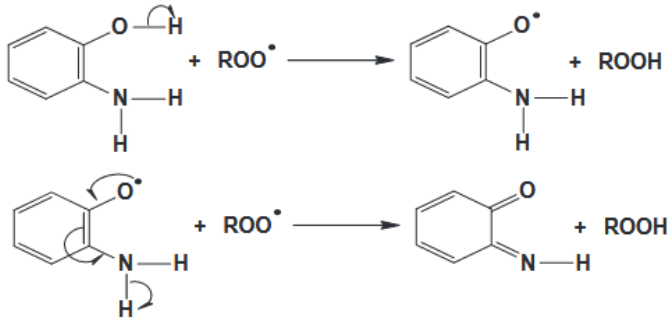


Figure I.14. Mécanisme de réaction du 2-aminophénol comme antioxydant (Valgimigli et al. (2008).

L'activité antioxydante élevée de ces composés est due à la présence de groupes di-actifs (OH ou NH_2) en position 1,2 dans leur structure moléculaire. Cette caractéristique de structure a la capacité de former une liaison hydrogène intramoléculaire. L'atome H qui n'est pas impliqué dans cette liaison sera alors extrait par les radicaux libres, ce qui aboutira à un radical phénoxy stable (Ordoudi et al., 2006). Ensuite, le 4-aminophénol, l'hydroquinone et la p-phénylènediamine étaient dans le second ordre en tant qu'antioxydant. Ces composés ont la même position de substituant. Le mécanisme réactionnel de l'hydroquinone pourrait être expliqué comme suit (Figure I.15) :

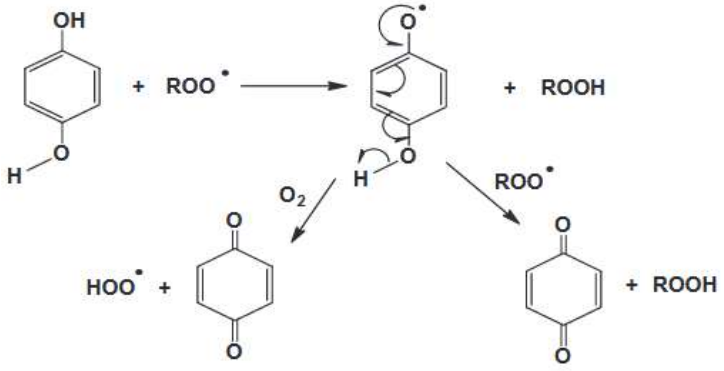


Figure I.15. Mécanisme de réaction d'une hydroquinone comme antioxydant (Valgimigli et al. (2008)

I.4. La toxicologie de l'ail

La consommation excessive d'ail peut causer des effets indésirables pour l'homme. Parmi ces effets, on cite une sensation de brûlure dans la bouche et le tractus gastro-intestinal, des nausées, des diarrhées, des vomissements et des odeurs corporelles. Le potentiel allergénique de l'ail est bien reconnu et les allergènes ont été identifiés :

citons comme exemple le DADS, le sulfate d'allylpropyle et l'allicine (Hyung et al.,2014).

D'autre part, un certain nombre d'études toxicologiques et cliniques sur des extraits d'ail ont été effectuées sans effets indésirables. La toxicité des extraits d'ail a été bien établie par plusieurs études (Hyung et al., 2014) comme : 1) tests de toxicité aiguë et subaiguë ; 2) test de toxicité chronique ; 3) tests de mutagénicité ; 4) tests de toxicité générale ; 5) tests de tératogénicité (segments I, II et III) ; 6) test de toxicité mené par la Food and Drug Administration des États-Unis et 7) des études cliniques menées sur des sujets normaux (N=1000).

D'autre part, l'institut national du cancer des États-Unis a testé la toxicité des composés d'ail typiques. Des doses quotidiennes jusqu'à 60 g d'ail frais administrées chez des êtres vivants, sur une période de trois mois, n'ont entraîné aucun désordre grave (Hyung et al., 2014). Les essais cliniques récents rapportent que des extraits d'ail peuvent être utilisés en tant que médicament complémentaire sans aucun risque (Macan et al., 2006). Le SAC est l'un des composés les plus connus dans les extraits d'ail, ses effets biologiques sont bien étudiés. L'institut national du cancer des États-Unis (NCI) a étudié la toxicité du SAC par rapport à d'autres composés d'ail et a constaté que le SAC a moins de toxicité que l'allicine et le DADS. La dose orale toxique de 50% (DL_{50}) chez la souris, est la suivante (Tableau. I.10) : pour l'allicine : 309 mg/kg chez les males et 363 mg/kg chez les femelles ; pour DADS : 145 mg/kg chez les males et 130 mg/kg chez les femelles ; et pour le SAC : 8890 mg/kg chez les mâles et 9390 mg/kg chez les femmes (Amagase, 2006).

Tableau. I.10. Dose toxique (DL_{50}) de : l'allicine, DADS et SAC chez les souris (Amagase, 2006).

Composé de l'ail	**L'allicine**		**DADS**		**SAC**	
Sexe	Male	Femelle	Male	Femelle	Male	Femelle
DL_{50} (mg / kg)	309	363	145	130	8890	9390

I.5. Application des réseaux de neurones en pharmacologie

I.5. 1. Réseaux de neurones

Un réseau de neurones artificiels (RNA) est une approche inspirée du système nerveux humain (Figure I.16). L'élément fonctionnel de base est le neurone. Le cortex cérébral (le cerveau) contient environ 10^{11} neurones. Ces derniers sont responsables de la réception, de l'intégration puis de l'émission et de la propagation des messages. Le système nerveux forme un réseau de neurones. Ces derniers sont abondamment connectés entre eux. Une cellule nerveuse réalise, par l'intermédiaire de son axone, plusieurs milliers de connections (appelées *synapses*) avec d'autres cellules. Le nombre de connections entre un neurone et ses voisins varie entre 10^3 et 10^4. Par conséquent, le cortex humain contient entre 10^{14} et 10^{15} connections.

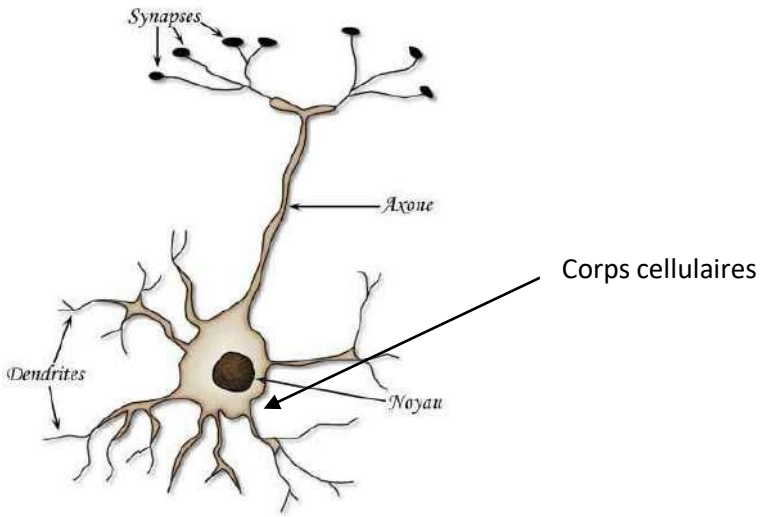


Figure. I.16. Morphologie d'un neurone biologique.

Depuis longtemps, l'homme s'est préoccupé de comprendre les principes selon lesquels les systèmes biologiques traitent l'information. Il s'est inspiré donc de ces observations pour élaborer de nouvelles techniques appelées techniques neuro-mimétiques ou tout simplement les RNA

Le neurone formel (Figure I.17), appelé aussi unité, nœud, automate ou élément de processus est un processeur élémentaire. Il a été conçu pour la première fois par McCulloch et Pitts (1943). Ce neurone formel est un élément binaire à seuil.

Autrement dit, ses entrées et sa sortie sont booléennes. Il reçoit de ses voisins des entrées binaires (X_j). Après une sommation pondérée de ces entrées ($\Sigma W_{ij}X_j$) suivie d'une transformation par une fonction de transfert, le neurone formel envoie des sorties (Y_i) binaires aux neurones voisins. L'activation du neurone formel dépend d'un certain seuil (θ), propre au neurone. Si la somme de ses entrées dépasse ce seuil, il se met dans son état actif (+1) sinon, il se met dans son état inactif (-1). Malgré l'évolution des neurones formels, le modèle de McCulloch et Pitts constitue, à quelques variantes près, la base des modèles RNA conçus jusqu'à aujourd'hui. Cette évolution concerne non seulement l'état du neurone qui peut être binaire ou continu mais aussi la fonction de transfert. Dans le modèle du neurone de McCulloch et Pitts on trouve (Figure I.17).

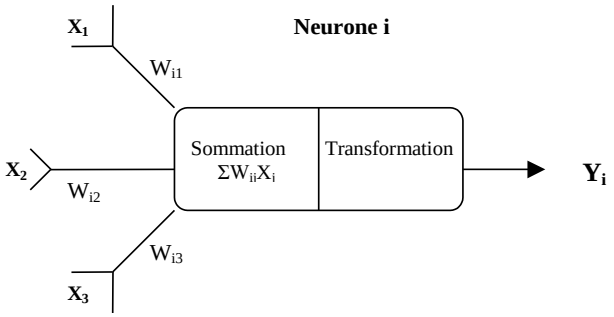


Figure I.17. Modèle du neurone formel (McCulloch et Pitts, 1943).

Les entrées Xj au neurone *i* sont des sorties des neurones *j* du même réseau, ou d'un autre réseau, ou encore des entrées extérieures. Les connections traduisent l'influence de l'environnement extérieur au neurone et permettent de calculer son entrée globale. À chacune de ces entrées *j* est associé un poids W_{ij} qui détermine l'intensité de cette influence. L'entrée d'un neurone est fonction des signaux provenant des autres neurones et des intensités des connections. La fonction liant ces quantités est la somme des entrées pondérées de leurs poids correspondants. La fonction d'entrée totale peut donc s'écrire comme suit :

$$S_i = \sum_j W_{ij} X_i$$

I.5.2. Les réseaux multicouches

Apparus en 1986, les réseaux multicouches sont les plus employés (Brookes et al.,2016). Ces modèles sont fortement inspirés des études biologiques du système visuel. Constitués par plusieurs couches, ces réseaux présentent une solution aux limites posées par le perceptron. À la différence des autres réseaux, ils contiennent des couches internes, dites couches cachées. Les neurones d'une même couche ne sont pas reliés entre eux. Les réseaux multicouches (Figure I.18) sont composés

- d'une couche d'entrée dont les neurones reçoivent l'information présentée au réseau ;
- d'une couche de sortie qui fournit les résultats des traitements effectués par le réseau ;
- d'un nombre variable de couches intermédiaires (couches cachées).

Les neurones de chaque couche sont complètement connectés à ceux de la couche suivante. L'information se transmet de la couche d'entrée vers la couche de sortie. On parle d'une propagation en avant, d'où le nom approprié en anglais "feed forward neural networks" (réseaux de neurones nourris vers l'avant).

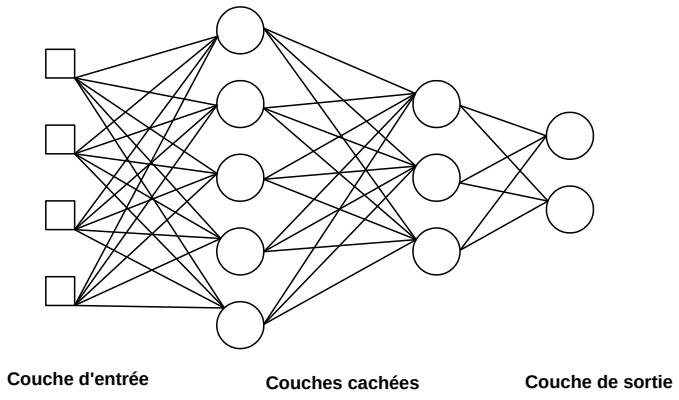


Figure. I.18. Schéma d'un réseau multicouche.

I.5.3. Application des réseaux de neurones artificiels

Étant donné que les RNA peuvent prévenir les modèles à partir de séries complexes de données analytiques, elles deviennent très utiles dans l'analyse de données dans la recherche pharmacologique en raison de leur capacité à reconnaître même les relations

non linéaires à partir de données bruyantes. Par exemple, les RNA peuvent être appliquées dans l'analyse des données spectrales d'échantillons multi-composants tels que des mélanges, pour la quantification des concentrations dans le mélange en utilisant l'ensemble du spectre dans le processus d'identification (Hasanjani et Sohrabi, 2017). Hasani et al. (2007) ont utilisé les RNA pour la détection et l'étalonnage des acides aminés avec des structures et des spectres similaires tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine. En outre, selon les mêmes auteurs, les RNA sont capables d'aider à déterminer les concentrations d'un échantillon chiral et d'un excès énantiomérique dans un spectrophotomètre à unique mesure en raison de leur capacité à identifier les relations non linéaires.

Les RNA peuvent également être utilisées comme méthode d'optimisation pour la sélection des conditions de gradient optimales pour les séparations d'anions en chromatographie (Bolanca et al., 2008). Les RNA avec une architecture de 1 à 10-9 ont été jugées rapides et précis dans la prévision des temps de rétention pour les anions en chromatographie ionique à élution à gradient linéaire avec des éluants hydroxylés. Tham et Agatonovic-Kustrin et al., (2002) ont appliqué des RNA dans une relation quantitative de l'élution par gradient des structures des composés tels que les dérivés de phényl thiocarbamyl-acides aminés avec une estimation des temps de rétention chromatographique. Cette étude a révélé que l'erreur quadratique moyenne RMSE (Root mean square error) de l'ensemble de formation et de test était respectivement de 1.773 et -0.8377. Sur la base des RMS des ensembles d'apprentissage et de test et avec une corrélation élevée entre les valeurs prédites et expérimentales (R>0,97), la séparation chromatographique peut être prédite par les RNA. De même, les RNA peuvent aider à optimiser l'HPLC en trouvant une corrélation entre le comportement chromatographique des solutés (facteurs de capacité), la composition de la phase mobile et le pH pour prédire les temps de rétention.

En conclusion, les RNA peuvent servir d'outil génial dans l'étape de l'optimisation du développement de la méthode pour aider à gagner du temps et des coûts pendant cette étape de la recherche. En outre, les RNA peuvent aider à détecter les relations dans

l'analyse des séries de données difficiles telles que la caractérisation des mélanges. Cette versatilité passionnante permet aux RNA d'être utilisées presque dans tous les domaines de la science nécessitant une analyse de données importantes, variables et / ou multivariées ; Ainsi, les applications des RNA devraient continuer dans de nombreuses autres disciplines.

II. PROCEDURE EXPERIMENTALE

II. PROCEDURE EXPERIMENTALE

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Matière végétale

La matière végétale utilisée est l'ail frais local (Algérien), récolté dans la région de la wilaya de Médéa au mois de septembre 2013. L'extrait a été obtenu par écrasement et macération d'une quantité de bulbes d'ail frais conservé dans un endroit sec et frais.



Figure II.1 variétés d'ail de la région de Médéa-Algérie (2013).

III.1.2. Produits utilisés

Les produits chimiques utilisés pour l'extraction, pour l'analyse et pour l'étude pharmacologique de l'ail sont présentés sur le tableau II.1

Tableau II.1. Les produits chimiques utilisés pour l'extraction, l'analyse et pour l'étude. pharmacologique de l'ail.

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 diabète chez les rats.
Acide Gallique	Sigma Aldrich laboratoire	Standard pour polyphénols
Quarcitine	Sigma Aldrich laboratoire	Standard pour flavonoïdes
Reactif de Folin-Ciocalteu	Sigma Aldrich laboratoire	Dosage des polyphénols
Alliine	Sigma Aldrich laboratoire	Dosage d'allicine et activité hépatoprotectric
DPPH	Sigma Aldrich laboratoire	Test pour l'activité antioxydante
ABTS	Sigma Aldrich laboratoire	Test pour l'activité antioxydante
Trolox	Sigma Aldrich laboratoire	Test pour l'activité antioxydante
Extrait Methanolique	Institut européen des antioxydant	Test pour l'activité antioxydante

II.1.3. Matériels microbiologiques

Les Produits utilisé pour les tests microbiologiques sont présentés sur le tableau II.2.

Tableau II.2. Produits utilisés lors des analyses microbiologiques.

Milieu de culture	Soja agar (Difco™)
	Gélose Sabauraud (Difco™)
Solvants	Myristate (Merck)
	Milieu tampon pH 6
	Milieu tampon pH 8
Souches bacteriennes	*Staphylococcus aureus* (ATCC 12228)
	Bacillis subtilis (ATCC 6633)
	Escherichia coli (ATCC 1536)

II.1.4. Matériels

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

Tableau II.3. Appareillages utilisés.

Appareillage	Marque
Homogéneiseur	IKA T18basic ULTRA-TURRAX
Evaporateur rotatif	IK. WERKE RV05-ST
pH – mètre	Hanna pH 209
Spectrophotomètre UV-Visible	Perkin Elmer lambda 25
Spectromètre FTIR	Perkin Elmer FTIR Spectrum BX
Chromatographe (HPLC)	Shimadzu LC-10A avec détecteur UV-VIS type SPD
Lecteur des zones d'inhibition	Fisher L-Lilly
Bain marie réglé à 37 ° C	Memmert Type WNB 14 F-NR LY 12.0671 230v-freq 50
Spectrophotometer	Model Sp 3000 nano OPTIMA feq 50/60 HZ 1A

II.2. Protocole expérimental

II.2.1. Préparation de l'extrait d'ail

L'ail a été utilisé depuis plusieurs centaines d'années pour traiter divers problèmes de santé. Un très grand nombre d'études ont été réalisées afin de mieux connaître les principes actifs de l'ail et leurs effets physiologiques. Dans ces études, l'ail a été utilisé sous ses deux formes : en tant que plante fraiche et sous forme d'extrait.

Plusieurs expériences ont été réalisées pour déterminer le rapport optimal d'extraction en faisant varier le solvant organique. Pour ce faire, le même protocole expérimental (Figure II.2) a été maintenu à l'exception du solvant organique utilisé.

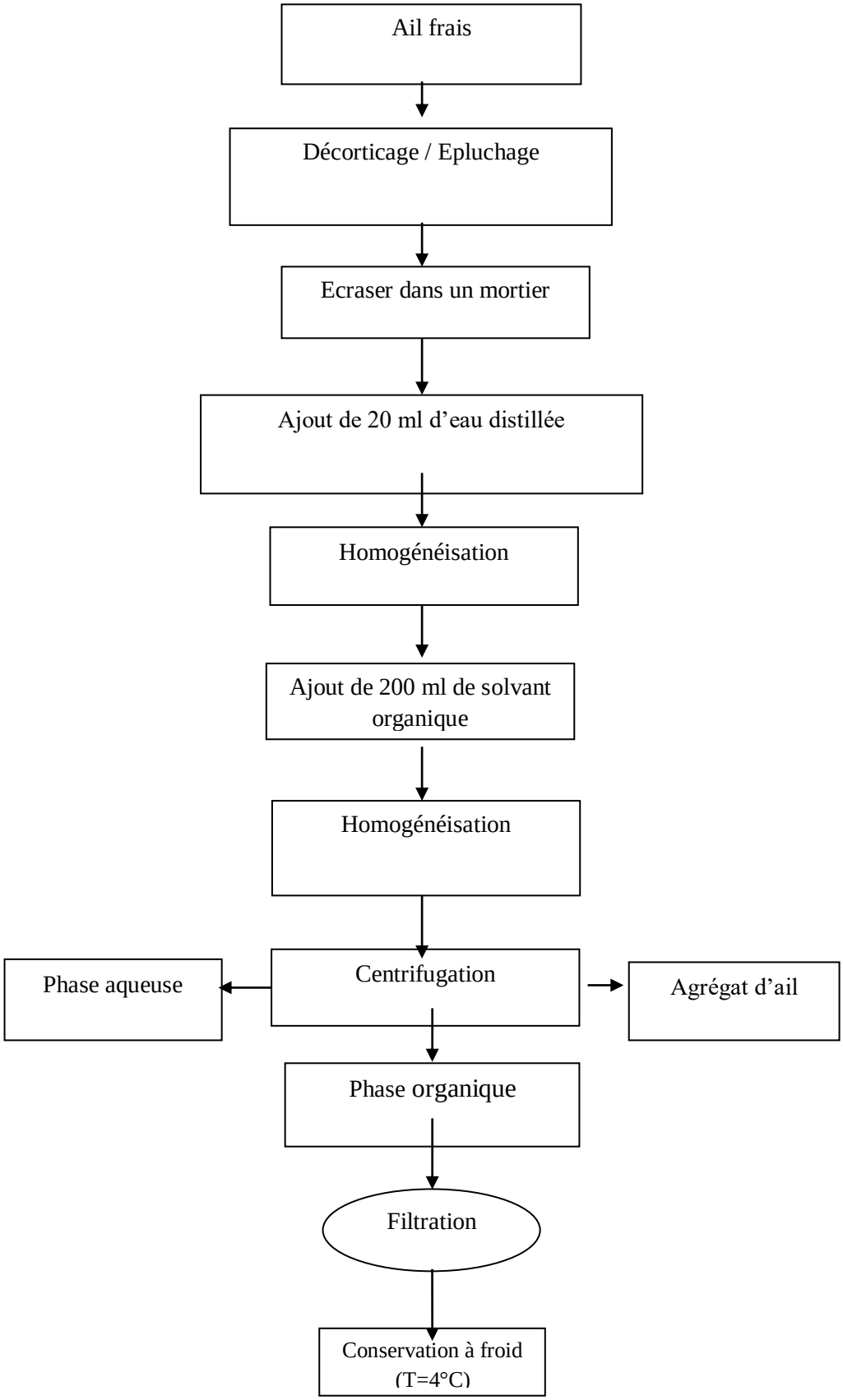


Figure II.2. Différentes étapes d'optimisation de préparation de l'extrait d'ail.

II.2.2. Caractérisation de l'extrait d'ail

II.2.2.1. Rendement des différents extraits d'ail

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 (pharmacopée européenne. 2001).

$$R(\%) = \frac{P_0 - P_1}{P_0} * 100$$

P_0 : poids initial

P_1 : poids après extraction et séchage

II.2.2.2. Méthodes d'analyses physicochimiques (spectroscopiques)

Les méthodes spectroscopiques les plus fréquemment rencontrées en chimie sont : la spectroscopie infrarouge (IR), la spectrophotométrie ultraviolet-visible, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) ou encore la spectroscopie de masse (SM).

L'objectif de ces méthodes est de tirer des informations des spectres obtenus avec chaque spectroscopie. Ces spectres fournissent des informations sur la structure, d'autres sur la présence des groupements fonctionnels, … etc. De plus, certaines méthodes permettent un suivi quantitatif de réactions.

Pour la caractérisation et la mise en évidence des familles chimiques de l'extrait d'ail, nous avons utilisé les méthodes disponibles au niveau du complexe antibiotical de Médéa (SAIDAL) à savoir : la Spectroscopie UV-visible, la Spectroscopie Infrarouge (IR) et la Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

II.2.2.2.1. Spectroscopie UV-visible

La spectrophotométrie UV-visible est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance (ou la densité optique) d'une solution de substance chimique donnée. Dans le but de déterminer la longueur d'onde maximale de l'extrait d'ail, l'analyse a été faite pour une longueur d'onde comprise entre 200 et 400nm. Les mesures ont été réalisées dans des cellules en quartz dont le trajet optique est de 1cm.

II.2.2.2.2. Spectroscopie IR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est la technique utilisée pour obtenir le spectre d'absorption ou d'émission d'un échantillon liquide d'extrait d'ail. Pour ce faire, 0,025 mg de l'extrait d'ail à analyser a été introduite dans une pastille de KBr préalablement préparée par compression. La lecture du spectre d'émission a été réalisée dans le but d'étudier la composition de notre extrait.

II.2.2.2.3. Analyse par chromatographie liquide à haute performance

La séparation et la quantification de tous les thiosulfinates détectables présents dans l'ail ont été signalées pour la première fois en 1990 avec une méthode standard pour la quantification de l'allicine en utilisant un standard externe.

L'extrait d'ail préparé est analysé par injection d'une quantité de 20µl d'échantillon dans un chromatogramme (HPLC). Afin d'étudier la composition chimique de notre extrait, le spectre obtenu est comparé avec les spectres des étalons (Quercétine, acide gallique et allicine) (voir tableaux II.4 et II.5).

Tableau II.4. Conditions d'analyses par HPLC- Allicine - (SAIDAL Médéa).

Colonne	C_{18} (phases inverses) - longueur : 12.5cm - Ø int : 4.6 mm
Phase mobile	Acétonitrile / eau 60/40 (v/v)
Débit	3 ml/min
Température de trava	25°C
Volume injecté	20 µl
Longueur d'onde	254 nm

Tableau II.5 : Conditions d'analyse par HPLC- Quercétine, acide gallique - (SAIDAL Médéa).

Colonne	Nucléosil 100-5 C18
Phase mobile	Méthanol/eau (60/40)
Débit de la phase mobile	1 ml/min
Débit d'injection (volume injecté)	20 µl

II.3. Pouvoir antioxydant de l'ail

II.3.1. Préparation des échantillons d'ail

Pour la préparation d'extraits d'ail à différentes concentrations, une série de dilutions à partir de chaque extrait d'ail obtenu précédemment a été faite (Aqueux, methanolique, ethanolique, diéther ethylique mélange eau méthanol et mélange eaux éthanol). Par la suite, six flacons contenants chacun 0,1ml d'extrait d'ail à différentes concentrations ont été préparés (100%, 80%, 50%,25%, 10%, 5%) (Figure II-3). Une troisième série de cinq flacons contenant chacun un échantillon d'extrait d'ail a été exposé à différentes températures (4°C, 25°C, 35°C, 50°C, 75°C).

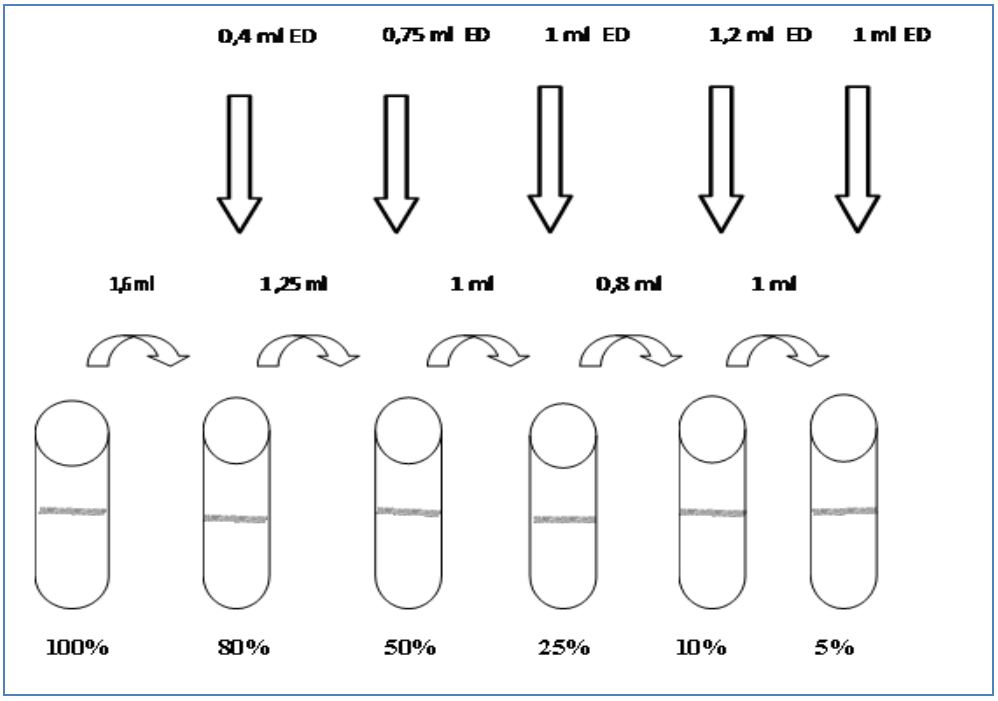


Figure II.3. Etapes de dilution de l'extrait d'ail.

II.3.2. Étude de la teneur en composés phénoliques et du potentiel antioxydant de l'ail

II.3.2.1. Teneur totale en phénol

La méthode de Singleton et Rossi modifiée (1965) a été utilisée pour la détermination de la teneur totale en phénol des extraits d'ail en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. Un mélange de 0,1 ml d'extrait d'ail (à différentes températures) avec 2ml d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 2% (2 g dans 100 ml d'eau distillée) est agité sur vortex. Ensuite, le réactif de Folin–Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) a été ajouté. L'ensemble a été incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 750nm.

Une courbe d'étalonnage a été établie en parallèle en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0-1 mg/ml) dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par gramme du poids sec de la plante en appliquant la formule suivante :

$$C = \frac{c * V}{m}$$

C : La teneur totale en phénols (mg d'acide gallique/g de matière sèche).

c : La concentration de l'acide gallique déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume de l'extrait aqueux d'ail

m : Le poids de la matière sèche (g).

II.3.2.2. La Teneur totale en flavonoïdes

Les flavonoïdes auxquels on attribue les effets biologiques de l'extrait d'ail ont été recherchés par la méthode de $AlCl_3$ (Figure II.4) (Hung et al., 2004).

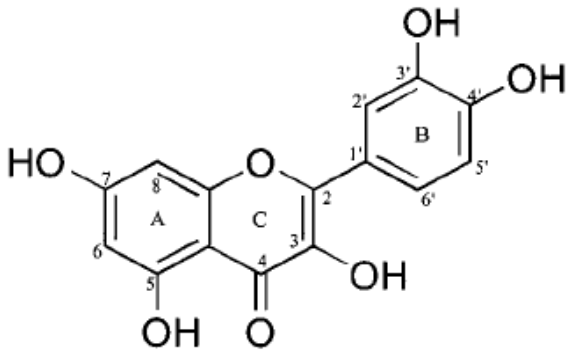


Figure II.4. Structure générale du noyau des flavonoïdes (Heim et al., 2002).

Pour la détermination de la teneur en flavonoïdes de l'extrait d'ail aqueux, 1ml de la solution de l'extrait a été ajouté à un volume égal d'une solution de 2% d'$AlCl_3$ $6H_2O$ (2gr dans 100ml du méthanol).

Après incubation à température ambiante pendant 10 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 430 nm. La teneur en composés flavonoïdes totaux est exprimée en m/g équivalent de quercétine (QE) de GH sec.

Un grand nombre d'effets biologiques de la quercétine et d'autres flavonoïdes peuvent être expliqués par leur activité antioxydante et leur capacité à détruire les radicaux libres. La fonction antioxydante de la quercétine est renforcée par la vitamine C. Ce renforcement est attribué à la capacité de la vitamine C à réduire la quercétine oxydée et à celle de la quercétine d'inhiber la photooxydation de la vitamine C. Des effets bénéfiques encore plus puissants de la quercétine comme destructeur de radicaux libres et/ou comme inhibiteur de la peroxydation lipidique ont été observés en association avec la vitamine E et la vitamine C.

D'autre part, la quercétine a été utilisée comme standards, pour l'obtention de la courbe d'étalonnage. La courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations (0 à 350 µg/ml) et dans les mêmes conditions opératoires utilisées pour les échantillons servira à la quantification des flavonoïdes. La concentration des flavonoïdes de nos extraits exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par ml d'extrait est déduite à partir de cette courbe d'étalonnage.

II.3.3. Evaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait d'ail

Le potentiel antioxydant des extraits de plantes et des composés purs peut être mesuré en utilisant de nombreux essais in vitro. Chacun de ces tests est basé sur une caractéristique d'activité antioxydante, comme la capacité à éliminer les radicaux libres ou à inhiber la peroxydation des lipides. Cependant, les activités antioxydantes totales des plantes ne peuvent être évidentes par une méthode unique en raison de la nature complexe des produits phytochimiques (Nataraj et al, 2013). Deux ou plusieurs méthodes devraient toujours être utilisées afin d'évaluer les effets antioxydants totaux des végétaux.

En outre, bien que plusieurs méthodes aient été utilisées pour tester les activités antioxydantes de divers composés chimiques, ces dernières ne peuvent pas être utilisées en tant que telles pour mesurer l'activité antioxydante des extraits de plantes en raison de leur composition complexe (Wong-Paz et al., 2015). En outre, un bon nombre des méthodes utilisées sont soit trop coûteuses, soit trop complexes pour tester de grandes séries d'échantillons.

Dans cette étude, pour déterminer les activités antioxydantes des différents échantillons de l'ail, nous avons évalué l'adéquation de trois méthodes différentes (test de puissance de réduction de fer RP (Réduction Power), méthode de piégeage du radical libre $DPPH^{\bullet}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) et méthode de piégeage du radical cationique $ABTS^{\bullet+}$. Les plantes Allium ont été choisies en raison de leur potentiel antioxydant élevé. De plus, le rôle des phénols dans l'antioxydation et / ou dans l'activité de balayage radicalaire a été étudié.

II.3.3.1. Test de puissance de réduction de fer -Réduction Power (RP)

Le pouvoir réducteur mesure la capacité qu'a un antioxydant à donner un électron (Balasundram et al., 2005). La détermination du pouvoir réducteur est réalisée selon la méthode d'OKTAY (Figure II.5) (OKTAY et al., 2003).

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

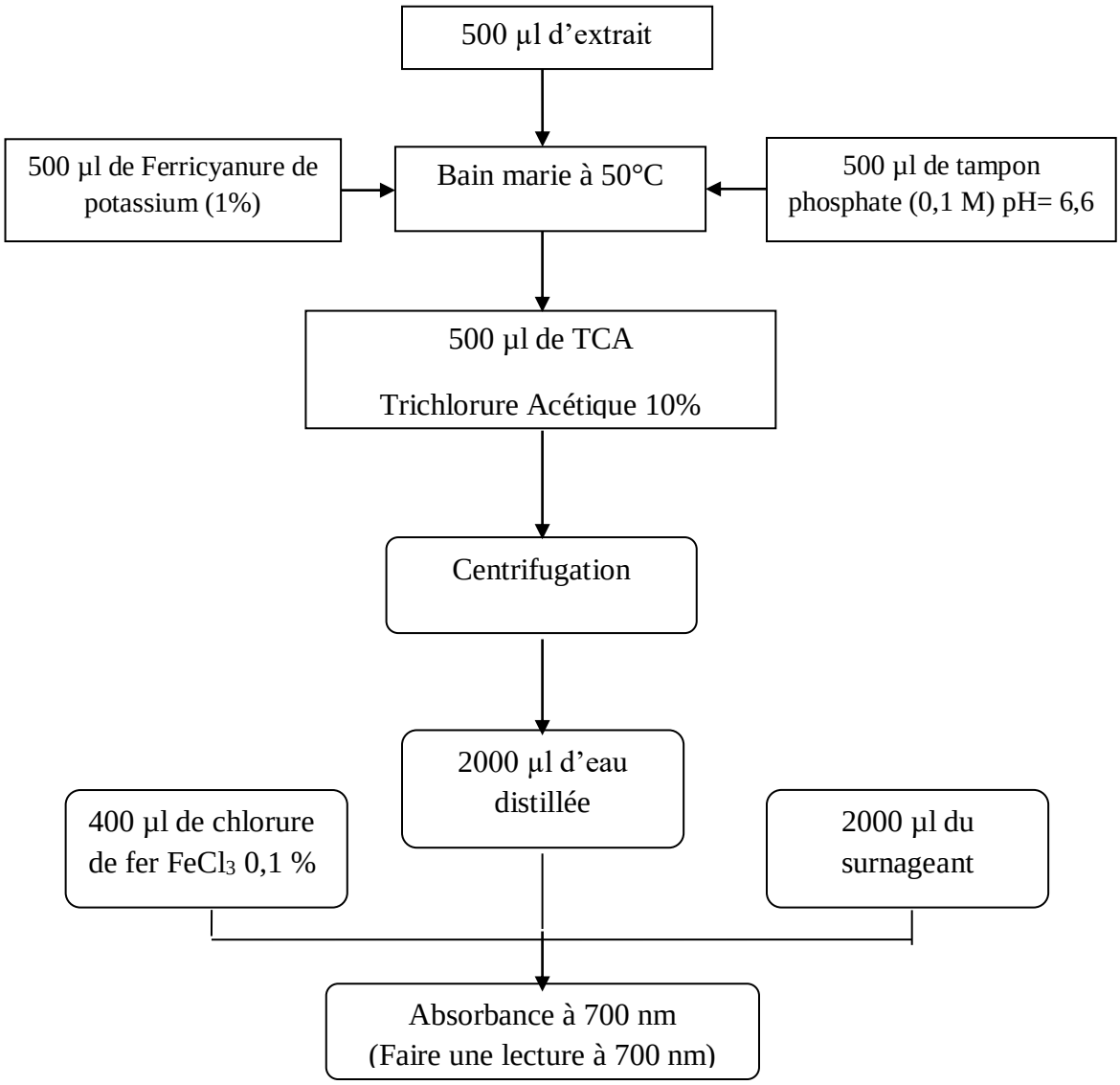


Figure II.5. Protocole de détermination du pouvoir réducteur OKTAY et al., (2003).

- Le même protocole expérimental a été utilisé pour le blanc en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée.
- L'extrait est ensuite remplacé par des solvants purs : méthanol éthanols et diethyl ether.

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction du fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif. Par la suite,

le pouvoir réducteur de l'ail a été comparé par un antioxydant utilisé en industrie alimentaire : l'acide ascorbique (Vitamine C).

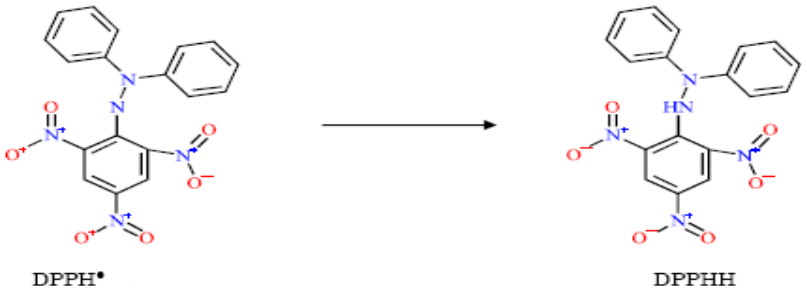
Le procédé consiste à faire diluer 0,5 g/ml d'acide ascorbique jusqu'à l'obtention d'une solution de concentration de 0,0625 g/ml. Le même protocole du premier test a été utilisé. La longueur d'onde d'absorption de la solution méthanolique de l'acide ascorbique est λ=686 nm.

La concentration $RP_{0.5}$ est définie comme étant la concentration effective à laquelle l'absorbance est de 0,5 pour réduire la concentration initiale du thiocyanate ferrique ; c'est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

II.3.3.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH$^{\bullet+}$ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire (antioxydante) de l'extrait d'ail a été déterminée par le test au DPPH selon un protocole légèrement modifié décrit par (Sanchez Moreno et al.1998). Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH$^{\bullet+}$).

Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Figure II.6).



2.2 diphenyl-1-picrylhydrazyl
Couleur Violette

diphenyl-picrylhydrazine
couleur jaune

Figure II.6. Schéma de réduction du DPPH en présence d'un antioxydant.

Une quantité de DPPH de concentration égale à 0 ,0024mg/ml est dissoute dans du méthanol sous agitation et conservée dans un réfrigérateur à une température de 4°C à l'abri de la lumière avant utilisation (Figure II.7).



Figure II.7. Solution méthanolique du DPPH.

La lecture de l'absorbance pour chaque concentration contre un blanc déjà préparé est faite à 517nm après 30 minutes d'incubation à une température ambiante. La longueur d'onde maximale utilisée a été déjà déterminée par analyse spectroscopique UV-Visible. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) :

$$\%\,d'inhibition\ radical\ DPPH = \frac{Absorbance\,du\,controle - Absorbance\,de\,l'échantillon}{Absorbance\,du\,controle}$$

Les résultats de l'activité antioxydante ont été évalués en IC_{50}, c'est-à-dire la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50% la concentration initiale de DPPH•+.

II.3.3.3. Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS$^{\bullet+}$ (Acide 2, 2-azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique))

Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants (extraits d'ail) à neutraliser le radical ABTS$^{\bullet+}$.

Dans ce test, l'ABTS oxydé est intensivement coloré, et l'activité antioxydante est mesurée comme étant la capacité des composés testés à diminuer l'intensité de la coloration, relativement au Trolox**.**

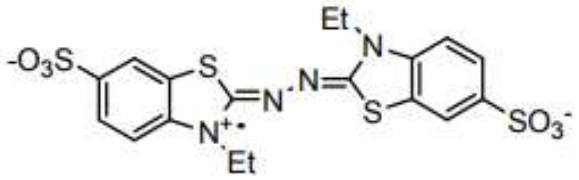


Figure II.8. Structure du radical-cation ABTS.

Le cation radical ABTS (Figure II.8) a été préparé en mélangeant à volume égal une solution ABTS 7 mM et une solution de persulfate de potassium $K_2S_2O_8$ à 2,45 mM. Le tout a été conservé à l'obscurité à température ambiante pendant 16 h, avant utilisation. Le mélange obtenu a été dilué e avec l'éthanol pour obtenir une absorbance comprise entre 0.7 et 0.8 à 734 nm. 990 µl de cette solution fraichement préparée ont été ajoutés à 10 µl d'extrait d'ail. La lecture de l'absorbance pour différentes concentrations a été faite à 517nm après 6 minutes d'incubation et à une température ambiante. Pour chaque concentration, le test est répété 3fois. Le pourcentage d'inhibition d'ABTS•+ a été calculé comme suit :

$$\%\,d'inhibition\ radical\ ABTS = \frac{Absorbance\,du\,controle - Absorbance\,de\,l'échantillon}{Absorbance\,du\,controle}$$

II.3.3.4. Préparation des échantillons d'acide ascorbique (Vitamine C)

Dans le but de comparer l'effet antioxydant des extraits d'ail obtenus, l'effet antioxydant de l'acide ascorbique (vitamine C) connu par son effet anti radicalaire très fort a été étudié. Plusieurs dilutions d'acide ascorbique à faible concentrations exprimées en mg/ml (0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.08, 0.06 et 0.04) ont été préparées selon le protocole expérimental disponible au complexe antibiotique SAIDAL.

II.3.3.4.1. Activité anti radicalaire de la vitamine C

Un volume de 0,1ml de chaque solution aqueuse d'acide ascorbique (standard) à différentes concentrations est ajouté à 3.9ml de la solution méthanolique (0,024mg /ml) de chaque oxydant de références testé (DPPH, d'ABTS et test RP). En

parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 0,1 ml d'eau distillée avec 3,9 ml de la solution méthanolique du DPPH.

II.3.3.5. Capacité antioxydante en équivalent Trolox

II.3.3.5.1. Courbe d'étalonnage du Trolox

Le trolox (15,60 mg) est solubilisé dans un volume de 25 mL d'éthanol afin d'obtenir une solution à 2,5 mM. Le pourcentage d'inhibition pour 1µmol/L a été déterminé à partir de la courbe d'étalonnage du trolox obtenue pour différentes dilutions.

La concentration finale du Trolox dans le DPPH ainsi que dans l'ABTS doit être comprise entre 0 et 15µM.

II.3.3.5.2. TEAC (capacité antioxydante en équivalent Trolox*)* par l'utilisation du $ABTS^{\bullet+}$ ou $DPPH^{\bullet+}$

Principe de la méthode TEAC

La méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) est utilisée pour évaluer l'activité antioxydante totale de l'extrait, déduite de sa capacité à inhiber les radicaux $DPPH^{\bullet+}$ et $ABTS^{\bullet+}$ (Figure II.9). Ces derniers, obtenus respectivement à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline- 6-sulfonique)) ou du DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) et comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8- tétraméthylchroman-2-carboxylique) possède une structure moléculaire cyclique similaire à celle de la vitamine E.

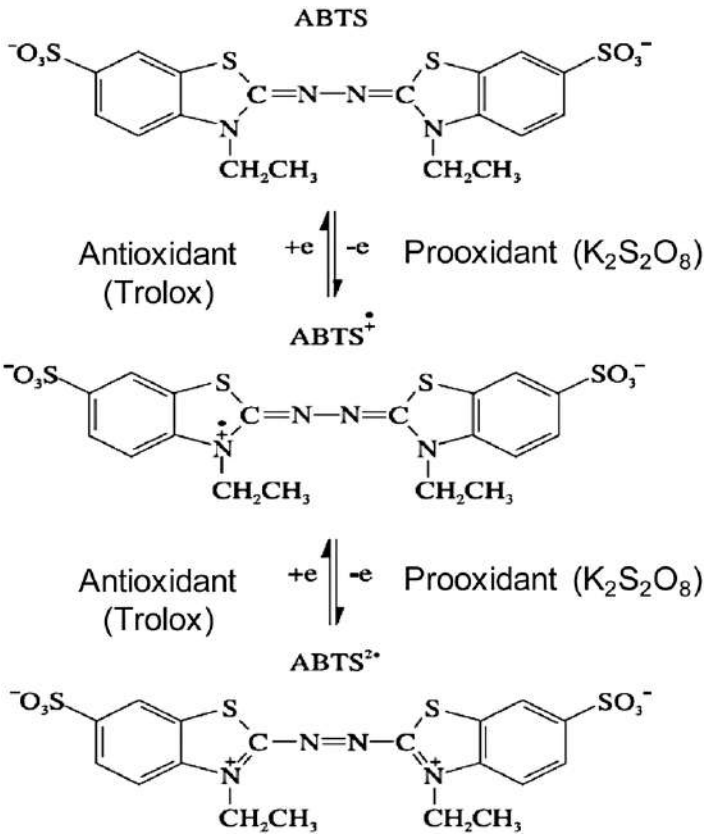


Figure II.9. Mécanisme impliqué dans l'activation de l'ABTS dans des conditions pro-oxydantes et sous l'action anti-oxydante de Trolox.

II.4. Effets préventifs et curatifs de l'extrait d'ail sur l'hépatotoxicité médicamenteuse induite par le paracétamol

Dans cette partie, l'effet de l'ail sur l'hépatotoxicité médicamenteuse induite par un médicament largement utilisé appartenant à la famille des anti-inflammatoires a été étudié : le paracétamol.

Le paracétamol ou l'acétaminophène est un médicament analgésique couramment utilisé, connu par son effet à provoquer une nécrose hépatique centrylobulaire après surdosage (Sreedevi et al., 2009). Sa toxicité provoque également de nombreuses admissions hospitalières d'urgence et continue d'être associée à une mortalité élevée. Son hépatotoxicité a été liée à la production d'un métabolite intermédiaire hautement réactif de la N-acétyl-p-benzoquinone imine formé par l'oxydation médiée par le cytochrome P450 (Kuriakose et Kurup., 2010).

II.4.1. Préparation de l'extrait

Des gousses d'ail frais collectées, séchées, pulvérisées et broyées dans un mortier sont soumises à une macération froide pendant 4 jours en utilisant de l'eau distillée. Le macéra obtenu a été concentré à l'aide d'une centrifugeuse puis filtré sur papier filtre de 0,45 µm, et a été maintenu au réfrigérateur à une température de 4°C.

II.4.2. Matériel animal

Cette étude a été réalisée sur des rats Wistar albinos mâles de 200 g comme poids moyen, achetés auprès du centre national pour la recherche et le développement d'El-Harrach (CRD). Ils avaient un libre accès à l'eau et à la nourriture. La température de l'animalerie était maintenue à 22 °C.

II.4.3. Obtention de la dose toxique du paracétamol.

Les comprimés du paracétamol 500mg (Figure II.10) ont été réduits en poudre. La DL_{50} (dose létale médiane) a été déterminée pour les rats intoxiqués par le Paralgan 500 mg. En considérant 7000 mg de paracétamol pour 1 kg de poids corporel (PC) de rat, il a été constaté la mort de 5 rats sur les 11 choisis pour l'expérience.

La dose de paracétamol a été alors réduite jusqu'à 2000 mg pour 1 kg du PC de rat pour l'induction de la toxicité hépatique avec le paracétamol. Quant aux doses de l'extrait de l'ail, les quantités de cet extrait ont été corrélées à la quantité d'ail utilisée pour corriger des lésions hépatiques des rats Wistar intoxiqués avec le paracétamol au cours des précédentes études.

Les rats ont été divisés en six groupes, avec six dans chaque groupe. Le schéma d'alimentation est le suivant :

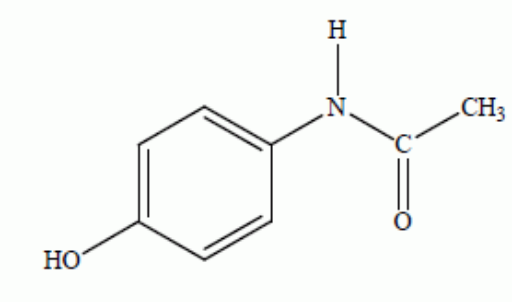


Figure II.10. Molécule du paracétamol.

- **Lot 1** : Des rats témoins normaux qui ont reçu 2ml d'extrait d'ail (0,1 g/200 g PC) pendant 42 jours.
- **Lot 2** : des rats qui ont reçu 2 g/kg PC du paracétamol (40%) pendant une période de 42 jours suivi d'un arrêt de traitement.
- **Lot 3 (06 rats) :** A reçu 2g/kg PC du paracétamol par jour pendant 21 jours puis un traitement avec 100 mg/kg PC d'extrait pendant trois semaines.
- **Lot 4 (06 rats) :** les rats ont reçu par voie orale 2 g de paracétamol par kg de poids corporel ensuite un traitement de 2 ml de l'extrait d'ail dilué à 50% du précédent pendant 21 jours.
- **Lot 5 (06 rats) :** animaux témoins qui n'ont reçus ni paracétamol ni extrait d'ail.
- **Lot 6 (06 rats) :** les rats ont reçu par voie orale 2 g du paracétamol par kg de poids corporel ensuite un traitement de 1.5 mg/kg PC de quercétine (QE) pendant 42jours.
- **Lot 7 (06 rats) :** les rats ont reçu par voie orale 2 g du paracétamol par kg de poids corporel ensuite un traitement de 1.5 mg/kg PC d'un extrait de polyphenols pendant 42 jours.
- **Lot 8 (06 rats) :** groupe des rats normaux qui ont reçu 2ml d'extrait d'ail (0,1 g/200 g PC) pendant 42 jours, les trois dernières semaines simultanément avec une administration quotidienne de 2g par kg de poids corporel de paracétamol.

II.4.4. Évaluation de la fonction hépatique.

Les dosages biochimiques des enzymes transaminases (GOT, GPT) ont été réalisés après un prélèvement sanguin chez les rats chaque semaine. Le sang a été prélevé au niveau du sinus retro orbitaire du rat à l'aide d'un tube capillaire et a été laissé coaguler à température ambiante. Le sérum a été ensuite séparé par centrifugation à 2500 tr/min pendant 10 minutes.

Les analyses ont été effectuées dans un laboratoire d'analyse médicale par un automate (Erba Mannheim XL System Packs) lié à un logiciel et à un détecteur UV.

II.5. Effet antidiabétique de l'ail

La présente étude a deux objectifs : le premier consiste à évaluer expérimentalement l'effet antidiabétique de l'extrait d'ail utilisé chez les rats diabétiques induits par l'alloxane et à comparer son effet avec un médicament antidiabétique. Le deuxième objectif a été assigné à l'examen des connaissances actuelles sur le rôle des radicaux libres et du stress oxydatif dans la pathogenèse du diabète et de ses complications et à la relation entre les mécanismes antioxydants et le diabète pour montrer l'importance des mécanismes d'action de l'activité antioxydante dans le traitement de cette maladie.

II.5.1. Préparation de l'extrait de l'ail

A. sativum L ont été recueillis dans la région de Benchicao (Médéa, Algérie) en mai 2013. Des bulbes d'ail frais ont été décollés, tranchés et broyés dans une pâte et mis en suspension dans de l'eau distillée pendant 24 heures à une température de 4±0,5°C. Le macéra obtenu a été filtré à travers un gaze et ensuite à travers un microfiltre de 0,45 micromètre de diamètre. L'extrait aqueux d'ail obtenu est stocké à 4±0,5°C jusqu'à utilisation.

II.5.2. Réactifs

L'alloxan (2,4,5,6-tétraxypyrimidine, -dioxyuracile 5-6) nous a été fourni par l'Institut Pasteur d'Alger. Le médicament antidiabétique (metformine HCl 850 mg) a été ramené du laboratoire de toxicologie animale du complexe antibiotical SAIDAL de Médéa, Algérie.

II.5.3. Materiel Animal

Des rats Wistar de huit semaines ont été achetés auprès du centre national pour la recherche et le développement d'El-Harrach (CRD). Ils ont été logés au laboratoire de toxicologie animale de Médéa dans des cages propres à température ambiante de 25 ± 1°C. Ils ont eu l'accès à l'eau et à l'alimentation standard pour rats et ont été laissés s'adapter au nouvel environnement pendant une semaine avant le début des expériences.

II.5.4. Critères de sélection des Rats

Dans cette étude, le taux de glycémie, de cholestérolémie et de triglycérides étaient standard (Tableau II.6) pour des rats adultes mâles, sains, type Wistar albinos âgés de 2 à 3 mois et pesant de 200 à 260 g. Les rats anormaux ont été exclus.

Tableau II.6. Normes pour la glycémie, le cholestérol et les triglycérides chez les rats.

	Poids (g)	Glycémie (g/l)	cholestérol (g/l)	Triglycéride (g/l)
Groupe 1	225 ± 25^{b}	1.15 ± 0.10^{a}	1.20 ± 0.40^{a}	1.10 ± 0.20^{a}
Groupe 2	235 ± 1^{b}	1.20 ± 0.15^{a}	1.30 ± 0.50^{a}	1.35 ± 0.45^{b}
Groupe 3	225 ± 25^{b}	1.00 ± 0.20^{b}	1.15 ± 0.35^{b}	1.15 ± 0.25^{b}
Groupe 4	235 ± 25^{b}	1.10 ± 0.30^{a}	1.05 ± 0.25^{b}	1.25 ± 0.35^{b}

Les valeurs moyennes ± SD pour six rats par groupe
[a] Signification statistique ($p < 0.01$).
[b] Signification statistique < 0.05).

II.5.5. Induction du diabète

Le diabète a été induit par injection sous-cutanée (0,8g/kg du poids corporel) d'alloxane monohydraté à 98% à une concentration de 40 mg/ml. L'hyperglycémie a été confirmée par le taux élevé de glucose déterminé après 48 h.

II.5.6. Test de correction de la glycémie

Les animaux avec un taux de glycémie supérieur à (1,50 g/l) sont considérés comme diabétiques (Togashi et al., 2016). Les rats diabétiques et normaux ont été divisés en quatre groupes. Une administration orale (par gavage) avec l'extrait d'ail obtenu ou avec la Methformine a été effectuée quotidiennement pendant sept jours suivie d'une pesée quotidienne du poids des rats de chaque lot (Figure. II.11) :

- **Groupes 1 :** Rats diabétiques sans traitement. Établissement d'un modèle diabétique chez le rat.
- **Groupe 2 :** Rats diabétiques recevant par alimentation par gavage (0,8 g / kg de poids corporel) de l'extrait d'ail frais.
- **Groupe 3 :** Rats diabétiques recevant par gavage (0,05 g / kg de poids corporel) un médicament antidiabétique (Metformine HCl 850 mg).
- **Groupe4 :** Rats témoins normaux, traités avec de l'extrait d'ail.

- **Groupe 5** : Rats de contrôle normal sans injection d'alloxane et non traités avec de l'extrait d'ail.

Au cours des trois semaines de traitement, un suivi quotidien de l'évolution des rats alloxaniques pendant la période du traitement a été réalisée. La consommation d'eau, la nourriture et le poids des rats ont été contrôlés. Un test de glycémie a été effectué chaque semaine au cours du traitement et ensuite après celui-ci.

II.5.7. Analyse biochimique du sang.

La collecte du sang a été faite par rétro-orbitaire (Figure II.11) dans du tube capillaire héparinisé suivie d'une analyse de la glycémie dans une clinique médicale de Médéa. Les concentrations du glucose dans le sang ont été analysées par voie enzymatique en utilisant la méthode de Bergmeyer (1974). Le kit se compose d'une solution du glucose standard (1g/l) et d'un réactif composé de : phosphate 70 mmol/l, phénol 5 mmol/l, glucose oxydase> 10UI/ml, peroxydes> 1UI/ml, 4-minoantipyrine 0,4 mmol/l, pH 7,5.



Figure. II.11. Technique du prélèvement sanguin réalisé sur les rats.

II.5.8. Analyse des échantillons

Le sérum ou le plasma recueilli par une procédure standardisée est rapidement séparé des globules rouges pour éviter la glycolyse cellulaire. Le réactif stocké à température ambiante a été réparti dans des tubes. Ces derniers ont été incubés dans un bain d'eau avec agitation à 37°C pendant 10 minutes. L'absorbance des échantillons a été mesurée contre un réactif blanc à 500 nm (Tableau II.7).

Tableau II.7. Répartition des réactifs dans les tubes

	Blanc	**Etalon**	**Echantillon**
Echantillon	-	-	10 µl
Etalon glucose	-	10 µl	-
Réactif	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

La concentration en glucose de l'échantillon a été calculée selon la formule décrite par GOD-POD, méthode colorimétrique

Glucose (g/L) = (Absorbance de l'échantillon / Absorbance du Standard) x Conc du Std (g/L).

II.5.9. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été effectuées en trois essais. Les résultats de l'effet hypoglycémiant de l'extrait d'ail et de la metformine sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). L'évaluation statistique a été effectuée en utilisant ANOVA à sens unique (version PAST .17) pour analyser les différences entre les résultats expérimentaux obtenus. Les différences sont considérées comme significatives lorsque les valeurs de p (degré de signification) étaient inférieures à 0,05 ($p < 0,05$) et plus significatives lorsque les valeurs de p sont inférieures à 0,01 ($p < 0,01$).

II.6. Activité antibactérienne de l'ail.

Les gousses ont été pelées, tranchées et broyées dans une pâte et mises en suspension dans des solvants appropriés (Eau distillée, Methanol et Etnanol) pendant 24 heures à une température de 4 ± 0,5°C. La solution obtenue a été filtrée à travers une gaze et ensuite par un microfiltre de 0,45 micromètre. Les extraits aqueux, méthanolique et éthanolique d'ail ont été conservés à 4 ± 0,5°C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés.

II.6.1. Préparation de la souche de référence

Selon les recommandations de l'ATCC (American Type Culture Collection) : un système de lot de semences a été suivi de sorte que la souche de référence est sous-cultivée en plusieurs répétitions à la fois dans un passage. Seuls cinq passages sont autorisés à partir de la souche de référence, donc le risque d'altération phénotypique ou de mutation génétique est réduit au minimum. Une solution tamponnée de chlorure de sodium-peptone de pH = 7.0 a été utilisée pour préparer des suspensions témoins. Pour

obtenir une suspension de spores *d'Aspergillus Brasiliensis* (ATCC 16404), 0,005% de polysorbate 80 a été ajouté aux solutions tampons. La suspension a été maintenue dans un intervalle de température de 2 à 8°C pendant une période limitée. Pour vérifier les conditions de fonctionnement, un contrôle négatif est obtenu en remplaçant le diluant choisi dans la préparation à examiner. Aucune croissance microbienne n'a été observée.

II.6.2. Méthode microbiologique

La méthode de diffusion solide du dépôt sur les disques d'agar (6 mm de diamètre) imprégnés de substances antimicrobiennes a été employée. Dans cette étude, la gousse de soja Tropic a été utilisée. Les souches ont été choisies parmi les souches de référence listées dans l'institut American Type Culture Collection (ATCC), *E. coli* (ATCC 11105), *S.aureus* (ATCC 6633) et *B.subtilis* (ATCC 6538). Des diamètres d'inhibition ont été obtenus après un temps d'incubation de 18 heures. Ensuite, des quantités d'extrait d'ail obtenu ont été introduites dans des tubes à essais. Chaque tube a été maintenu à une température sélectionnée (4°C, 25°C, 37°C, 42°C et 75°C) pendant une durée totale de six heures. Des solutions d'extrait d'ail de concentrations décroissantes ont été préparées à partir des échantillons prélevés à un intervalle du temps d'une heure. Chaque solution a été obtenue en mélangeant 0,5 ml de la solution précédente avec 0,5 ml de myristate, un solvant organique utilisé en microbiologie, sans effet antimicrobien (Pharmacopée Européen 2007). Des boîtes de Pétri ont été préparées en déposant un disque vierge sur la surface de chacune d'elles ; Elles ont été inbibées par 25 µl de chacune de ces concentrations d'extrait d'ail à tester. La même méthode a été utilisée à différents intervalles de temps et des températures de 18 °C, 50 °C et 90 °C pour la même concentration d'extrait d'ail.

II.6.3. Détermination de la CMI

Le but de cette méthode est la détermination de la concentration la plus faible de l'extrait aqueux d'ail qui pourrait détruire les micro-organismes ou empêcher leur développement. Cette technique se pratique soit sur milieu solide ou liquide, mais la

plus économique est celle sur milieu solide qui permet de tester plusieurs souches bactériennes dans la même boîte**.** Dans ce travail, seul le milieu solide a été utilisé.

II.6.4. Modélisation neuronale

L'objectif de cette partie de l'étude est d'élaborer un modèle qui nous permettra de prédire la concentration minimale inhibitrice pour différentes valeurs de concentrations, de températures et du temps d'incubation à partir d'une base de données expérimentales de l'activité antibactérienne de plusieurs échantillons d'extrait d'ail, exposés pendant six heures à différentes températures et ce pour trois souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* (S.*aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*).

Trente ensembles de données expérimentales pour chaque souche ont été sélectionnés pour former la base de données finale (Tableau). Un réseau de perceptron multicouche (MLP) de trois couches a été choisi pour la modélisation. Il s'agit d'un réseau neuronal artificiel d'anticipation, en raison de ses excellentes capacités de généralisation non linéaire (Hamadache et al., 2016). La couche d'entrée est composée des variables suivantes : concentration, température et temps. La couche de sortie quant à elle est constituée des trois sorties suivantes : concentration minimale d'inhibition de l'extrait d'ail sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.

La performance du modèle a été évaluée par le coefficient de détermination R^2 (II.1) entre les valeurs prédites et expérimentales (Hamadache et al., 2016) et par la racine carrée de l'erreur quadratique moyenne RMSE (II.2) (Chai et Draxler, 2014 ; Teke, Yıldırım, Çelik, 2015). Ces deux paramètres sont donnés par les équations suivantes :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} (Y_i^{\exp} - Y_i^{pred})^2}{\sum_{i=1}^{n} (Y_i^{\exp} - \bar{Y}_i^{\exp})^2} \quad \text{(II.1)}$$

(II.2)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (Y_i^{\exp} - Y_{i=1}^{pred})^2}{n}}$$

où n est le nombre de composés dans l'ensemble de données ; Y_i^{exp} , Y_i^{pred} et $\bar{Y}_i^{exp}$ sont les valeurs expérimentales , prédites et moyenne respectivement.

III : RESULTATS ET DISCUSSION

III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Qualite de l'extrait obtenu avec differents solvants

L'extraction par solvant est la technique la plus utilisée pour l'isolement des composés antioxydants végétaux. Le rendement d'extraction et l'activité antioxydante de l'extrait dépendent fortement de la nature du solvant d'extraction, en raison des différentes polarités des composés végétaux.

Dans la première partie de cette étude, quatre solvants de polarités différentes ont été employés pour l'obtention d'un extrait d'ail à partir de l'ail rose frais. Ces solvants sont : l'éthanol (polarité de 5.2), le méthanol (polarité de 6.6), le diethyl ether (polarité de 5.4) et l'eau (polarité de 9.0). Un volume constitué de 50% du solvant et 50% d'eau distillée a été utilisé. Les résultats décrits dans la figure.III.1 montrent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur le rendement. Les solvants mixtes se sont montrés particulièrement efficaces. En effet, des rendements très élevés ont été obtenus dans le cas des mélanges constitués par : eau-méthanol et eau-éthanol suivi par les extraits purs du méthanol et de l'éthanol. Un rendement faible a été obtenu avec-l'extrait aqueux et le diéthyl éther. Les rendements élevés peuvent être attribués à l'augmentation de la polarité des solvants en présence de l'eau (Kim et al., 2004). Des essais effectués sur l'extrait d'ail obtenu, présente une très grande miscibilité dans beaucoup de solvants organiques notamment l'éthanol.

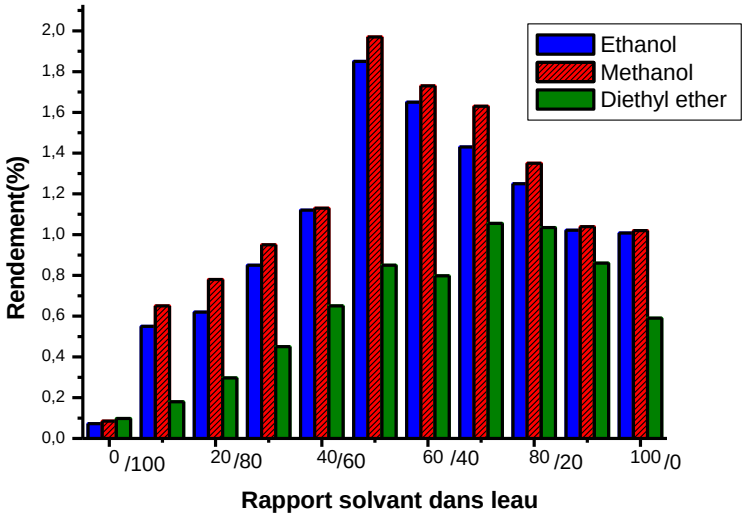


Figure.III.1. Influence de la nature du solvant et du rapport Solvant/Eau sur le rendement de l'extrait de l'ail obtenu.

III.1.2. Caractéristiques physicochimiques de l'extrait d'ail

III.1.2.1 Spectroscopie UV-Visible

Les spectres UV-Vis fournissent des informations sur la structure moléculaire, mais sont surtout utilisés pour une confirmation ou une identification grâce à des règles empiriques et à la comparaison avec des spectres de référence.

L'analyse spectroscopiques UV-Visible montre que les deux extraits aqueux et méthanolique absorbe dans la zone comprise entre 200 et 400 nm avec deux longueurs d'ondes maximales égales à 375,05 et 257,40 nm pour les extraits aqueux et méthanolique respectivement. Bien que les deux solvants absorbent à deux longueurs d'ondes différentes. Ceci est dû probablement aux caractéristiques de chaque solvant, la polarité de l'eau étant supérieure à celle du méthanol. Des résultats similaires ont été trouvés par (Sun et al., 2015) dans une étude faite sur l'influence des solvants sur la nature de l'extrait d'ail obtenu. L'allicine, composé principal à caractère thérapeutique de l'ail absorbe dans la zone comprise entre 240 et 254 nm (Bayan et al., 2014)

Une étude faite par (Gil-Ramírez et al., 2016) montre que dans le méthanol neutre, les composés flavoniques absorbent dans deux régions différentes du spectre ultra-violet. Ces régions se situent entre 300 et 385 nm et entre 250 et 280 nm. Il est reconnu que la

plupart des flavones et flavonols possèdent deux bandes d'absorption dans la région ultraviolet/visible : la bande I entre 230 nm et 385 nm, représentant la conjugaison entre les cycles B et C, et la bande II allant de 240 nm jusqu'à 280 nm représentant la conjugaison entre les cycles A et C. Une étude comparative entre les résultats obtenus avec ceux trouvés par Gil-Ramírez a permis de confirmer la présence des flavonoïdes contenant une conjugaison entre les cycles du type A et C dans l'extrait d'ail.

III.1.2.2. Spectroscopie infrarouge

Le spectre IR de l'extrait d'ail est représenté sur la figure III.2

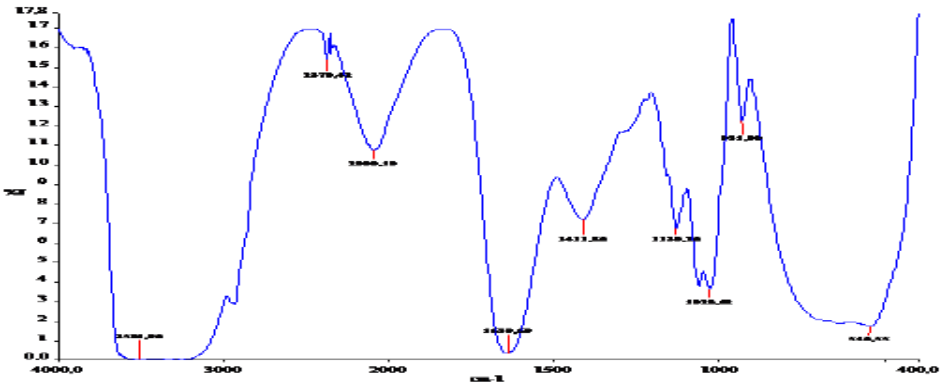


Figure.III.2 : Spectre IR de l'extrait d'ail.

Une large bande caractéristique des sulfoxydes à 1028,62 cm^{-1} est observée. Les acides aminés présentent également des absorbances spécifiques : le groupement NH_3^+ présente une bande d'élongation (3100–2600cm^{-1}), une bande proéminente (vers 2222–2400cm^{-1}) correspondant à la combinaison de la vibration de déformation asymétrique et l'oscillation de torsion, cette dernière absorbant vers 550cm^{-1}. De plus, l'ion ammonium absorbe vers 1660–1610cm^{-1} et 1550–1485cm^{-1} (déformation asymétrique et symétrique), le groupement -OH présente une bande large de vibration asymétrique. Enfin, l'ion carboxylate absorbe fortement vers 1600–1590cm^{-1} et plus faiblement vers 1400cm^{-1}. Ces bandes correspondent respectivement à l'élongation asymétrique et symétrique.

III.1.2.3. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Les standards : Le produit analysé est l'allicine. Lors de cette analyse, le travail a été axé essentiellement sur la caractérisation de l'allicine présente dans l'extrait d'ail. Ce faisant, sur le chromatogramme obtenu suite à plusieurs séries d'analyses (Figure III.3) et par comparaison avec les résultats obtenus par différents auteurs (Jansen et al 1987 ; Iberl et al., 1990), il a été possible d'identifier le pic propre à l'allicine et dont le temps de rétention est de 6.2 minutes.

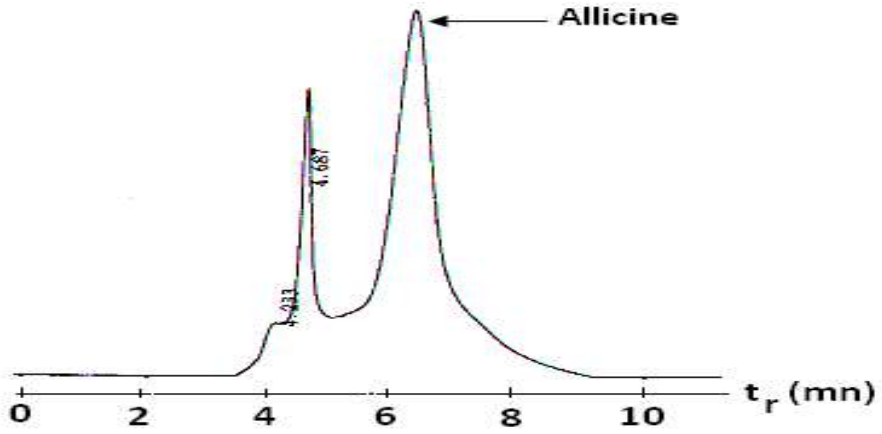


Figure.III.3. Chromatogramme de l'extrait d'ail éthanolique.

III.1.3. Influence de la température sur les paramètres physicochimiques de l'extrait d'ail

A partir de la figure III.4, représentant les spectres IR de l'extrait d'ail à différentes températures (T=4°C, T=25°C, T=37°C, T=42°C, T=50°C et T=75°C), une différence a été remarquée. Il y'a une modification régressive dans l'intensité des pics de certaines fonctions au fur et à mesure que la température croit de 4°C jusqu' à 75°C. Cette diminution est due probablement à la disparition de certaines fonctions organiques des composés thermolabiles sulfurés dans l'extrait d'ail. D'autre part, la présence d'autres fonctions a été observée, celles-ci étant probablement dues à une transformation des fonctions dégradées sous l'effet de la température.

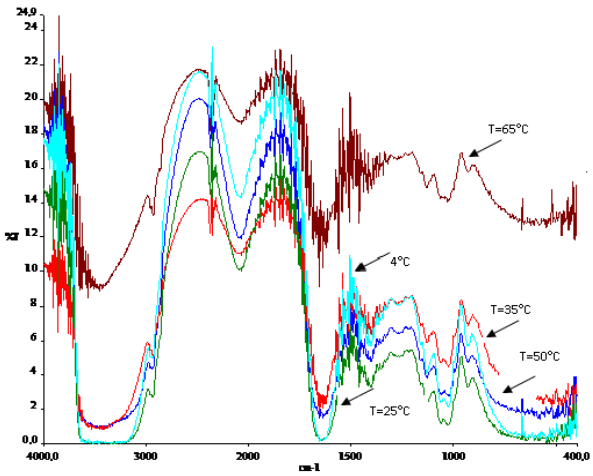


Figure.III.4. Courbe de spectroscopie IR de l'extrait d'ail à différentes températures.

III.1.3.1. Stabilite thermique de l'allicine

Une fois les conditions optimales d'extraction trouvées, une série d'expériences ont été entreprises par lesquelles une étude de la stabilité thermique de l'allicine a été envisagée. Les extraits d'ails ont été conservés à quatre valeurs de température. Le suivi de la stabilité thermique de l'allicine a été assuré par l'utilisation de la HPLC (Figure III.5) et ce par la vérification des aires des pics de l'allicine pour chaque température. Les valeurs trouvées sont consignées dans le tableau III.1 ci dessous.

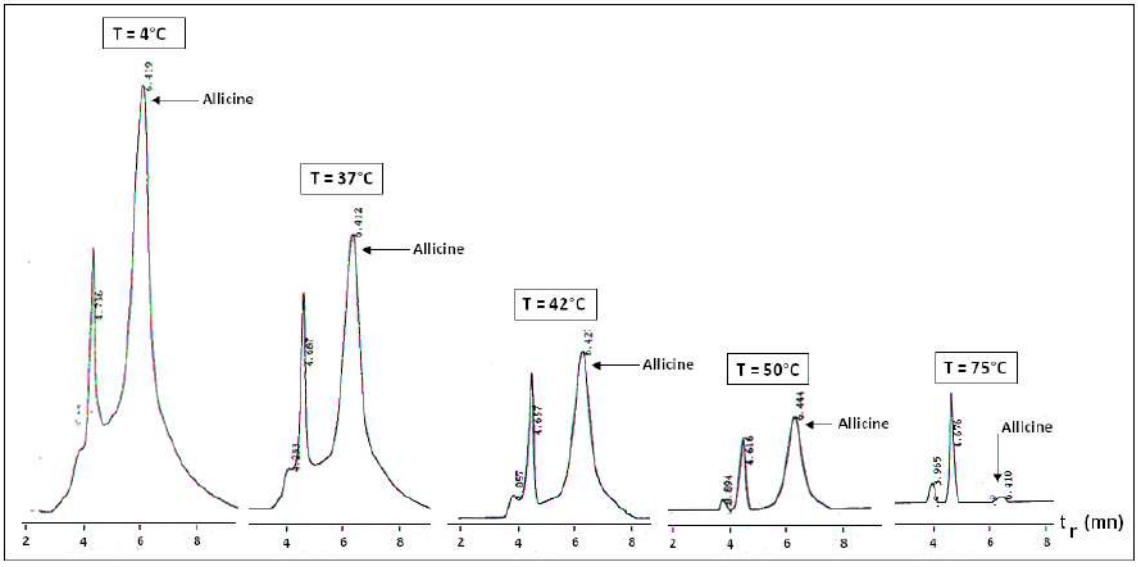


Figure.III.5. Chromatogrammes montrant la variation de la quantité d'allicine en fonction de la température.

La stabilité des thiosulfinates, y compris l'allicine, est influencée par les températures de stockage (Mogoşanu et al., 2017). La stabilité des thiosulfinates dans l'extrait d'ail a été considérablement réduite, lorsque la température a augmenté (Figure III.5). La quantité de thiosulfinates totale a diminué depuis le début du stockage avec une destruction d'environ 95% à 75 °C après 6h de conservation, alors que près de 75% de la quantité de thiosulfinates total sont restés intacts à 37°C pendant la même période. Par contre, aucune perte d'allicine n'a été observée dans l'extrait d'ail pour les températures de 4°C et 25°C pendant environ 6 heures de conservation. La température a eu une influence sur la stabilité des thiosulfinates d'ail. Des températures plus élevées provoquent une instabilité de ces composés.

Tableau.III.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	98.707	98.707	98.707	98.707	98.707	98.707
25°C	98.625	98.623	98.620	98.620	9.610	9.604
37°C	77.820	70.906	62.980	55.690	47.950	41.022
42°C	74.120	60.205	47.255	33.174	20.451	7.561
50°C	59.260	40.123	22.891	5.251	0.125	0
75°C	6.500	0	0	0	0	0

D'après les résultats trouvés, les températures de 4°C et 25°C sont celles qui donnent une grande proportion d'allicine dans l'extrait pour cette période de temps, donc ceux favorisant la stabilité de ce principe actif. Notons aussi que la quantité d'allicine dans l'extrait d'ail est linéairement proportionnelle au temps de conservation pour T=37, 42 et 50°C (Figure III.6.). Il ressort également de ces résultats que la température limite pour la conversion enzymatique de l'alliine en allicine est d'environ 37°C, et qu'au-delà de la température d'incubation de 40 ° C, le taux de conversion de l'allicine en composés sulfurés volatiles est plus élevé que pour la conversion de l'alliine en

allicine. Ainsi, cette décomposition s'accélère pour des températures d'incubations supérieures à 50°C.

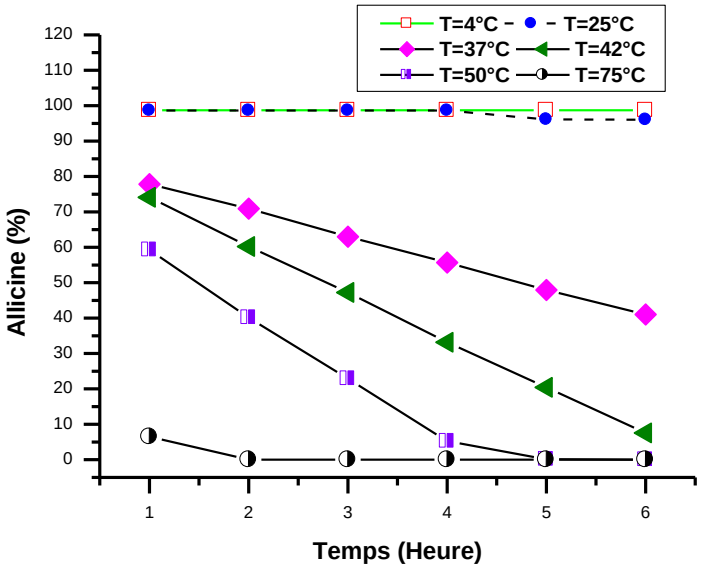


Figure.III.6. Cinétique de décomposition de l'allicine dans l'extrait Ethanolique d'ail, pour les températures : T=4°C, T=25°C, T=37°C, T=42°C, T=50°C et T=75°C.

III.2. Activité antioxydante de l'ail

III.2.1. Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes.

La plupart des activités des antioxydants de sources végétales proviennent des composés du type phénolique (Huan-xia et al, 2016). Dans le cas où le nombre de composés phénoliques est important, ces effets antioxydant ne sont pas toujours en corrélation avec la présence de composés de type phénolique. Dans l'extrait d'ail étudié, les deux antioxydants polyphénols et flavonoïdes doivent être examinés ensemble.

Les analyses quantitatives des phénols totaux, des polyphénols et des flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage (Figure III.7, III.8) exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique et en mg équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (MS).

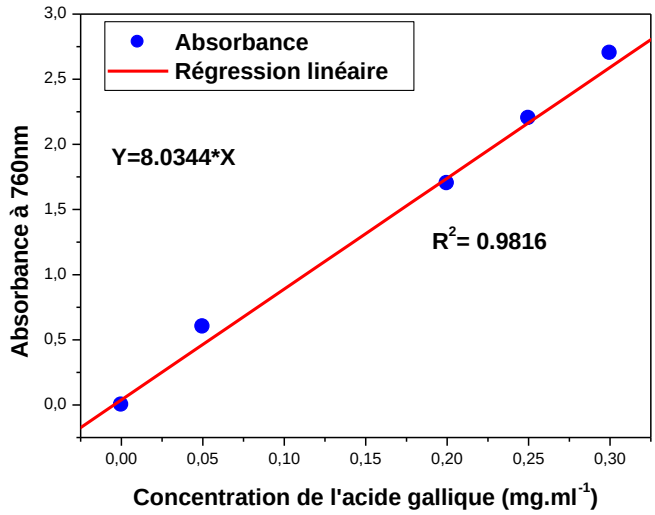


Figure.III.7. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

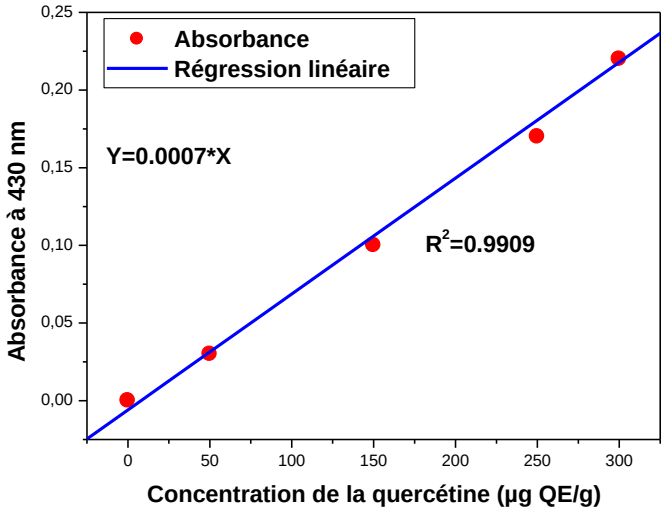


Figure.III.8. Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Tableau.III.2. Teneur totale en phénol et en flavonoïde pour les extraits d'ail étudiés.

Solvants d'extraction	Polyphénols totaux (mg GAE/g MS)	Flavonoïdes totaux (µg QE/g MS)
Eau	0. 1050	8.5001
Methanol	1.0750	55.5003
Ethanol	0.1980	37.3690
Diethylether (v/v)	0.0091	4.5121
Eau/Methanol (v/v)	2.9800	60.2260
Eau/Ethanol (v/v)	1.5600	41.5870

L'étude menée par Biljana Bozin et al, 2008 a montré que la quantité des composés phénoliques dans l'ail variait de 0,05 à 0,98 mg GAE/g MS**.** Cet écart est dû probablement aux facteurs intrinsèques (facteurs géographiques et climatiques), aux facteurs génétiques, mais également au degré de maturation de la plante et à la durée du stockage**.** Le choix des solvants d'extraction est un facteur important dans la détermination de la teneur en polyphénols. Les extraits possédant la teneur la plus élevée en polyphénols ont été obtenus avec des rapports constitués de 50/50 d'eau/ méthanol, eau/ éthanol et méthanol pure. La plus faible valeur a été obtenue en utilisant l'eau pure et le diéthyl éther (Tableau III.2).

La teneur en phénols totaux dans les extraits d'ail étudiés, exprimée en équivalents d'acide gallique (GAE), varie de 0,105 mg de GAE / g de MS en utilisant de l'eau pure et de 2.98 mg de GAE / g de MS dans le cas du mélange eau-méthanol. De même, la teneur la plus élevée en flavonoïdes (60.226 µgQE/g de MS) a été obtenue avec le même mélange par rapport aux autres solvants utilisés. La plus faible teneur a été obtenue dans le cas de l'extrait aqueux : soit environ 4.500 µgQE/g de MS.

Aussi, la teneur en polyphénols dans l'extrait d'ail est nettement plus élevée (Tableau III.2) par rapport aux flavonoïdes (2.9800 mgGAE/g MS et 60.226 µgQE/g MS). Cette différence est due principalement à la variété de l'ail utilisé **(**Zobia et *al.*,2017).

Les résultats du dosage des composés phénoliques révèlent aussi que le méthanol est le solvant le mieux approprié dans l'extraction des antioxydants à partir des extraits en

raison de sa polarité et de son pouvoir de solubilisation pour les composants phénoliques, comme rapporté par (Siddhuraju et Becker, 2003). L'addition d'eau à des solvants organiques tels que le méthanol et l'éthanol, crée un milieu plus polaire, ce qui permet de faciliter l'extraction des composés phénoliques (Kallel et al., 2014).

Selon Kim et Lee, (2002), l'utilisation d'eau pure comme solvant d'extraction n'était pas efficace pour les composés phénoliques, car ces composés étaient souvent plus solubles dans les produits organiques moins polaires que l'eau.

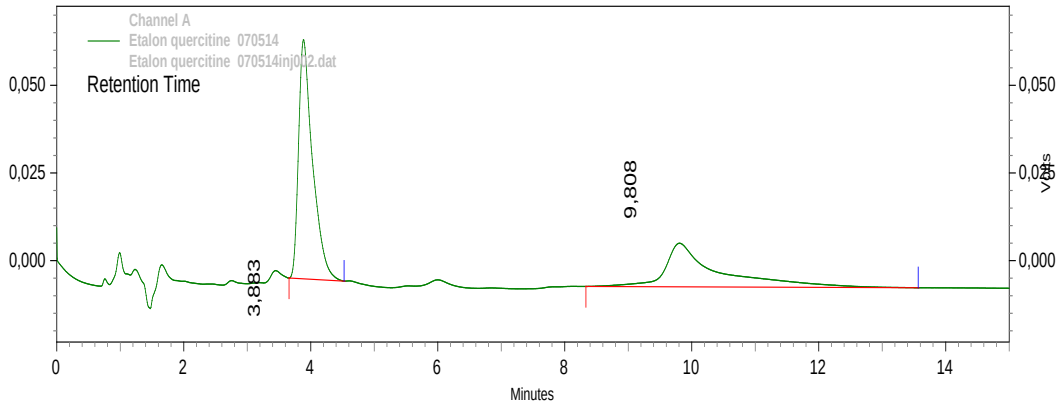
De même, la diminution de la quantité des polyphénols et des flavonoïdes totaux notamment dans l'extrait aqueux est probablement due à l'augmentation des composés soufrés et des substances terpénoïdes présents dans l'extrait d'ail.

III.2.2. Identification chromatographique des composés phénoliques dans l'extrait méthanolique de l'ail

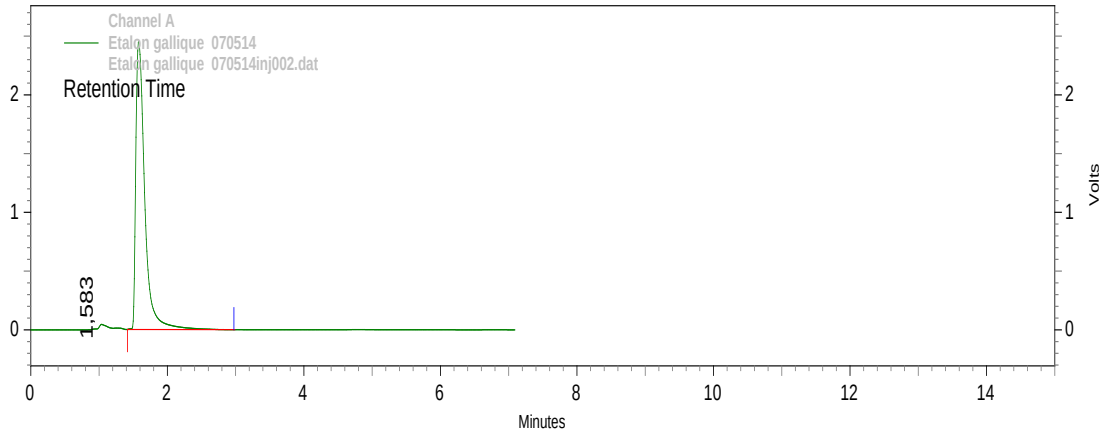
L'identification des composés phénoliques a été réalisée en utilisant une chromatographie liquide à haute performance.

Les standards : les produits analysés sont la quercétine et l'acide gallique.

Sur la figure.III.9 sont représentés les spectres d'analyse par HPLC de la quercétine (a) et de l'acide gallique (b)



(a)



(b)

Figure.III.9. Chromatogrammes (HPLC) : (a) Quercitine ; (b) Acide gallique.

L'échantillon

L'extrait d'ail méthanolique préparé est analysé par injection d'une quantité de 20µl d'échantillon dans un chromatogramme (HPLC). Afin d'étudier la composition chimique de l'extrait obtenu, son chromatogramme est comparé avec ceux des étalons (Quercétine, acide gallique) réalisés dans les mêmes conditions opératoires (Tableau II.5. page 52).

Le chromatogramme de l'extrait d'ail méthanolique est représenté sur la figure.III.10 :

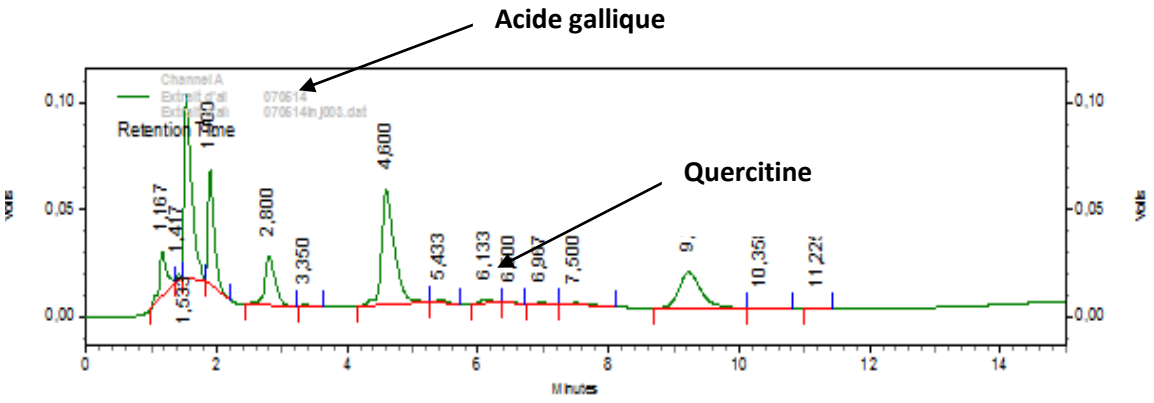


Figure III.10. Chromatogramme d'extrait méthanoïque d'ail.

La comparaison des temps de rétention des standards avec ceux enregistrés dans le chromatogramme (Figure III.7) permet l'identification des deux composés phénoliques (Acide gallique et Quercitine) dans l'extrait méthanolique de l'ail.

Les résultats chromatographiques indiquent la présence de l'acide gallique (1.62 minutes) identifié pour la première fois comme nouveau composé des feuilles de *Marrubium vulgare* (Yousefi et al.,2016), de la quercétine (4.65 minutes). D'autres composés non identifiés dans l'extrait d'ail sont probablement des composés soufrés et des composés du type phénolique.

III.2.3. Influence de la température sur la teneur en polyphénols

La figure III.11 permet de visualiser la variation de la concentration de l'extrait d'ail en polyphénols totaux en fonction de la température.

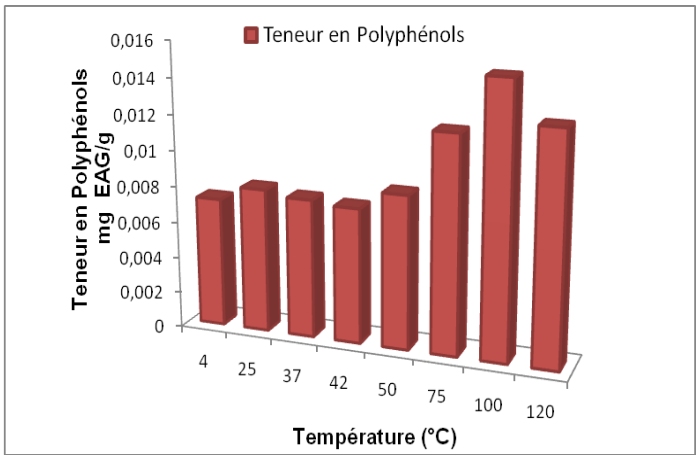


Figure III.11. Concentration des polyphénols en mg EAG/g de MS de l'extrait méthanolique d'ail à différentes températures.

La figure III.11 montre qu'il y'a une légère variation de la teneur en polyphénols dans l'extrait d'ail à différentes températures. La concentration passe de 0,0088 (T= 4°C) à 0.0138 mg EAG par gramme de matière sèche (MS) (T=100°C). Ce résultat montre que les polyphénols présentent une faible sensibilité à la température.

L'effet de la température sur la teneur en composés phénoliques dans l'ail pour les températures T=25°C, 37°C, 42°C et 50°C ne conduit à aucune variation significative dans le contenu phénolique. La concentration globale des polyphénols totaux reste pratiquement stable. La teneur totale en composés phénoliques a augmentée pour des élévations de température à 75°C (0.012 mg EAG/g de MS), 100°C (0.015 mg EAG/g de MS) et 120°C (0.0127mg EAG/g de MS et cela pendant six heures de conservation. Ce résultat indique que le chauffage peut être utilisé pour libérer les composés phénoliques provenant de l'ail ou diverses plantes connues par leur effet antioxydant.

Le clivage de la liaison estérifiée et glycosylée des polyphénols ou les produits formés dans la réaction de Maillard, peuvent être responsables de l'augmentation du contenu en composés phénoliques totaux après le chauffage (Kavita et al., 2014)

III.2.4. Influence de la température sur la teneur en Flavonoïdes

L'histogramme ci-contre (Figure.III.12.) représente la variation de la teneur en flavonoïdes en fonction de la température.

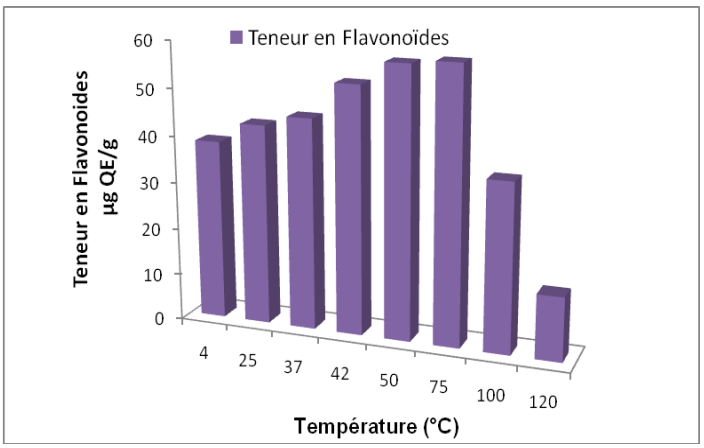


Figure III.12. Concentration des flavonoides en µg EQ/ml de l'extrait aqueux d'ail à différentes température.

Les résultats trouvés montrent que la teneur en flavonoïdes croit avec l'augmentation de la température. L'extrait d'ail présente une concentration importante en flavonoïdes qui équivaut à 58,8 µgQE/ml d'extrait à T= 75°C. Pour des températures plus élevées (T=100 et 120°C), on observe une diminution de la teneur en flavonoïdes totaux, ce qui indique que certains flavonoïdes ont probablement subit une dégradation. Dans la plupart des fruits et légumes, les flavonoïdes contiennent des liaisons de céréglycosides et existent sous forme de dimères et d'oligomères, et le traitement thermique entraîne la formation des monomères par hydrolyse des liaisons céréglycosides (Kavita et al., 2014). Les résultats révèlent que l'augmentation de la température a eu un effet positif sur la teneur totale en polyphénols dans l'ail. Cependant, un effet négatif a été signalé pour la teneur totale en flavonoïdes pour des températures supérieures de 75°C. Les résultats trouvés sont compatibles avec les résultats de Ioku et al (2001) qui ont constaté que la teneur en flavonoïdes totaux a

augmenté après le chauffage à une certaine température (T=65°C), et une grandeur de temps (six heures), alors que le chauffage pendant 6 heures à 120 °C a diminué la teneur en flavonoïdes totaux. La raison de cette diminution en flavonoïdes totaux à température plus élevée pourrait être due à la dégradation des flavonoïdes. Cela dépend aussi de la structure particulière de ces composés. Une étude similaire réalisée par Ioannou et Ghoul (2012) a montré que les flavonoïdes sont sensibles aux températures très élevées. La détermination des paramètres cinétiques a mis en évidence des différences significatives selon la structure et le pouvoir antioxydant des flavonoïdes qui varient de façon non proportionnelle à la dégradation.

III.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante

III.2.5.1. Test d'évaluation de la puissance de réduction ferrique (RP)

Le dosage de la capacité réductrice par la méthode de la puissance de réduction du fer (RP) reflète la capacité d'un antioxydant à donner des électrons en réduisant Fe^{3+} à Fe^{2+}. Dans cette étude, la présence des réducteurs dans les différents extraits d'ail provoque la réduction de Fe^{3+}/complexe ferricyanide à la forme ferreux (Figure III.13.). Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité et de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700nm. Une absorbance accrue du mélange réactionnel indiquerait une puissance réductrice.

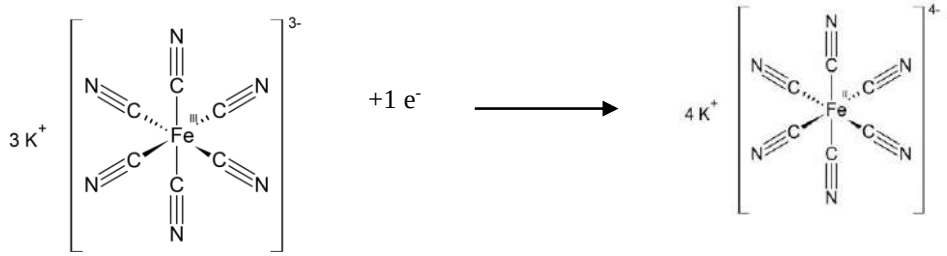


Figure III.13. Système de réduction du complexe Fe^{3+} / ferricyanure à la forme ferreuse.

Tous les extraits testés présentaient une activité dépendant de la concentration. L'absorbance augmente avec des concentrations croissantes (Figure III.14). En général, aux extraits avec une teneur élevée en polyphénols correspond une valeur faible de $RP_{0,5}$, cette valeur définissant la puissance réductrice qui correspond à la concentration

à laquelle l'absorbance est de 0,5 (Diem Do et al., 2012). La plus faible puissance de réduction a été observée dans les extraits aqueux et avec le diéthyl éther. L'extrait obtenu avec le mélange eau/méthanol était le plus actif ($RP_{0.5}$ = 0,016±0,001 mg/mL) suivi de l'extrait méthanolique ($RP_{0,5}$=0.075±0,003 mg/mL) et de l'extrait eau/éthanol ($RP_{0.5}$= 0.15±0,011 mg/mL).

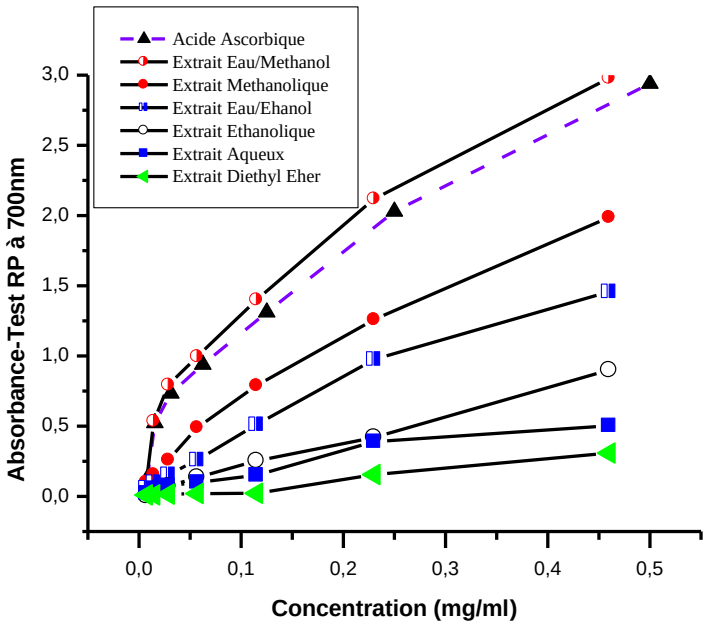


Figure.III.14. Absorbance des différents extraits d'ail à différentes concentrations – Test de puissance réductrice du fer (RP).

L'activité réductrice de l'extrait avec un mélange eau /méthanol a montré un pouvoir réducteur modéré, comparé à celui obtenu avec l'acide ascorbique ($RP_{0,5}$ = 0,020±0,001 mg/mL) (Figure.III.14)

Ces résultats montrent que l'extrait d'ail obtenu à partir du mélange eau/méthanol contient des quantités plus élevées de réducteur, qui pourrait réagir avec les radicaux libres pour se stabiliser et bloquer les réactions en chaîne radicales. Ce qui entraine la réduction du potentiel redox (Juneja, 2003).

Par contre l'extrait aqueux d'ail présentait un faible potentiel antioxydant et une grande valeur de puissance réductrice RP ($RP_{0.5}$ = $RP_{0,5}$ = 0,53±0,014 mg/mL), ce qui explique également une faible teneur en polyphénols et en flavonoïdes par rapport aux

autres extraits obtenus avec le méthanol et le mélange eau/méthanol. L'activité anti-radicalaire de l'extrait est due probablement aux composés autres que les polyphénols. Le méthanol et l'éthanol en combinaison avec l'eau permet une meilleure activité antioxydante ou une meilleure quantité en polyphénols totaux. L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique (Mohammedi et Atik.,2011). Un tel résultat suggère que les composés de l'ail possèdent un caractère non polaire qui permet aux solvants moins polaire que l'eau à extraire plus facilement les composés antioxydants (Dorta et al., 2012). Cette augmentation est peut-être due à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses (Bai et al., 2017). Elle pourrait également être due à l'augmentation de la basicité et de l'ionisation des polyphénols dans de telles solutions (Dorta et al., 2012). Le principal inconvénient de l'extraction des composés de l'ail avec le mélange eau/methanol est la toxicité du méthanol. Pour cela, le mélange d'eau et d'éthanol sont les plus utilisés en raison de la faible toxicité de l'éthanol par rapport au méthanol.

III.2.5.2. Méthode de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des extraits méthanolique (Figure.III.15), éthanolique, aqueux et éther diethylique de l'ail et de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 515nm en suivant la réduction de ce radical par passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H).



Dilution décroissante

Figure III-15. Activité antioxydante de l'extrait d'ail méthanolique.

Pour chaque concentration, un suivi de la densité optique (D.O) a été effectué pour tous les extraits étudiés ainsi que pour la solution d'acide ascorbique. La figure III.16 illustre l'activité antioxydante, représentée par le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des deux extraits d'ail aqueux et méthanolique.

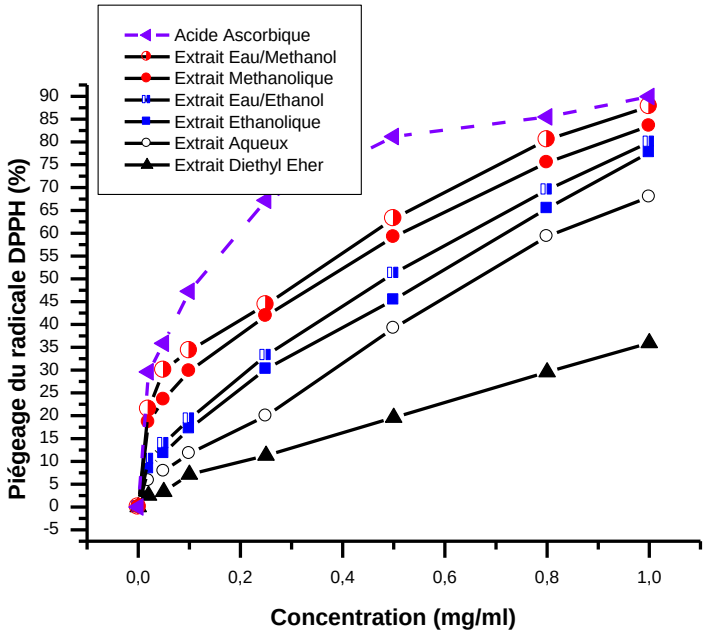


Figure.III.16. Activité de piégeage du radical libre DPPH en fonction de la concentration des différents extraits étudiés.

Dans le but de connaitre l'efficacité de l'effet antioxydant de l'extrait d'ail, il est indispensable de connaitre l'IC_{50} qui représente la concentration d'extrait d'ail responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH (Tableau.III.3).

Tableau.III.3. Valeurs du pouvoir antiradicalaire des Extrait d'ail et de l'acide ascorbique à 50% d'inhibition.

	Eau/MeOH **(50/50)**	MeOH	Eau/EtOH **(50/50)**	EtOH	Eau	Diethyl éther	Acide Ascorbique
IC_{50} (mg/ml)	0.265±0.03	0.383±0.03	0.430±0.05	0.564±0.05	0.767±0.03	> 1.0	0.067±0.022

Les résultats obtenus montrent la contribution des composés phénoliques à l'extraction dans l'activité antioxydante.

L'IC_{50} est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC_{50} est faible, plus l'activité antioxydante d'un composé est importante.

Les extraits ayant une teneur plus élevée en phénols totaux présentaient des propriétés antioxydante supérieures (Valeurs IC_{50} faibles). De plus, l'extrait d'ail (Eau /Methanol) a montré une activité antioxydante supérieure, en comparaison avec celles obtenues avec les autres extraits d'ail (IC_{50} = 0.265 mg/mL). Cependant, son pouvoir de piégeage des radicaux libres DPPH est inférieur à celui de l'acide ascorbique (IC_{50} = 0.067±0.022) (Fig. 2). Il est à noter aussi que l'eau n'est pas le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques, parce qu'ils sont plus solubles dans les solvants organiques moins polaires que l'eau (Kim et Lee, 2002).

En comparaison avec d'autres formes d'ail extraites par macération, avec 80% de méthanol, la valeur d'IC_{50} de DPPH de l'extrait d'ail (Methanol/Eau) est plus élevée que l'IC_{50} de : l'ail immatures (IC_{50} =1.03 mg/ml), des Bulbes d'ail mouillés et séchés à l'air et préparés sous forme d'extrait d'ail vieilli (IC_{50} = 0.65 mg/ml) et des bulbes d'ail frais (IC_{50} = 2.01 mg/ml) (Biljana et al., 2008). Les résultats antérieurs publiés par Miller et al., 2000 ; Nuutila et al., 2003 ont relié ces différences à la polarité du milieu d'extraction et par conséquent à la teneur en composés phénoliques.

III.2.5.3. Activité du Piégeage du radicale ABTS

Les capacités relatives des différents extraits d'ail pour éliminer le cation radical 2,2 -azinobis- [3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique] $ABTS^{\bullet+}$ ont été mesurées par spectrophotométrie par rapport à la puissance antioxydante de l'acide ascorbique (Vitamine C).

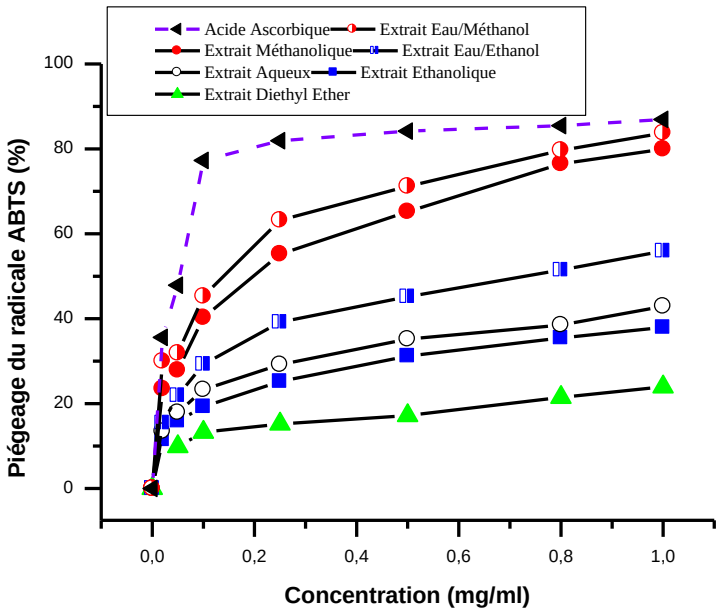


Figure. III.17. Activité du piégeage du radical libre ABTS en fonction de la concentration des différents extraits étudiés.

L'analyse de la figure III.17, a montré que les effets du balayage des extraits sur les radicaux $ABTS^{\bullet+}$ augmentent lorsque la concentration augmente. Les résultats obtenus révèlent que l'eau ajoutée au méthanol, et le méthanol seul sont les solvants les plus efficaces pour l'extraction des antioxydants avec des valeurs d'IC_{50} respectives de (0.175±0.030) et (0.25±0.03), fournissant une teneur plus élevée en phénol total et donc un plus grand potentiel antioxydant, mais relativement faible que celui de l'acide ascorbique (IC_{50} = 0.025±0.026). Néanmoins, les résultats obtenus sont meilleurs que ceux trouvés par les auteurs Cheung et al.,2003 ; Sun & Ho, 2005 qui ont observé une meilleure activité du balayage et une teneur phénolique plus élevée dans des extraits méthanoliques ou avec l'acétone. Les résultats obtenus sont en accord avec des études

qui ont identifié le méthanol comme étant le solvant polaire idéal dans l'extraction des polyphénols à partir des plantes (Diem Do et al., 2014)

III.2.5.4. Capacité antioxydante en équivalent Trolox

A. Détermination de la courbe d'étalonnage du Trolox

La capacité d'un extrait à piéger les radicaux libres est exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Le TEAC est calculé à partir de la courbe d'étalonnage du Trolox utilisé comme standard dans les deux conditions réactionnelles DPPH et ABTS : (Figure. III.18).

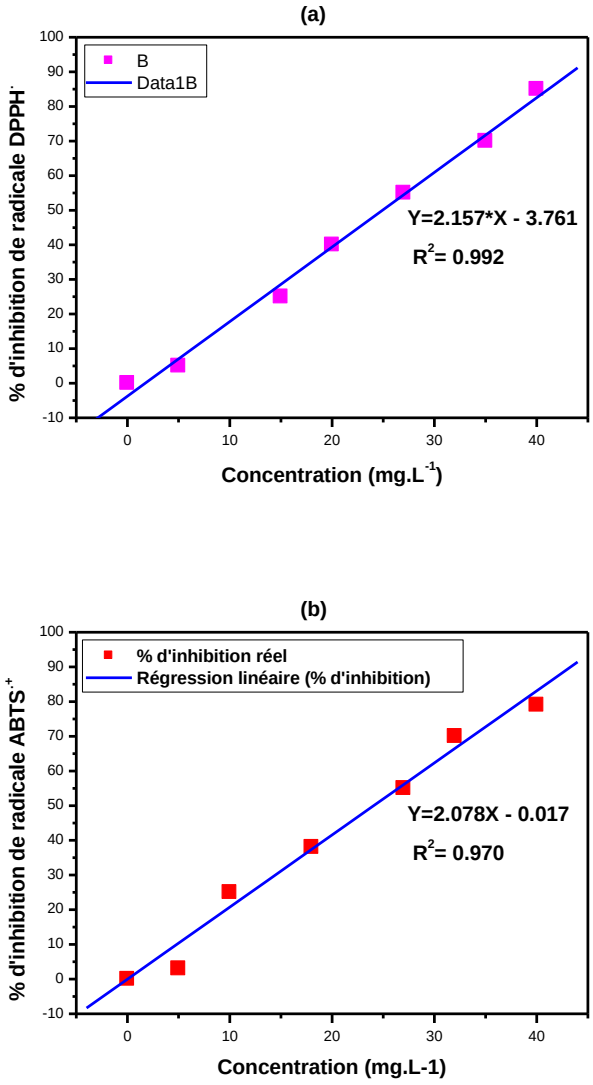


Figure. III.18. Courbe d'étalonnage du Trolox : (a). Inhibition DPPH·, (b). Inhibition $ABTS^{\cdot+}$

La figure III.18 montre que les coefficients de régression des deux courbes d'étalonnage sont proches de 1 (R^2=0,99 pour le cas de DPPH et R^2=0,97 pour le cas d'ABTS) ; ces courbes peuvent être donc utilisées pour déterminer la teneur en équivalent Trolox des polyphénols dans les échantillons.

La méthode TEAC est fréquemment utilisée pour la détermination de l'activité antioxydante, elle est basée sur la capacité de balayage radicalaire des antioxydants. Les deux radicaux $ABTS^{\cdot +}$ et $DPPH^{\bullet +}$, peuvent être piégés par des antioxydants sous leur forme initiale incolore.

Dans l'acide 2, 2-azino-bis 3-éthylbenzthiazo-line-6-sulfonique ou ABTS, les extraits étudiés ont montré des activités antioxydantes. Ils ont pu neutraliser le radical '$ABTS^{+}$. L'extrait d'ail (Eau/Methanol) et l'extrait méthanolique ont une capacité antioxydante en équivalente Trolox (TEAC) supérieure par rapport aux autres extraits, (15.79±0.20) mg Trolox/g d'extrait et (15.37±0.60) mg Trolox/gd'extrait, respectivement (Figure III.19). Cependant, l'extrait d'ail (Eau/Methanol) et l'extrait Methanolique ont montré une différence significative (P <0,001) dans le TEAC par rapport aux autres extraits. Dans le test $DPPH^{\bullet +}$ (radical1, 1-diphényl-2-picryl-hydrazyle), les mêmes remarques ont été observées concernant l'activité antioxydante de chaque extrait, seulement l'extrait d'ail a montré une inhibition moins significative vis-à-vis les radicaux DPPH (P <0,001) par rapport au test $ABTS^{+}$, (2.41±0.06) mg Trolox/g d'extrait pour l'extrait (Eau/Méthanol) et (2.40±0.10) mg Trolox/g d'extrait pour l'extrait méthanolique (Figure III.20). Cette différence est probablement due à l'existence d'une certaine similitude en terme d'affinité des deux méthodes vis-à-vis des antioxydants présents dans l'extrait d'ail. Dans ces deux méthodes de dosage, il parait que l'ABTS détecte certains antioxydants qui n'ont pas été détectés par le DPPH.

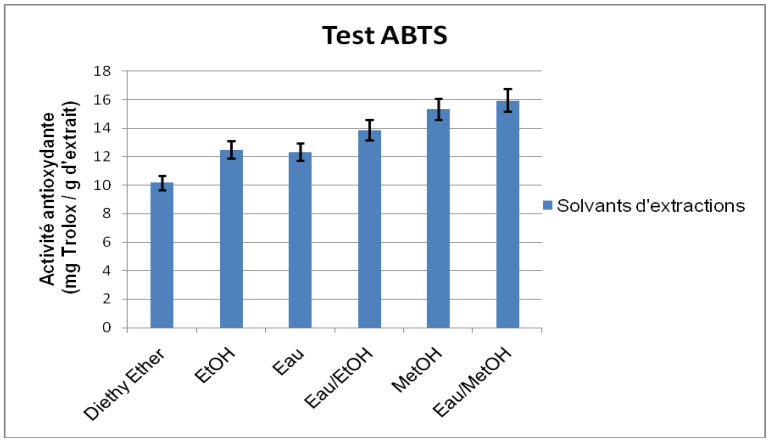


Figure.III.19. Moyennes d'équivalent Trolox des extraits d'ail (ABTS).

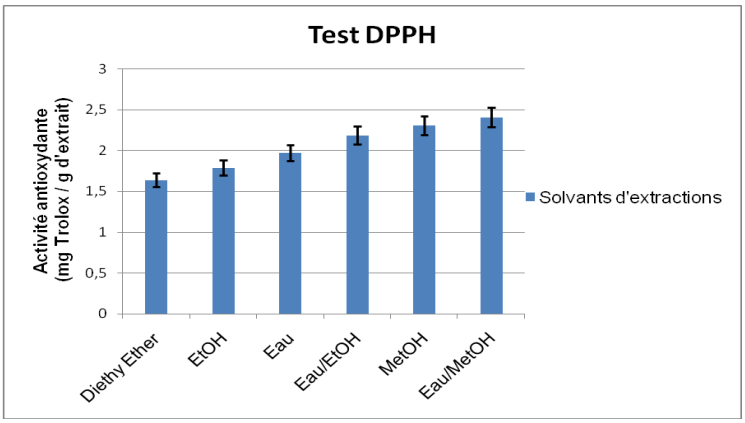
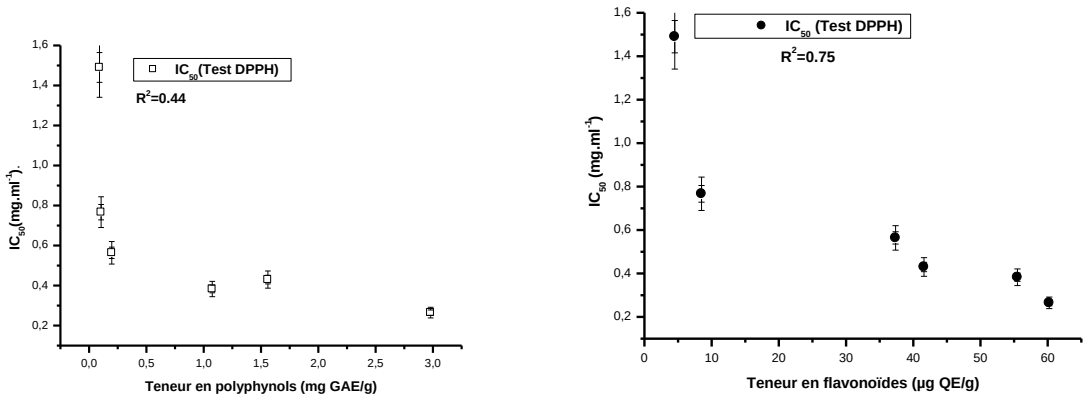


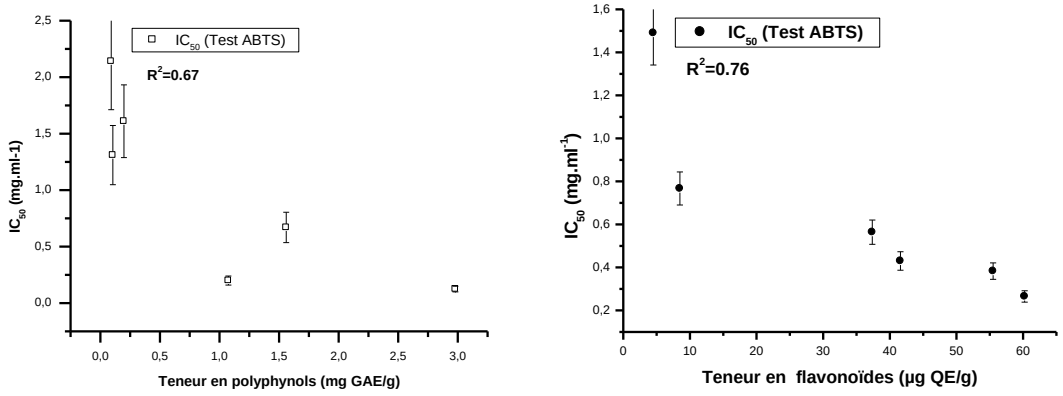
Figure.III.20. Moyennes d'équivalent Trolox des extraits d'ail (DPPH•).

III.2.5.5. Corrélation entre les teneurs (polyphénols et flavonoïdes), les IC_{50} et le $RP_{0.5}$ de la capacité du piégeage des radicaux libres

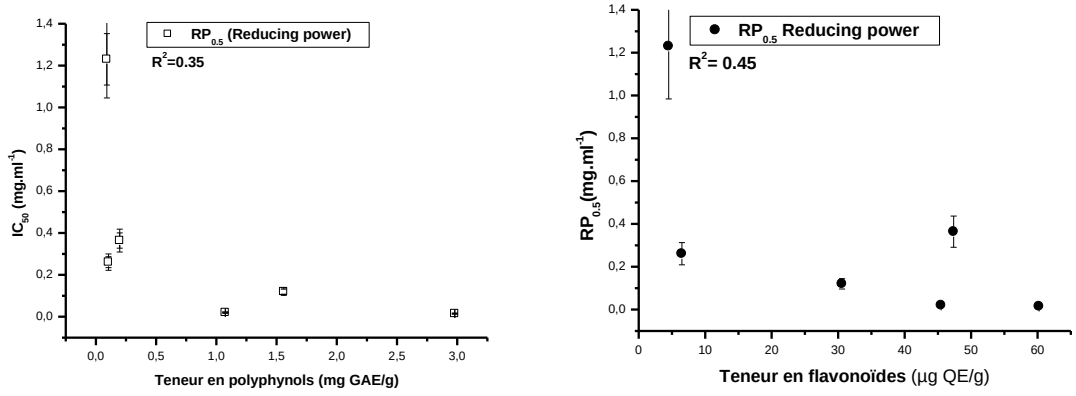
Le but de cette étude est de déterminer toute relation possible entre les valeurs des $RP_{0.5}$, IC_{50}, et la composition en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits d'ail. L'analyse statistique a révélé que le contenu phénolique total dans les extraits d'ail, la valeur de la IC_{50} de DPPH et d'ABTS ainsi que la $RP_{0.5}$ du test RP étaient inversement proportionnelles *;* Indiquant qu'une teneur en antioxydants plus élevée entraîne une capacité antioxydante plus forte dans les différents extraits (Figure III.21). La corrélation entre les valeurs d'IC_{50} des extraits obtenus à partir des différents solvants d'extractions employés, et la teneur phénolique totale était moyennement faible pour les polyphénols et mieux significative pour les flavonoïdes.



(a)



(b)



(c)

Figure. III.21. Corrélation entre les valeurs d'IC_{50} et RP_{50} en fonction des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes par rapport au : (a) DPPH IC_{50}, (b) ABTS IC_{50} et (c) RP_{50} du test puissance de réduction (RP).

Les résultats illustrés sur la figure III.21 ont permis de déduire que la capacité antioxydante totale (CAT) des composés phénoliques des extraits d'ail intervient d'une façon ou d'une autre avec des pourcentages plus ou moins comparables pour les radicaux libres ($DPPH^{\bullet}$ et $ABTS^{\bullet+}$), mais cette relation est faible avec le test de puissance de réduction du fer (RP). Ces capacités antioxydantes présentent des coefficients de corrélation de l'ordre de R^2 = 0.44, 0.67 et 0.35 pour les polyphénols et R^2= 0.75, 0.76 et 0.45 pour les flavonoïdes, correspondants respectivement aux techniques : piégeage du radical $DPPH^{\bullet+}$, piégeage du radical $ABTS^{\cdot+}$ et test RP.

La corrélation entre les activités de piégeage des radicaux libres et les composés polyphénoliques n'était pas très forte, ce qui s'explique par le fait que la présence d'autres composés non phénolique dans l'extrait d'ail avait une influence sur l'activité antioxydante entre les composés phénoliques présents dans la matrice (Giovanelli et Buratti, 2009). D'autres études menées par Locatelli et al., 2017, les composés soufrés en particulier les thiosulfinates (principalement allicine et ajoene), ont contribué de manière significative à l'activité antioxydante de l'ail.

Aussi, les flavonoïdes corrèlent mieux avec l'activité antioxydante par rapport aux polyphénols notamment vis-à-vis le test du piégeage du radicale DPPH (R^2= 0.76, P<0.001) et du radicale ABTS (R2= 0.75, P<0.001). Cette différence est due probablement aux nombres et à la position des groupes hydroxyles sur les noyaux de ces molécules, avec la présence de la double liaison C_2-C_3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo (Figure. III.22) (Cai et al., 2006). Ces résultats révèlent que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration de l'extrait d'ail mais aussi de la structure des molécules antioxudantes.

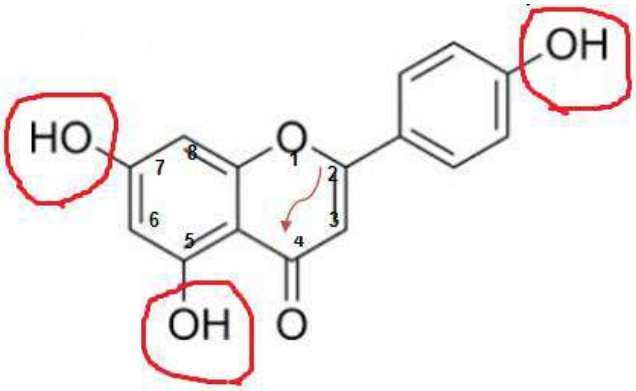


Figure. III.22. Sites réactifs d'un flavonoïde dans l'activité antioxydante de l'ail.

Une faible corrélation a été observée pour le test RP avec un coefficient de corrélation (R^2=0.35, P<0.001) et (R^2= 0.33, P<0.001) pour les teneurs en polyphénols et en quercetine respectivement. Cela signifie que la majorité des composés présents dans les extraits d'ail doués d'une puissance antioxydante peuvent agir en tant que donneur d'hydrogène et non comme donneur d'électrons. Ces résultats suggèrent aussi que ces composés phénoliques sont incapables de chélater les métaux de transition.

III.2.5.6. Influence de la température sur l'activité antioxydante

Un changement de couleur dans l'extrait d'ail aqueux à différentes températures indique une réduction de la solution de DPPH (Figure III.23).

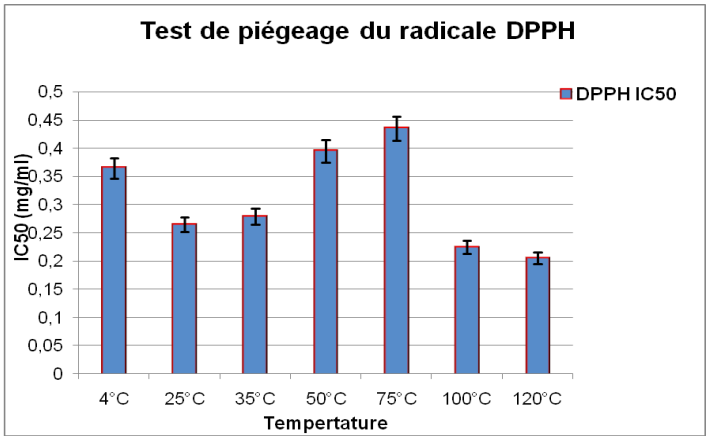


Température croissante

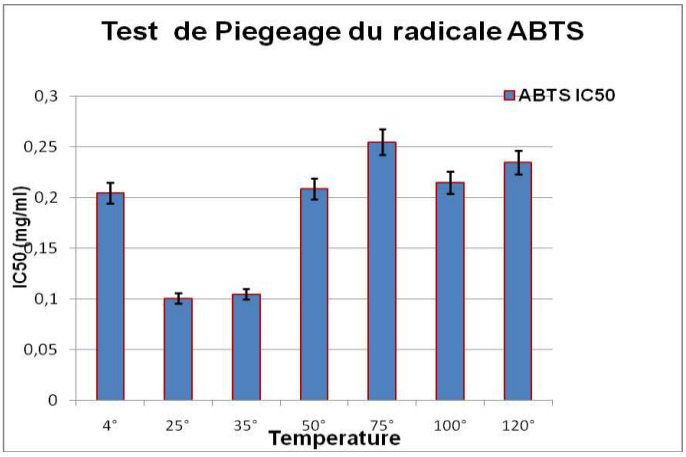
Figure.III.23. Activité antioxydante de l'extrait d'ail aqueux à différentes températures.

La représentation graphique de l'étude de l'activité antioxydante de l'extrait d'ail aqueux à différentes températures est illustrée dans l'histogramme suivant (Figure III. 24)

(a)



(b)



(c)

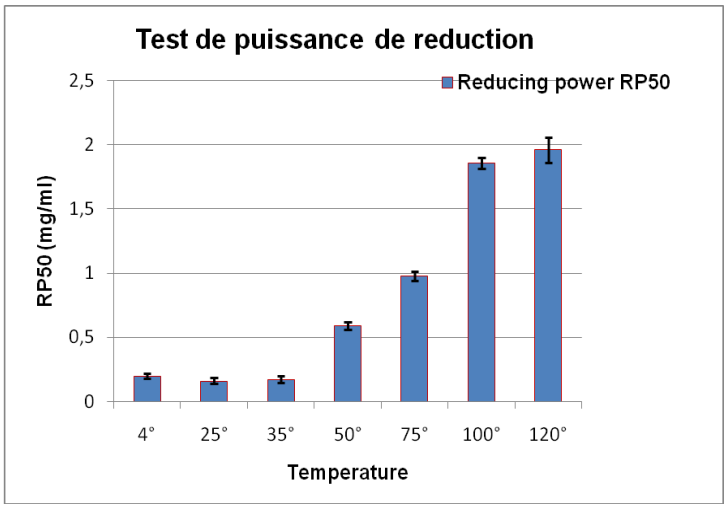


Figure.III.24. Variation de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'ail à différentes températures (4°C, 25°C, 35°C, 50°C, 75°C, 100°C et 120°C) : a. (DPPH), b. (ABTS), c. RP

L'activité antioxydante totale mesurée par l'utilisation des méthodes, DPPH, ABTS et par le test de puissance de réduction du fer (RP), indique une diminution du pouvoir réducteur qui semblerait apparaître à partir de T= 35°C pour DPPH et T= 75°C pour ABTS. Par contre, cette diminution est en progression continue pour le test RP. Comme les composés phénoliques n'ont pas subi de variations dans cette zone de température, la diminution de la capacité antioxydante de l'extrait d'ail est due probablement à la décomposition de certains composés non phénoliques contenant du soufre tels que le sulfure de diallyle, le disulfure de diallyle, la cystéine de S-éthyle et la N-acétyl-cystéine. Il est à noter que l'augmentation des concentrations totales des phénols en fonction de la température engendre une diminution des composés soufrés de l'ail (Viškelis et al. 2012). De même, cette activité est de plus en plus faible pour des températures inférieures à 25°C, elle atteint la valeur de 51,68% à T=4° C. Cela est dû à l'absence des antioxydants dans l'ail à des températures très faibles. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Kevers et al. (2007). Ils ont conclu que les composés des polyphénols diminuent pendant les premiers stades de stockage à 4°C. En revanche, un stress thermique a été provoqué à des températures élevées (T=100°C et T=120°C), ce qui a entraîné une diminution des valeurs des IC_{50} ($DPPHIC_{50}$ et $ABTSIC_{50}$) qui ont pour conséquence d'augmenter les teneurs en composés phénoliques. Cela pourrait être attribué à l'augmentation de la capacité d'extraction des composés phénoliques en raison de la perturbation des parois cellulaires de l'ail lors d'un traitement thermique élevé, ce qui pourrait provoquer la libération de composés phénoliques plus facilement par rapport a un traitement thermique plus faible. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Scalzo et al. (2004). D'autres travaux indiquent que le chauffage améliore l'activité antioxydante dans les fruits et légumes en raison de l'amélioration des propriétés antioxydantes des composés naturels ou de la formation de nouveaux composés, tels que les produits de réaction de Maillard qui ont une activité antioxydante. Toutefois, une recherche dans ce domaine suggère qu'en dehors de la famille des Allium, l'activité antioxydante de la plupart des aliments est réduite

pour des températures de chauffages supérieures à 65°C ou 100°C (Gorinstein et al.,2008, petropoulos et al., 2016).

Les résultats ont montré aussi une légère augmentation de l'activité antioxydante de l'extrait d'ail sur les radicaux DPPH et ABTS par rapport à l'activité vis-à-vis du test RP lorsque la température de conservation de l'extrait a augmenté. Les valeurs de l'activité antioxydante obtenues avec le DPPH et l'ABTS sur l'extrait d'ail pourraient être attribuées à la présence des composés antioxydants non réactifs vis-à-vis du test RP. Ces différences peuvent être dues au fait que les méthodes ABTS et DPPH impliquent des radicaux libres réagissant avec des composés pigmentaires phénoliques et brunissant (Températures supérieures), tandis que pour le test RP, il s'agit d'une méthode pour mesurer la puissance réductrice totale des substances donneuses d'électrons qui n'est pas directement liée aux réactions des radicaux libres et non aussi spécifique que les dosages ABTS et DPPH.

III.3. Effets préventifs et curatifs de l'extrait d'ail sur l'hépatotoxicité médicamenteuse induite par le paracétamol

La maladie du foie induite est l'une des plus graves conséquences de l'abus chronique d'alcool et de médicaments. C'est une cause majeure de morbidité et de mortalité. Les radicaux libres et le stress oxydatif ont été identifiés comme les principaux facteurs responsables de la pathogenèse des lésions hépatiques induites par le paracétamol chez les humains et les modèles animaux expérimentaux. L'excès d'apport de ce produit conduit à la production des radicaux oxygène qui, à son tour, réduit le mécanisme de défense normal du corps qui altère l'activité enzymatique, réduit la réparation de l'ADN et conduit à la peroxydation lipidique et à l'oxydation des protéines.

Les polyphénols totaux et les flavonoïdes fonctionnent comme des agents puissants de chasse des radicaux libres dans le corps, où ils peuvent neutraliser les radicaux libres avant qu'ils ne puissent causer des dommages cellulaires dans cette partie sensible du corps. Dans cette étude, les propriétés hépatoprotectrices des polyphénols et des flavonoïdes sur les lésions hépatiques induites par le paracétamol (l'acétaminophène) sont présentées dans cette partie.

L'activité hepathoprotectrice de l'extrait de l'ail à été étudiée en évaluant la capacité de l'ail à prévenir le stress oxydatif dans le foie des rats surdosés avec de l'acétaminophène**.** Le surdosage des rats albinos avec 100 mg/mL par jour d'acétaminophène pendant 21 jours a entraîné une augmentation significative (P <0,05) dans le glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et le translucide pyruvate de glutamate (GPT) (Figure III.25).

L'activité enzymatique des transaminases pour les quatre lots des rats est mentionnée dans les figures (III-25, III-26, III-27 et III-28).

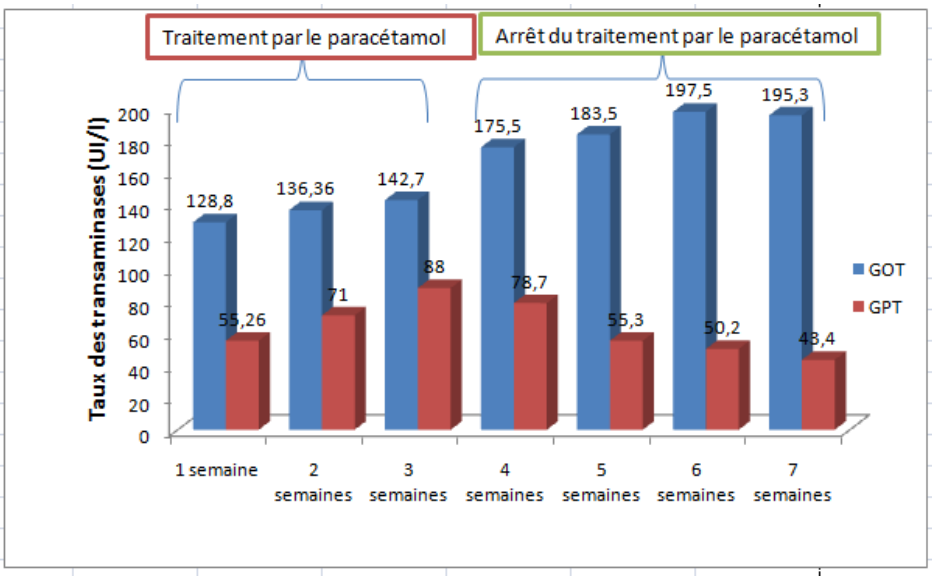


Figure.III.25 : Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot 2.

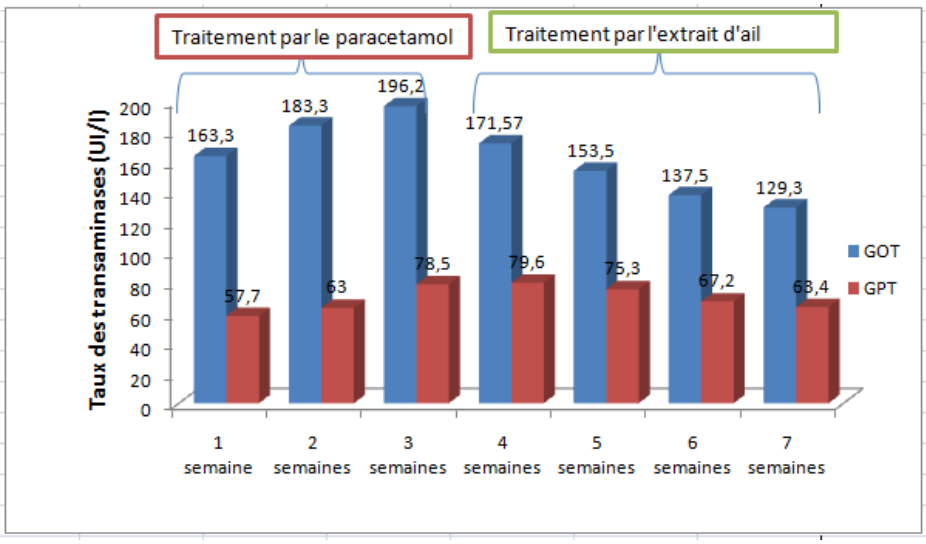


Figure.III.26. Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot 3.

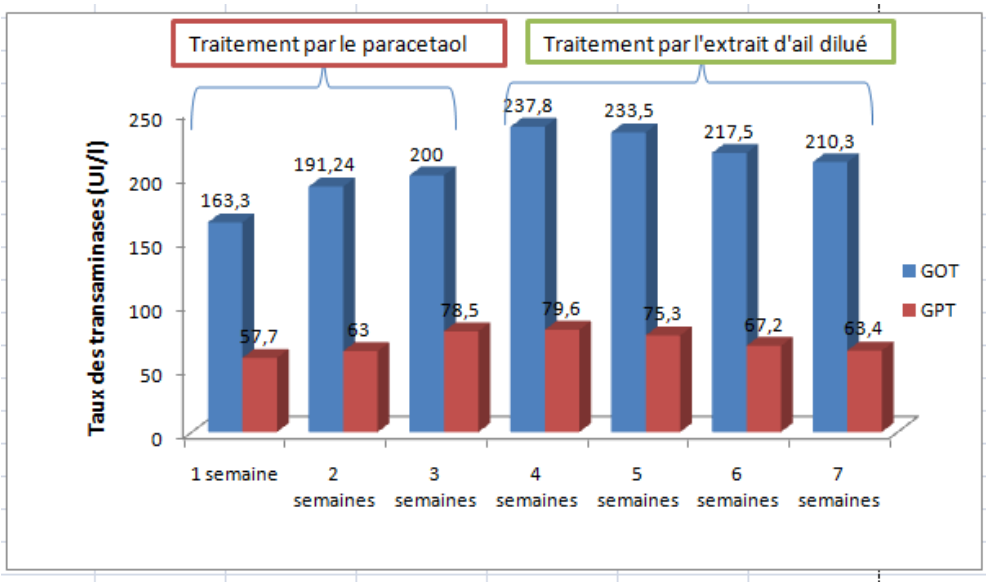


Figure.III.27 : Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot 4.

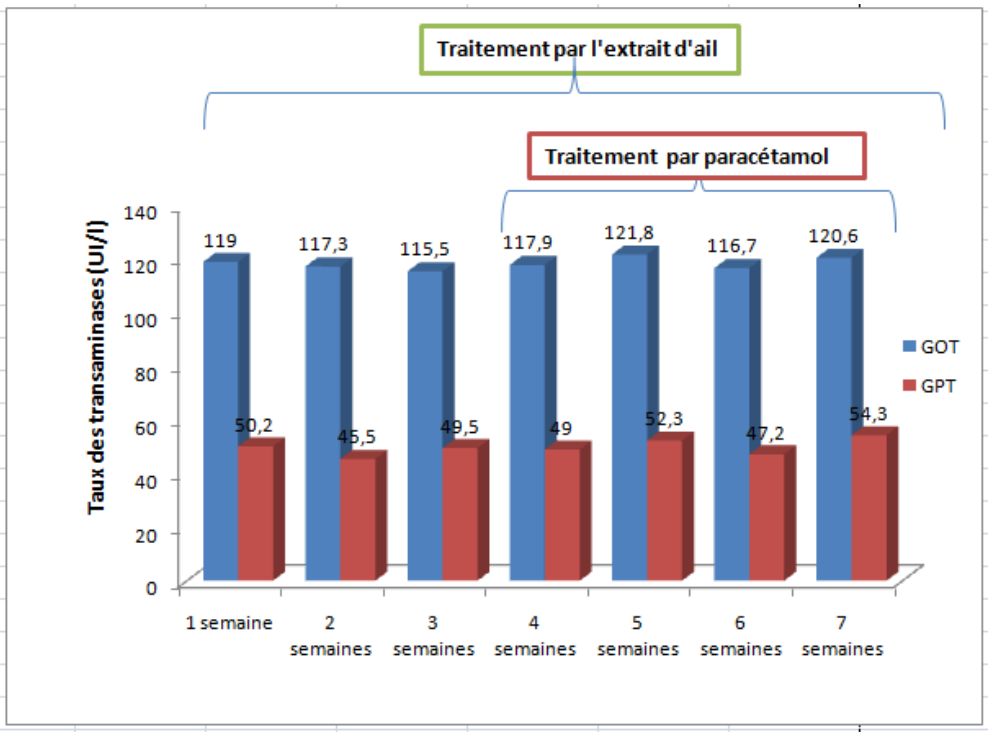


Figure.III.28 : Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot 8.

Le tableau III.4 montre le taux des transaminases chez les rats considérés comme témoins (Lot 5).

Tableau.III.4. Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin du lot des rats témoins (Lot 5).

	GOT (UI)	GPT (UI)
1ère semaine	110,33	45,4
2ème semaine	111,70	48,3
3ème semaine	113,02	49

L'analyse des figures (III.25, III-26, III.27 et III.28) montre que le taux des GOT et GPT augmente dans le sérum sanguin après chaque semaine de prélèvement pour les trois lots (2, 3,4) des rats administrés par le paracétamol.

Après un traitement de trois semaines par l'extrait d'ail, une diminution significative de l'activité enzymatique des transaminases (GOT, GPT) a été observée chez le lot 1 des rats traités par l'extrait d'ail le plus concentré. Une augmentation des transaminases a été remarquée pour le lot 3 des rats traités par l'extrait d'ail le moins concentré, même résultat pour le lot 2 des rats qui n'ont pas reçu du traitement avec l'extrait d'ail.

D'après les résultats obtenus, une atteinte hépatique a été constatée, elle est démontrée par une augmentation significative de l'activité des transaminases dans le sang pour les 3 lots des rats qui ont reçu du paracétamol pendant trois semaines. Des lésions hépatiques ont été induites par ce médicament, ces résultats confirment que le paracétamol (Acétaminophène) est hépatotoxique.

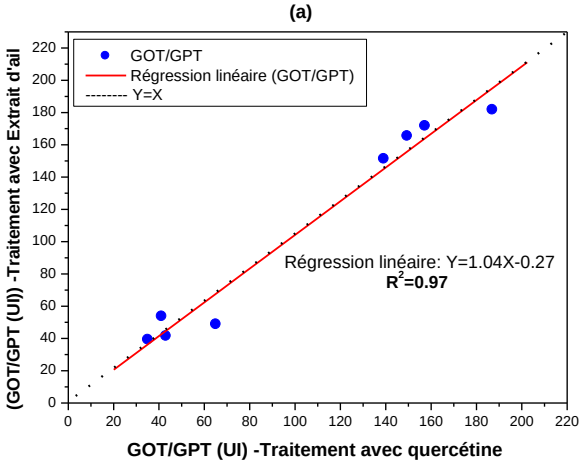
La diminution des transaminases chez les rats du lot 3 (GOT=181.57UI, GPT=48.7UI) traités par l'extrait d'ail concentré signifie que l'ail a un effet curatif vis-à-vis l'hépatite cytotoxique. Par contre, le traitement des rats du lot 4 (GOT=237UI, GPT= 79.6UI) par l'extrait d'ail dilué n'est pas significatif, cela pourrait être due au potentiel antioxydant de l'ail qui varie en fonction de la concentration. Cependant, pour le lot 2

non traité par l'extrait d'ail (GOT=175.5UI, GPT=87.5UI), l'augmentation est plus remarquée.

Les résultats de l'effet préventif et protecteur de l'extrait d'ail sont indiqués dans la Figure.III.28. Des différences significatives par rapport aux rats normaux ont été constatées tant au niveau du GOT qu'au niveau du GPT, après traitement avec des surdoses du paracétamol sur des animaux prétraités par l'extrait d'ail. En effet, le taux des transaminases est resté autour de sa valeur initiale chez les groupes prétraités par l'extrait (0,238±0,052 et 0,218±0,018 µU/ml) ; par contre, une augmentation significative des transaminases (P<0,001) a été obtenue chez les rats non protégés contre les surdoses du paracétamol.

III.3.1. Corrélation entre l'activité antioxydante et l'activité hèpatoprotectrice de l'extrait d'ail

La figure III-29 montre les corrélations entre l'activité hèpatoprotectrice de l'extrait d'ail et l'activité hépatoprotectrice des composés phénoliques.



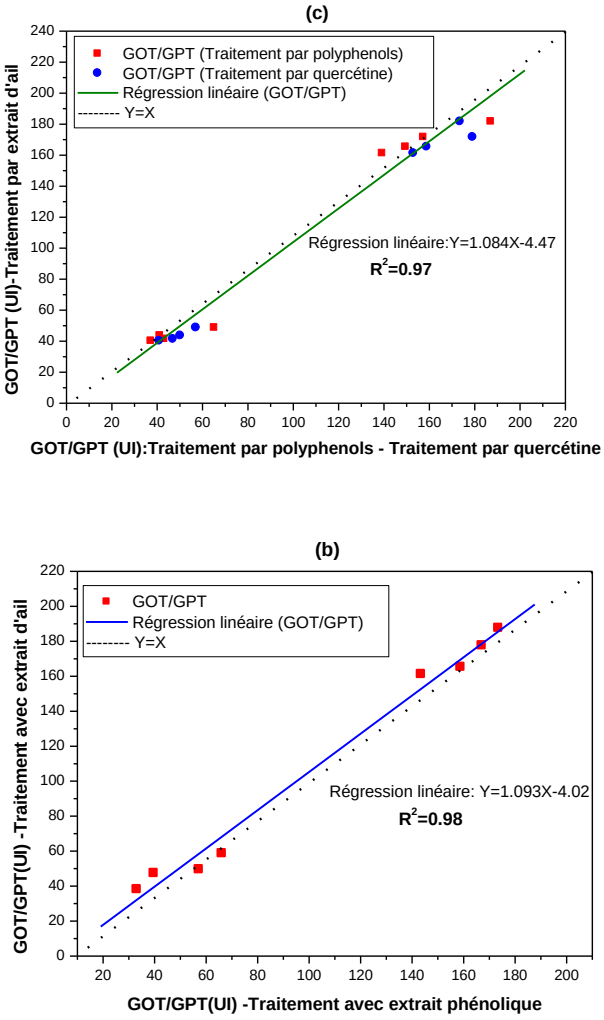


Figure.III.29. Corrélation entre le Taux des transaminases (GOT, GPT) dans le sérum sanguin après traitement par extrait d'ail et : a. (GOT, GPT) traitement par quercitrine pur, b. (GOT, GPT) traitement par un extrait de polyphynols, c. (GOT, GPT) traitement par quercitrine et (GOT, GPT) traitement par un extrait de polyphénols.

Une bonne corrélation positive (R^2= 0.97) est observée entre les valeurs de GOT et de GPT obtenues avec l'extrait éthanolique d'ail avec celles obtenues par la quercétine et par l'extrait phénolique (Figure III.29). Ces observations sont révélatrices d'une propriété antioxydante des extraits. En outre, ces résultats suggèrent que l'extrait d'ail a montré une meilleure activité hèpatoprotectrice due principalement à la présence des polyphénols et des flavonoïdes dans l'extrait d'ail.

Par conséquent, les effets antioxydants des composants phénoliques de l'extrait méthanolique de l'ail ont effectivement diminué le stress oxydatif et ont par conséquent produit une activité hépatoprotective significative chez les animaux dont le foie est atteint.

En conclusion, Le potentiel hépatoprotecteur peut être lié à la propriété antioxydante des phytoconstituants de l'ail. Ces résultats peuvent être utiles pour expliquer les valeurs médicinales des l'ail sur l'hépatotoxicité médicamenteuse du foie.

Suite à cela, l'ail et ses composants méritent plus d'attention que possible comme médicaments alternatifs non toxiques rentables pour retarder ou prévenir les complications d'hépatotoxicité médicamenteuse.

III.3.2. Mécanisme antioxydant de l'ail sur l'hépatotoxicité médicamenteuse du foie

L'extrait d'ail exerce son action protectrice et antioxydante contre la lésion hépatique induite par le paracétamol par la dégradation de la peroxydation lipidique médiée par les surdoses de ce médicament par une diminution de la production des radicaux libres mêmes (Anoush et al.,2009). Une étude antérieure sur l'activité antioxydante in vitro d'extraits éthanoliques d'ail a montré que l'extrait possède des activités potentielles de purification des radicaux libres DPPH, superoxyde et NO (Jamshed et al., 2012). Dans la présente étude, l'extrait éthanolique a montré une activité antioxydante potentielle in vivo, car il a diminué proportionnellement les niveaux élevés en transaminases du foie. Des études antérieures suggèrent que la consommation d'ail a augmenté proportionnellement les niveaux réduits d'activité SOD, catalase et peroxydase cytosoliques du foie. Ces enzymes antioxydantes sont impliquées dans la réduction des espèces réactives d'oxygène (ROS) et les peroxydes produits dans l'organisme vivant. Ils jouent donc un rôle essentiel dans le maintien d'un état redox équilibré. La restauration de l'activité SOD vers une valeur normale indique que l'extrait éthanolique peut aider dans les mécanismes de défense cellulaire en empêchant l'oxydation de la membrane cellulaire (Sha et al., 2015).

III.4. Effet antidiabétique de l'ail

Une augmentation significative du sucre dans le sang (4.75 g/L) a été obtenue après un traitement par l'alloxane. Ce médicament est couramment utilisé pour induire le diabète chez les animaux de laboratoire. Il provoque une nécrose bien connue des cellules β-pancréatiques, réduisant ainsi la sécrétion d'insuline (Salem et al., 2009).

III.4.1. Effet de l'alloxane sur le glucose dans le sérum des rats

Afin d'établir un modèle de rats diabétiques, un groupe de cinq animaux est injecté par voie sous-cutanée avec (0,8 g/kg de poids corporel) de l'alloxane monohydraté 98%. Les résultats des rats glycémiques mesurés pendant cinq semaines, la (Figure III.30) indiquent que le taux de glucose mesuré à 48h après injection (4,16±0,21g/l) a augmenté au cours des quatre premières semaines pour atteindre 5,00±0,11g/l. Une légère diminution du taux de sucre dans le sang a été observée entre la troisième semaine et la cinquième semaine après injection d'alloxane.

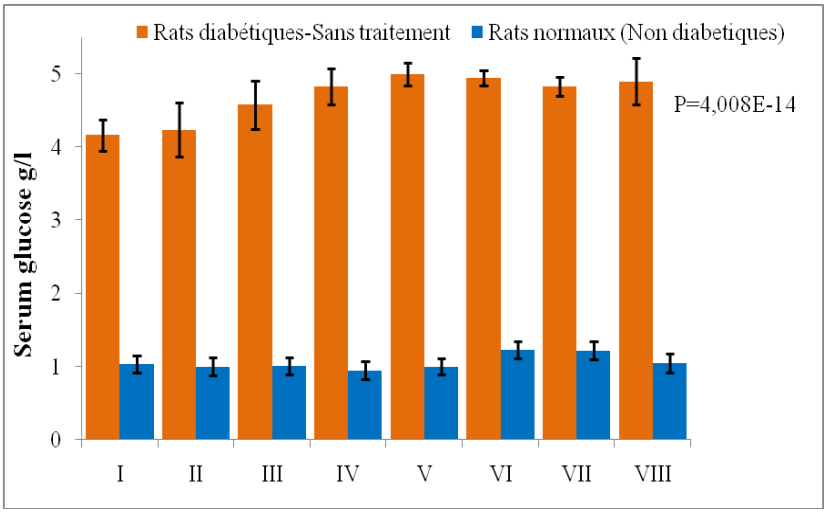


Figure.III.30. Rats diabétiques induits par l'alloxane. Chaque colonne représente la moyenne de six rats. I- Après 48 heures d'injection de l'alloxane monohydrate 98%, II- 72 heures Après la première injection d'alloxane, III- Une semaine après l'injection d'alloxane, IV- Deux semaines après, V- Après trois semaines, VI- Quatre semaines après, VII- Cinq semaines après. Signification statistique vs. normal contrôle ($p < 0.001$).

III.4.2. Effet de l'extrait d'ail sur le glucose sérique chez les rats diabétiques

L'effet de l'extrait d'ail sur le taux du glucose dans le sang chez les rats diabétiques est décrit dans la figure III.31. Chez les rats traités à l'alloxane, l'administration de l'extrait

d'ail à une dose de 2 ml/kg de poids corporel induit une diminution significative de la glycémie après 24 h de traitement et ce de 4,47±0,44 g/l à 2,00±0,19 g/l. La glycémie s'est stabilisée après une semaine du traitement, atteignant 1,04±0,08 g/l et 0,86±0,10 g/l respectivement à la deuxième et à la troisième semaine.

Il est très important de souligner qu'une ré-augmentation graduelle mais légère de la glycémie a été observée une semaine après la fin du traitement. Les taux enregistrés sont de 1.23±0.11 g/l, 1.33±0.04 g/l et 1.35±0.06 g/l pendant la première semaine, la deuxième et la troisième semaine, respectivement.

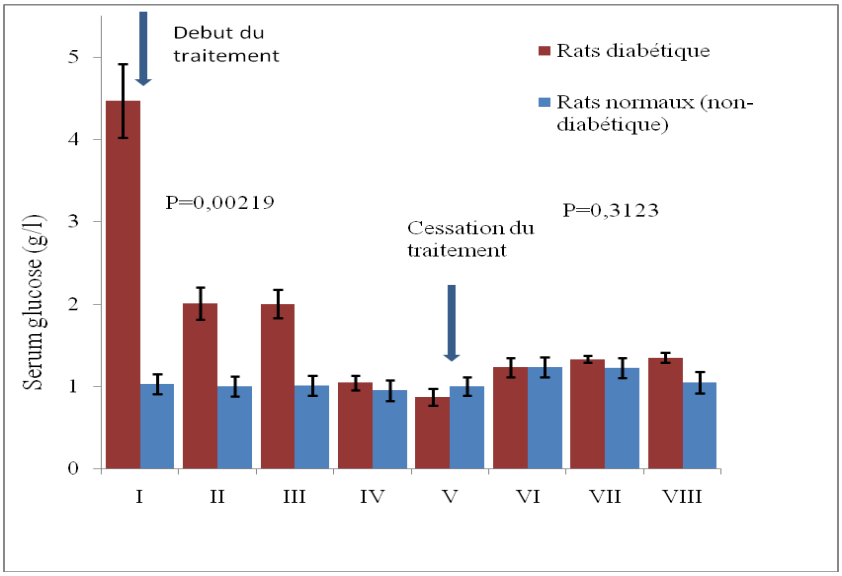


Figure.III.31. Effet de l'administration orale d'extrait aqueux frais d'ail sur des rats diabétiques (alloxaniques) à des doses de 1,5 ml ou 0,75 g / kg pc. Chaque colonne représente la moyenne de six rats. I- Après 48 heures à partir de l'injection d'alloxane monohydraté à 98%, II- Après 24 heures de traitement, III- Une semaine de traitement, IV- Deux semaines de traitement, V- Trois semaines de traitement, VI- Une semaine sans traitement, VII- Deux semaines sans traitement, VIII - trois semaines d'interruption du traitement. Signification statistique vs. normal contrôle ($p < 0.01$).

III.4.3. Effet de la Metformine sur les taux de glycémie chez les rats diabétiques

Des rats diabétiques ont été testés par la Metformine HCl 98%, un médicament connu par son effet hypoglycémiant. L'objectif de cette étude vise à comparer l'effet de l'extrait d'ail obtenu avec un médicament antidiabétique de référence (Figure III.32).

Les rats alloxaniques ayant reçu, par gavage quotidien, une dose de 0,05 g/kg de chlorhydrate de metformine 98%, ont subi une légère diminution de la glycémie, soit

de 3,87±0,61 g/l relevée à 48h à 2,58±0,43 g/l après 72 heures de traitement. Une chute de la glycémie a été signalée ou remarquée par la suite pour atteindre un niveau minimum après deux semaines de traitement. Les taux du glucose enregistrés pendant une semaine, deux semaines et trois semaines du traitement étaient de 1,98±0,22 g/l, de 2,58±0,43 g/l et de 0,98±0,26 g/l respectivement.

À la lumière de ces résultats, une dose de 0,8 g/kg d'extrait d'ail est plus efficace que la Metformine. Il convient de noter que l'arrêt du traitement a conduit à une réapparition rapide de l'hyperglycémie, qui a atteint (3,42±0,40 g/l) à la quatrième semaine d'arrêt du traitement contrairement à l'effet de l'extrait d'ail aqueux.

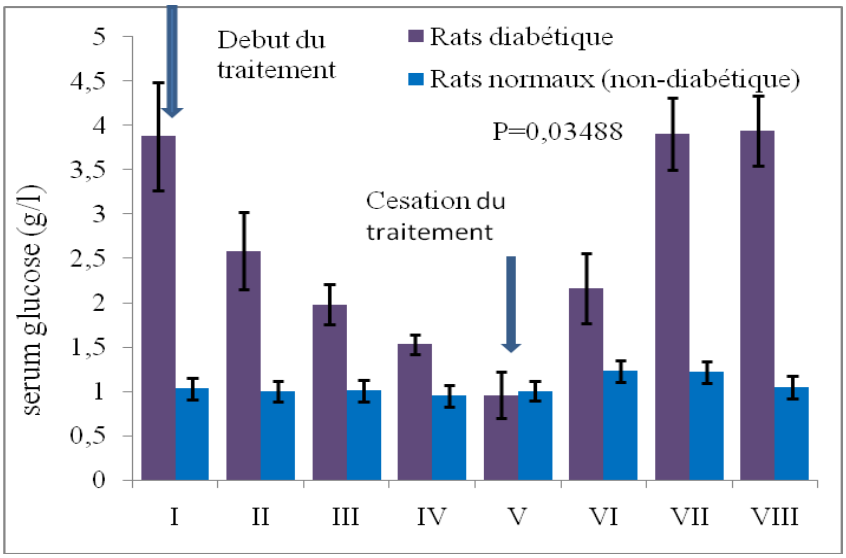


Figure.III.32. Effet de l'administration orale de la Metformine (200 mg / kg) sur le glucose sérique chez les rats diabétiques. Chaque colonne représente la moyenne de six rats. I- 48 heures après l'injection d'alloxan monohydraté 98%, II- après 24 heures de traitement, III- Une semaine de traitement, IV- deux semaines de traitement, V- Une semaine sans traitement, VI- deux semaines sans traitement, VII - Trois semaines d'interruption du traitement, VIII-Quatre semaines d'interruption du traitement. Signification statistique vs. normal contrôle ($p < 0.05$).

III.4.4. Effet de l'extrait d'ail sur le glucose sérique chez des rats témoins

L'effet de l'extrait d'ail sur le glucose sérique dans le groupe des rats normaux a montré que l'ail n'a aucun effet sur le niveau glycémique (Figure III.33). Le groupe des rats considérés comme témoins n'a pas montré d'hypoglycémie, bien qu'ils aient reçu un traitement quotidien de l'ail pendant sept semaines. Un échantillon du sang a été prélevé chez des rats témoins et traités avec 1,5 ml (0,8 g/kg de poids corporel) d'un

extrait d'ail frais. L'administration d'extrait d'ail, n'a pas modifié le taux du glucose dans le sérum sanguin chez les animaux non traités avec de l'alloxane. Il est bien mentionné que la glycémie était stable au cours des trois semaines suivant l'administration de l'extrait d'ail. Il en est de même pour la période postérieure à la fin du traitement, soit deux semaines plus tard. Cela indique que l'extrait n'a pas d'effet hypoglycémique chez les sujets normaux, plutôt qu'un effet régulateur.

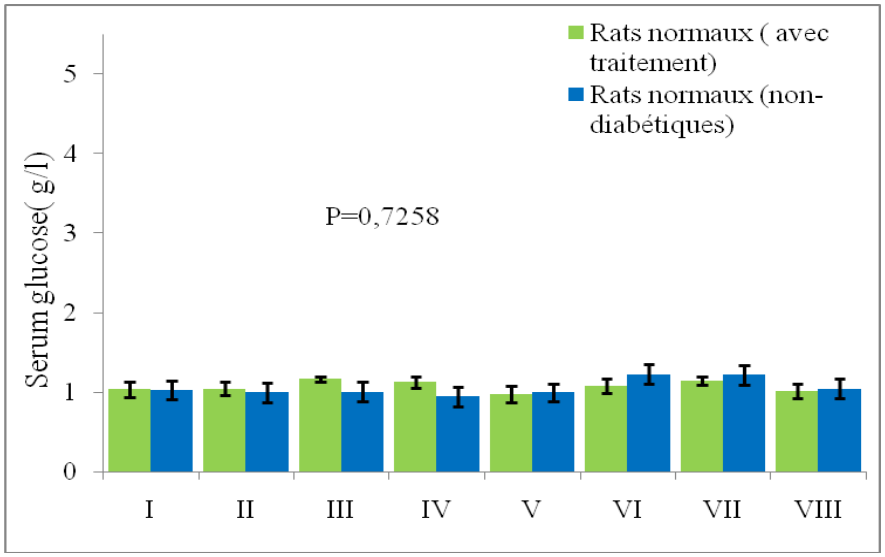


Figure.III.33. L'effet de l'administration orale d'extrait d'ail à une dose de 1,5 ml ou (0,75 g / kg) sur le glucose sérique chez des rats normaux (non induite par l'alloxane). Chaque colonne représente la moyenne de six rats. I- 48 heures d'observation, II- après 24 heures de traitement, III- Une semaine de traitement, IV- deux semaines de traitement, V- trois semaines de traitement, VI- Semaine sans traitement, VII- Deux semaines d'interruption du traitement. Signification statistique vs. normal contrôle ($p > 0.05$).

L'alloxane (2,4,5,6-tétraxypyrimidine, 5-6-dioxyuracile) a été largement utilisé pour induire le diabète sucré (DS) chez des animaux expérimentaux pour étudier la maladie elle-même et ses complications en induisant une dégénérescence et une nécrose des cellules β pancréatiques (Semantee, 2011).

L'alloxane induite par une hypoglycémie sévère a été attribuée à une hyperinsulinémie après une cytolyse bêta provoquée par un potentiel rédox altéré (Elsner et al., 2006 ; Jung et al., 2008). En effet, l'alloxane est connu pour détruire définitivement les cellules β sécrétrices d'insuline dans les îlots de Langerhans, ce qui est un effet irréversible (Mahmoodi ou et al., 2006).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait d'ail réduit de manière significative la glycémie chez les rats diabétiques induits par l'alloxane. Le même effet a été confirmé par (Mahmoudi et al., 2006 ; Eidi et al., 2006 ; Bnouham et al., 2006 ; Bhagyalakshmi et al., 2005 ; Jelodar et al., 2005).

Plusieurs études ont montré l'effet hypoglycémique de l'ail, attribué principalement aux composés de type allicine. Le mécanisme de l'action hypoglycémique implique probablement une stimulation directe ou indirecte de la sécrétion d'insuline. Selon certains auteurs, les mécanismes exacts de l'ail en tant qu'agent antidiabétique ne sont pas toujours clairs (Wang et al., 2017). Il peut augmenter l'activité de l'insuline, améliorer la sécrétion d'insuline (Liu et al., 2005), ou augmenter les cellules bêta dans le pancréas en activant leur régénération (Aguayo-Mazzucato et Bonner-Weir, 2017). La fibre de la plante peut interférer avec l'absorption des glucides, ce qui affecte la glycémie (Ebomoyi et al., 2010).

Liu et al., (2005) ont suggéré que l'augmentation de l'activité de l'insuline peut être causée par la stimulation directe des cellules β pancréatiques ou la production indirecte d'hormones gastro-intestinales associées au pancréas. Les résultats obtenus démontrent que le groupe de rats non induits par l'alloxane et traités avec de l'extrait d'ail n'a pas montré d'hypoglycémie. Cela permet de suggérer que le taux de la glycémie est resté stable après la cessation du traitement à l'extrait d'ail. Ceci est probablement dû à un effet régulateur impliquant l'insuline plutôt qu'un contrôle du métabolisme du glucose observé principalement parmi les rats diabétiques induits par l'alloxane traités avec la Metformine.

D'autres observations révèlent un effet hypoglycémiant significatif à la fois des extraits d'ail et de la Metformine chez des rats diabétiques pendant le traitement. En effet, l'étude comparative des effets de l'ail frais et de l'extrait de Metformine sur les rats alloxaniques a également révélé que, pendant la phase de préparation du traitement, une diminution significative de la glycémie a été observée. En outre, d'après une étude menée par Freeman et Horton, (2012), la Métformine ne stimule pas la sécrétion d'insuline et n'a par la suite aucun effet hypoglycémique chez les rats normaux.

Dans la présente étude, bien que la metformine ait contribué à une diminution marquée du taux de sucre dans le sang après deux semaines de traitement ; il n'a pas pu maintenir le même niveau une fois que le traitement a été interrompu, alors que l'extrait d'ail a des effets plus prononcés observés à la figure III.31. En revanche, les rats précédemment traités avec l'extrait d'ail frais ont des taux de glycémie proches de la valeur moyenne et presque constante au cours de cette phase, ce qui pourrait être un mécanisme dépendant de l'insuline.

Selon Scarpello et al., (2008) ; Stumvoll et al., (1995), l'action de réduction du glucose est principalement due à l'amélioration de la résistance à l'insuline hépatique, entraînant une réduction de la production de glucose hépatique, ce qui entraîne une réduction de la gluconéogenèse.

III.4.5. Mécanisme possible de l'action antidiabétique de l'ail

L'extrait d'ail, administré séparément, ne génère pas d'effet hypoglycémique chez les rats diabétiques induits par l'alloxane. En ce qui concerne le groupe de rats non induits par l'alloxane (non diabétiques), des résultats similaires ont été obtenus. En outre, aucune action sur la sécrétion d'insuline des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas n'a été notée. Un rappel du mode d'action Metformine est utile pour une meilleure compréhension du mécanisme et de l'action de l'extrait d'ail, en ce qui concerne l'hypoglycémie.

La Metformine est un biguanide, caractérisé par des effets métaboliques complexes ; il est considéré comme un agent anti-hyperglycémique. Il réduit la concentration sanguine du glucose dans le diabète de type 2 sans provoquer une augmentation des taux d'insuline circulante (hypoglycémie). Mais un nombre importants d'études cliniques, y compris des modèles animaux, suggèrent que la fonction principale de la Metformine est de diminuer la production du glucose hépatique (Cusi et al., 1996), principalement en inhibant la gluconéogenèse hépatique (Natali et Ferrannini, 2006). Ceci est réalisé soit par la réduction de l'absorption hépatique des substrats gluconéogènes (Edgerton et al., 2009), soit par la réduction de l'activité enzymatique

impliquée dans cette voie (Hundal et al., 2002). L'accumulation de la Metformine dans le foie est plus élevée par rapport aux autres tissus (Wilcock et Bailey, 1994). Cette approche pourrait s'expliquer par l'existence d'une affinité élevée entre la molécule de Metformine et le foie

L'étude des mécanismes moléculaires de la Metformine peut fournir des indications précieuses pour comprendre le mécanisme et la cible sur laquelle les composés de l'ail, ayant cette activité antidiabétique, sont particulièrement actifs. On pourrait donc argumenter que les composés soufrés dans l'ail peuvent agir sur les hépatocytes du foie, soit pour empêcher la libération du glucose par le foie (gluconéogenèse), soit en favorisant la glycogenèse (transformation du glucose en glycogène). Les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet hypoglycémique de l'extrait d'ail à l'aide de rats diabétiques induits par l'alloxane défavorisent cette approche qui repose sur des mécanismes complexes d'inhibition et de stimulation enzymatique.

Une deuxième approche concerne une action probable du pancréas en tant que protecteur des cellules bêta ou de l'inducteur d'insuline. Les résultats des traitements sur des rats diabétiques induits par l'alloxane qui ont été obtenus en utilisant la Metformine d'une part et l'extrait d'ail sur l'autre suggèrent que l'hypothèse la plus probable est celle d'une activité enzymatique pancréatique et non hépatique de l'extrait d'ail. Cette suggestion est en accord avec celle rapportée par (Bonnevie-Nielsen et al., 1981). Ce dernier a montré que l'ail peut améliorer le contrôle glycémique grâce à une amélioration de la fonction pancréatique. En outre, dans une étude assez récente, Santhosha et al., 2013 suggèrent que certains composés de l'ail aident le pancréas à augmenter la quantité de glutathion (GHS) et par conséquent, à favoriser une augmentation de la sécrétion d'insuline.

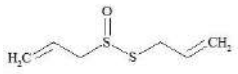
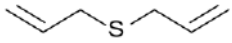
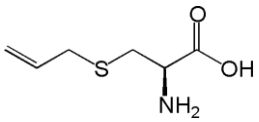
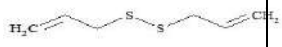
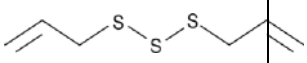
L'alloxane inhibant spécifiquement la glucokinase provoque un état de diabète insulinodépendant par sa capacité à induire la formation des radicaux libres comme le superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'hydroxyle (OH) entraînant la destruction de cellules bêta pancréatiques (Lenzen, 2008). En outre, l'immunité contre

les radicaux libres établie par le glutathion (GSH) est significativement compromise après leur activité neutralisante (Huk et al., 1998). La production excessive des radicaux libres (stress oxydatif) provoque une perturbation de l'état des oxydants intracellulaires pancréatiques, et peut causer des dommages aux macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides (Prakasam et al., 2005b), facilitée par une diminution de la capacité des défenses antioxydantes du corps. Dans ce contexte, certains auteurs (Sarkhail et al., 2007, Aguayo-Mazzucato et Bonner-Weir, 2017) ont préconisé une approche pharmacologique inhérente aux phénomènes, qui se produisent au niveau moléculaire, capable de modifier les mécanismes physiologiques du pancréas. C'est le cas de plusieurs molécules bioactives isolées des plantes, qui influencent les cellules β pancréatiques et stimulent la sécrétion d'insuline par leurs activités anti-oxydantes.

L'extrait d'ail, dont l'activité anti-oxydante non enzymatique est très connue, a été attribuée à la présence de composés soufrés organiques tels que le sulfate diallyl, les thiosulfinates, les sulfoxydes et la S-allylcysteine (SAC) (Borek, 2001 ; Butt et al., 2009). Ces molécules neutralisent les radicaux libres. On peut en déduire qu'ils possèdent des propriétés protectrices pour les cellules bêta et induisent une amélioration notable des taux de glycémie. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet de l'ail et de ces composés organiques sur les radicaux libres. Le rôle antioxydant important de l'ail dans le piégeage et la neutralisation des espèces d'oxygène réactif (ROS) peut également être attribué aux polyphénols, composés avec des groupes hydroxylphénoliques, Ar-OH, qui peuvent fournir H aux radicaux peroxyles L-OO$^{\bullet}$ et donc neutraliser sous la forme d'hydroxydes

L-OOH Ar-OH + L-OO$^{\bullet}$→ Ar-O$^{\bullet}$+ L-OOH **(**Apak et al., 2007)

Tableau.III.5. Structures des principaux constituants de l'ail responsables de l'activité antidiabétique et antioxydante.

Composes Organo sulphuré	**Structure chimique**	**Famille**	**Activités physiologiques**	**Références**
diallyl thiosulfinate Allicin		Thiosulfinates	Scavenges hydroxyl radicals- hypoglycaemic effect	Eidi et al., 2006; Martin et al., **2012**
Diallyl sulphide DAS		Organosulphur volatiles	exhibit antioxidant effect	Amagase et al., 2001
S-allyl-L-cysteine SAC		Water soluble organosulfur compounds	Exhibited hypoglycemic effect stimulates insulin secretion in β-cells of normal rats	Srinivasan, 2005; Liu et al., 2005
Diallyl disulfide DADS		Organosulfur volatiles	Reduce reactive oxygen species levels and increasing *GSH*- Protect against free radical-mediated cell death	Amagase, 2006
Di-allyl-tri-sulphide DATS		Organosulfur volatiles	Inhibits hyperglycemia-induced ROS production	Amagase, 2006

Les principaux composés soufrés de l'ail, y compris les sulfures ou les fractions disulfure (Tableau III.5), possèdent, en plus de leur effet sur les propriétés antidiabétiques, des propriétés réductrices qui neutralisent facilement l'effet des espèces réactives d'oxygène (Okada et al., 2005 ; Nishimura et al., 2000). Cela suggère qu'il existe une relation directe entre les activités antioxydantes et antidiabétiques des

composés soufrés dans l'ail. Ce qui permet de dire que l'extrait d'ail a une activité hypoglycémique dont les effets sont semblables à ceux du glutathion (GHS) et agissent comme un antioxydant, bien que les mécanismes d'action soient différents. Les deux sont des antioxydants non enzymatiques et la majorité des composés d'ail sont organosulfure.

Le glutathion agit en réduisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les peroxydes lipidiques,

2 GHS + H_2O_2→ GSSG + $2H_2O$, ou par sa caractéristique nucléophile contre les radicaux hydroxyles.

$$\begin{cases} G\,SH + {}^{\bullet}OH \rightarrow GS^{\bullet} + H_2\,O \\ 2GS^{\bullet} \rightarrow GSSG \end{cases}$$

Toutefois, le rôle antioxydant des composés soufrés de l'ail semble provenir de sa capacité à réagir avec les ROS Soit par :

- Elimination du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) suite à l'interruption de la réaction en chaîne de l'auto-oxydation par la synergie avec d'autres antioxydants, et par la prévention de la formation des radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$): destructeur des cellules β (réaction Fenten).

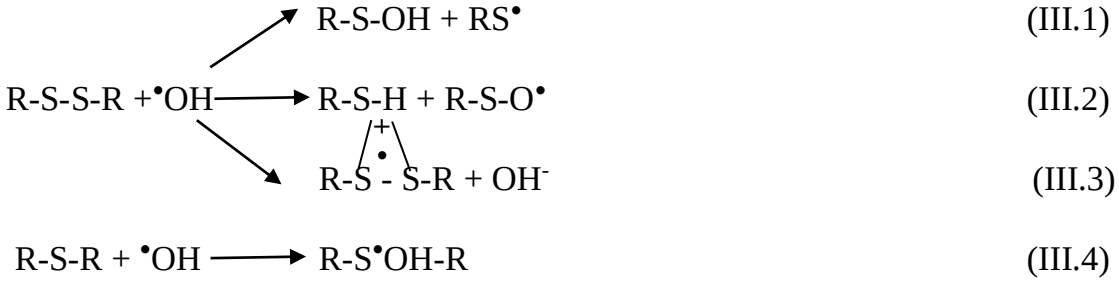
$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^{\bullet} + Fe^{3+} + OH^{-}$$

Ceci est probablement dû à différentes interactions intermoléculaires entre les différents composés de l'ail (liaisons hydrogènes et disulfure).

- Des interactions avec d'autres composés intracellulaires du pancréas, le GSH (Kalra et al., 2006) et en particulier (le SAC) contenant les groupes chimiques : thiol, hydroxyle et amine responsables par leur capacité à former des liaisons intermoleculaires. En outre, l'activité antioxydante d'un composé d'organosulfure libre était beaucoup plus faible que celle de l'extrait d'ail, selon la nature des molécules environnantes (Amagase et al., 2001).

- Action sur le radical hydroxyle, ou les sulfures et les composés organiques disulfure réagissant avec les radicaux OH•. Trois mécanismes sont les plus probables : Réaction

de substitution radicalaire (III.1), (III.4) ; des réactions de réarrangement (III.2) formation d'un radical disulfure et des anions hydroxyles (III.3)



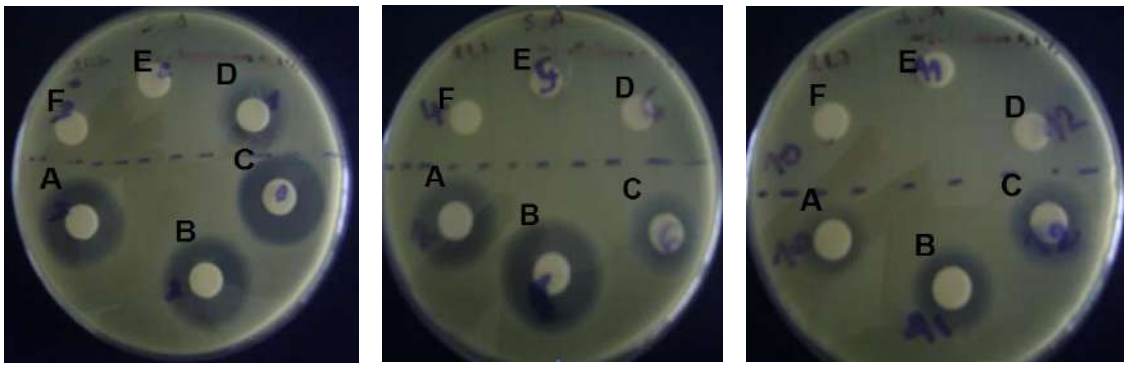
- D'autre part, aucune hypoglycémie dans le groupe des rats normaux, non induites par l'alloxane (groupe 4) et traités avec de l'extrait d'ail frais, suggère qu'il n'y a pas d'hyperinsulinémie et souligne l'effet trophique des composés soufrés par rapport à la sécrétion d'insuline. En d'autres termes, ces substances bioactives ne stimulent pas les cellules β directement et augmentent la sécrétion d'insuline, mais protègent et régénèrent les cellules β par piégeage (ROS), ce qui inhibe l'activité de ces cellules par oxydation.

- Lorsque l'extrait d'ail détruit (ROS) dans le pancréas, le glutathion altéré (GHS) reprend son activité et son rôle d'agent neutralisant (ROS), c'est-à-dire que l'extrait d'ail stimule (GSH). En outre, il a été démontré que le composé, organosulfuré, peut stimuler la synthèse du glutathion, qui est un important antioxydant intracellulaire (Banerjee et al., 2003). Ceci explique l'effet hypoglycémique durable observé dans le lot de rats diabétiques, même après la cessation du traitement avec l'extrait d'ail (groupe 2) contrairement à l'action non durable de la metformine (groupe 3).

- Compte tenu des données ci-dessus, les molécules antioxydantes présentes dans l'extrait d'ail peuvent jouer un rôle important dans la réduction des complications du diabète. L'extrait d'ail diminue l'activité des radicaux libres chez les rats atteints de diabète induite par l'alloxane. Cela se produit en induisant une normalisation du stress oxydatif dans le pancréas.

III.5. Activité antimicrobienne de l'extrait aqueux d'ail

Les résultats de l'effet antibactérien de différents extraits d'ail (Aqueux, Méthanolique et Ethanolique) ainsi que des solutions de quercetine, d'extrait phénolique et d'alliine vis-à-vis de trois souches bactériennes utilisées dans cette étude sont représentés dans le tableau.III.6 :



E.coli ***B.subtilis*** ***S.aureus***

Figure.III.34. Aromatogrammes de l'activité antibactérienne (A) de l'extrait aqueux d'ail pour une concentration C=0.75g/ml ;(B) de l'extrait Methanolique d'ail ; (C) de l'extrait Ethanolique d'ail ; (D) une solution d'alliine ; (E) une solution de quercitine ; (F) une solution de polyphenols.

L'activité antimicrobienne des extraits d'Allium a été testée in vitro en utilisant la méthode de la diffusion sur gélose (Figure III.34). Les extraits d'eau (A), du méthanol (B) et de l'éthanol (C) présentaient un certain niveau d'activité antimicrobienne. Par contre, les extraits méthanoliques étaient les plus puissants notamment contre *E.coli* (CMI=0,046 µg/ml) et *B. subtilis* (CMI=0,023 µg/ml), ce qui indique une meilleure activité antimicrobienne, alors que les extraits d'eau présentaient une activité inhibitrice plus faible contre *S.aureus* (CMI=0.375 µg/ml). L'extrait éthanolique présente une faible activité antibactérienne vis-à-vis *B.subtilis* (CMI=0.73 µg/ml) et *S.aureus* (CMI=1.00 µg/ml) par rapport à *E.coli* (CMI=0.375 µg/ml). D'autre part, aucune des solutions pures des composés phénoliques, quercétine (E) et extrait phénolique (F), ne présentaient une activité antimicrobienne. Une étude menée par Guil-Guerrero et al 2016 montre que l'activité antimicrobienne provenait d'un extrait riche en polyphénols est plus forte que celle des polyphénols purs, En outre, certaines combinaisons de polyphénols monomères ont montré le plus haut niveau d'activité antibactérienne. Ces résultats suggèrent que l'activité antibactérienne des composés

phénoliques de l'extrait d'ail est provoquée par un effet synergique des polyphénols, dû aux interactions entre les différents composés, qui peuvent dans certains cas augmenter leurs efficacités antimicrobiennes contre les bactéries. Cependant, une légère activité est observée pour la solution d'alliine, un composé sulfuré de l'ail contre *E. coli* (CMI=1.12 µg/ml).

La plus grande résistance des bactéries testées envers l'extrait des polyphénols et la quercétine peut être expliquée par la structure des composés phénoliques vis à vis de la structure des parois des souches testées.

Tableau.III.6. Diamètres des zones d'inhibitions obtenus par la méthode de diffusion sur gélose.

concentration en extrait d'ail (µg /ml)	*Diamètre d'inhibition (cm) Extrait Methanolique*			*Diamètre d'inhibition (cm) Extrait Ethanolique*			*Diamètre d'inhibition (cm) Extrait Aqueux*		
	E.coli	***B.subtilis***	***S.aureus***	***E.coli***	***B.subtilis***	***S.aureus***	***E.coli***	***B.subtilis***	***S.aureus***
1,500	3.15	3.45	2.98	3.00	2.80	2.90	2.45	2.50	2.20
0,750	2.90	3.00	2.15	2.50	2.30	2.75	1.92	1.85	1.50
0,375	2.25	2.50	1.85	2.00	1.70	2.00	1.37	1.25	0.85
0,187	1.55	2.00	1.35	1.80	1.00	1.50	0.95	0.76	-
0,093	1.00	1.50	0.82	1.50	0.73	1.20	0.65	-	-
0,046	0.85	10.00	-	100		1.00	-	-	-
0,023		0.65	-	0.85		-	-	-	-
0,0115	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0057	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Les résultats trouvés par Cushnie et Lamb (2005) suggèrent que plusieurs paramètres peuvent influer sur la détermination de l'activité antimicrobienne comme : le type des micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la concentration, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives dans les métabolismes secondaires.

III.5.1. Effet de la température sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail

Afin d'étudier l'effet du traitement thermique, plusieurs échantillons d'extrait d'ail éthanolique ont été conservés pendant 6 heures à différentes températures (4, 25, 37, 42 et 75°C) (Figure III.31). Ensuite, l'activité antibactérienne résiduelle a été mesurée.

Les résultats obtenus avec l'extrait éthanolique d'ail (Figure III.36 et III.37) montrent que la température de stockage de l'ail a une influence sur le diamètre d'inhibition et par conséquent sur l'activité antibactérienne de l'ail. Les zones d'inhibition deviennent de plus en plus importantes à mesure que la température augmente de 25°C à 37°C.

Cependant, l'augmentation de la température au-dessus de 42°C entraîne une réduction de l'activité antibactérienne de l'extrait obtenu, marquée par une réduction des zones d'inhibition. Les résultats sont en accord avec les travaux réalisés par Lagunas et Castaigne (2008) et Guo et al. (2012).

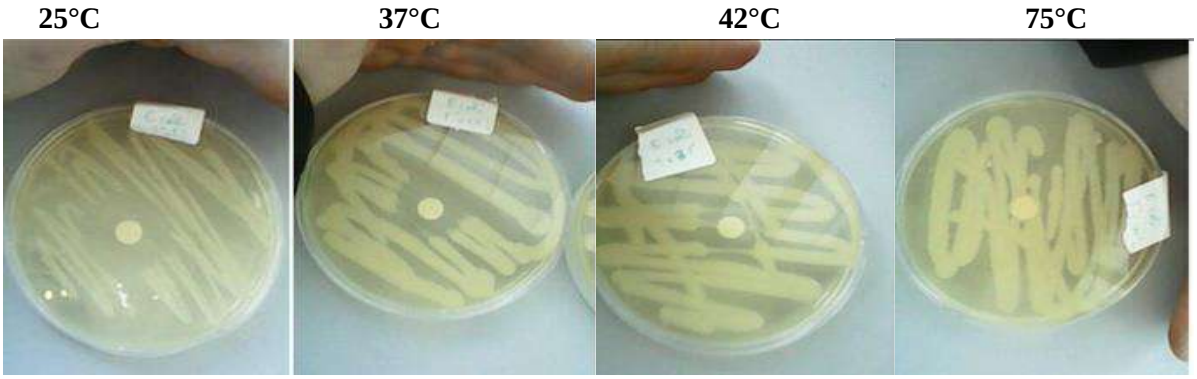


Figure.III.35. Zones d'inhibition pour *Escherichia coli* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé à différentes températures (8-100°C).

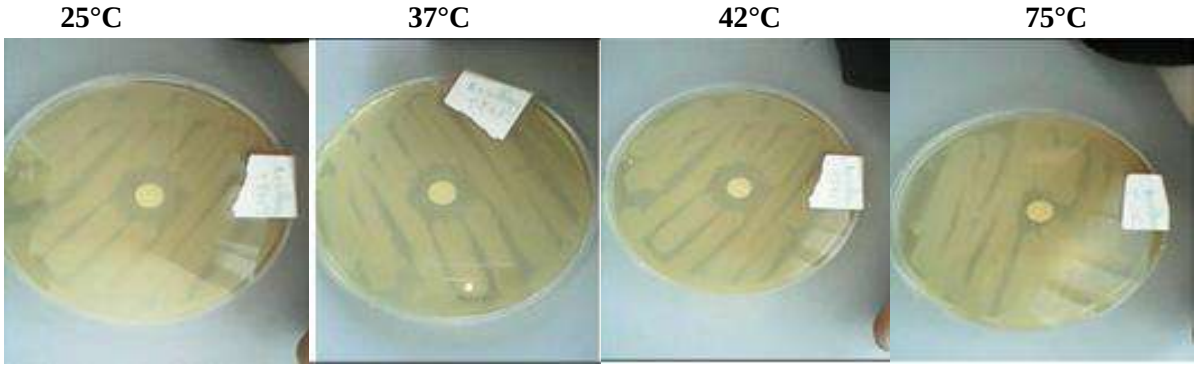


Figure.III.36. Zones d'inhibition pour *Bacillus subtilis* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé à différentes températures (8-100°C).

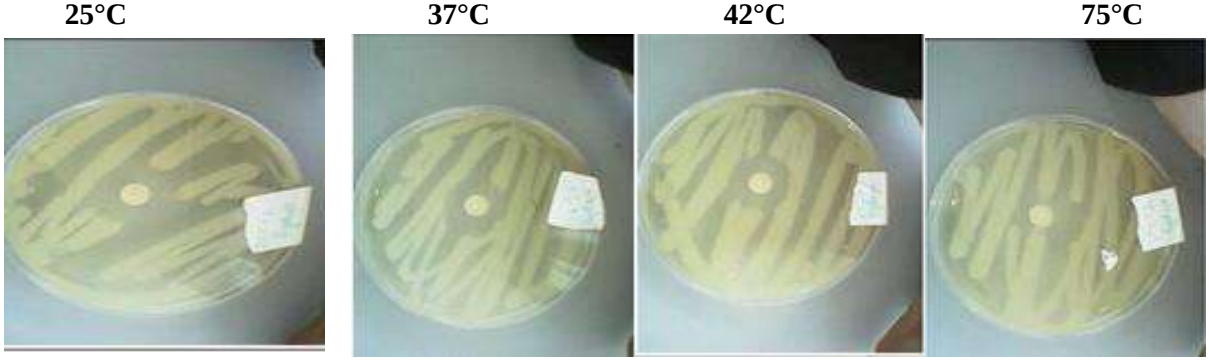


Figure.III.37. Zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus* obtenus pour l'extrait aqueux d'ail incubé à différentes températures (8-100°C).

Dans le but de prévoir la cinétique de l'influence de la température sur la stabilité antibactérienne de l'extrait d'ail au cours du temps pour les trois souches bactériennes. Les résultats ont montré que lors du stockage, cette stabilité change au cours du temps. A température de 4°C, l'extrait d'ail est resté pratiquement stable, il a conservé 99% de son potentiel inhibiteur initial même après six heures de conservation.

Pour la solution stockée à 25°C, l'activité antibactérienne a diminué lentement sur une période de six heures, l'extrait d'ail ayant perdu 90% de son potentiel inhibiteur. A la température de 37°C, une diminution progressive du diamètre d'inhibition durant l'incubation de l'extrait a été enregistrée, elle varie de 30.10 mm à la première heure jusqu'à 11.85 mm à la sixième heure. Dans ce cas, la dégradation des composés antimicrobiens est proportionnelle à la durée du traitement. Cependant, une diminution considérable des diamètres d'inhibition pour des températures plus importantes (T=42° et T=50°C) a été relevée. Pour une température de 42°C, le diamètre de la zone d'inhibition varie de 22,3 mm à la première heure jusqu'à 6.7mm à la quatrième heure. L'absence des zones d'inhibition à partir de la cinquième heure a été observée. A 75°C, les résultats ont montré un effet antibactérien faible qui ne persiste pas plus de trois heures conservation. La thermostabilité de l'allicine a fait l'objet de plusieurs études. Il a été constaté que l'allicine se dégrade rapidement à T=40°C (Wang et al., 2015). Dans son étude datant de 1996, Lawson a rapporté que l'allicine a une demi-vie de 30 à 40 jours à 23°C. Fujisawa et al., (2014), ont montré l'allicine est plus stable à 4° C. Ils ont estimé que la demi-vie de l'allicine était d'environ un an, 7jour et 1 jour à 4°C, 23°C et 37°C respectivement.

Plusieurs études suggèrent que la diminution de la force d'inhibition de l'extrait d'ail est corrélée avec la diminution de la teneur en allicine dans l'extrait conservé à différentes températures et que l'activité antibactérienne est due à l'allicine et à d'autres composés tels que les peptides antimicrobiens, qui pourraient être présents dans l'extrait d'ail (Arzanlou,2016 ; Arzanlou &Bohlooli, 2010). En outre, d'après l'étude de la stabilité chimique de l'extrait d'ail par HPLC, l'allicine présente une instabilité thermique. Sa dégradation donne des dérivés organosulfurés. Comme l'élévation de la

température diminue l'effet antibactérien de l'extrait d'ail, l'allicine est probablement le composé responsable de cet effet antibactérien. Il apparait aussi 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.

Cependant, l'extrait d'ail pourrait être conservé à 4 ° C car le résultat obtenu a montré qu'il n'y avait pas de perte d'activité microbienne à cette température pendant plusieurs heures (Figure.III.38, III.39 et III.40). Par contre, un réchauffement excessif ou des périodes plus longues à des températures plus élevées devraient être évités. La conservation semble être due à l'instabilité des polysulfures et les thiosulfonates dans l'ail (Fujisawa et al., 2014).

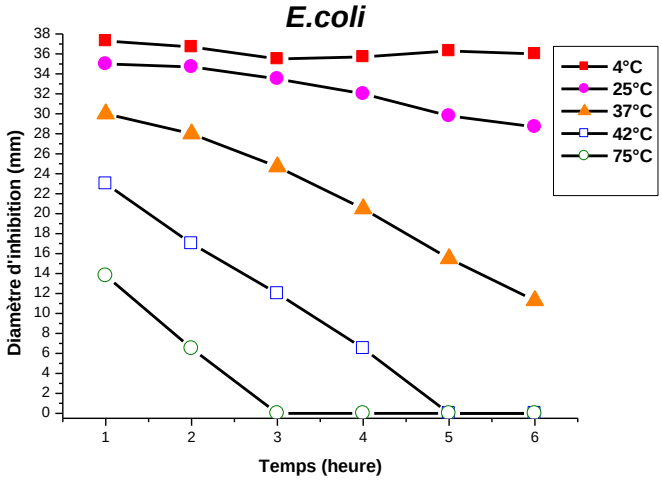


Figure.III.38. Influence de la température (4°C, 25°C, 37°C, 42°C et 75°C) en fonction du temps sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail vis-à-vis de *E.Coli*

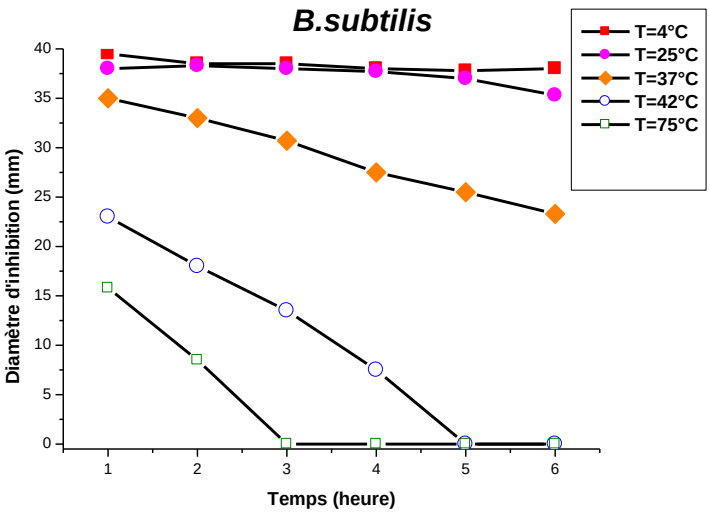


Figure.III.39. Influence de la température (4°C, 25°C, 37°C, 42°C et 75°C) en fonction du temps sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail vis-à-vis de *B.subtilis*.

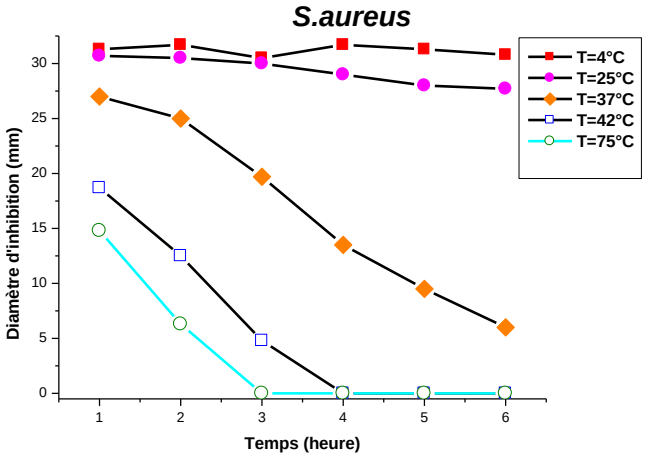


Figure.III.40. Influence de la température (4°C, 25°C, 37°C, 42°C et 75°C) en fonction du temps sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail vis-à-vis de *S. Aureus*.

III.5.2. Modélisation neuronale pour la prédiction de l'activité antibactérienne de l'ail

L'objectif de cette partie du travail consiste à établir un modèle neuronal optimal à partir des résultats expérimentaux des concentrations minimales inhibitrices (CMI), afin de prédire l'influence de la température, du temps de conservation et de la concentration d'extrait d'ail sur l'activité antibactérienne des souches testées à savoir : *E.coli*, *S.aureus*, *B.subtilis*.

Le meilleur algorithme d'apprentissage est le BFGS avec une base de données composée de 60% pour l'apprentissage, 20% pour le test et 20% pour la validation.

En outre, des résultats acceptables ont été trouvés en utilisant comme fonction de transfert entre la "couche d'entrée - couche cachée" la fonction tangente hyperbolique et la fonction sigmoïde logistique comme fonction de transfert entre la "couche cachée" couche de sortie".

Une architecture {3-11-3} est obtenue pour le modèle optimal avec un coefficient de détermination R^2 = 99% et une erreur quadratique moyenne inférieure à 0,90 par rapport aux trois souches étudiées (Figure III.41).

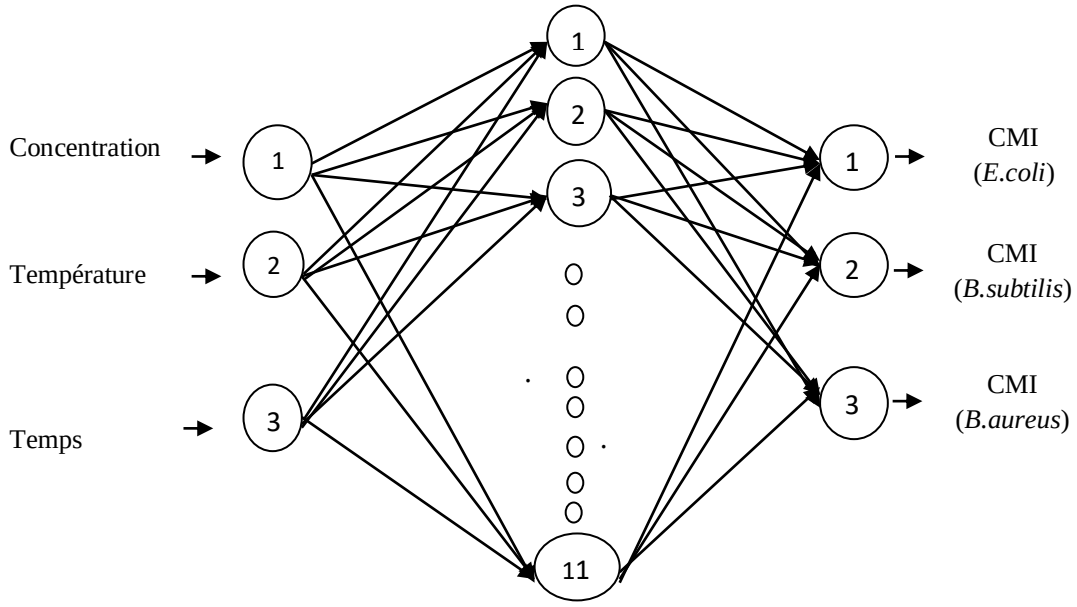


Figure III.41. Architecture du Modèle RNA utilisé dans la prédiction de la concentration minimale inhibitrice CMI de l'extrait d'ail vis-à-vis *E.coli*, *B.subtilis* et *S.aureus.*

Tableau.III.7. Valeurs prédites et expérimentales pour *E.coli,B.subtilis et S.aureus* pour les trois types d'échantillonnage : Apprentissage, Test et Validation.

Échantillons		CMI Expérimentale (µg/ml)			CMI Prédites (µg/ml)		
		E. coli	***B.subtilis***	***S.Aureus***	***E. coli***	***B. subtilis***	***S. Aureus***
01	Test	0,49	0,1300	1,93	0,4865	0,1305	1,9260
02	Train	0,97	0,2500	1,93	0,9588	0,2505	1,9178
03	Validation	0,49	0,4900	1,93	0,4918	0,4846	1,9250
04	Train	0,49	1,9300	1,93	0,4942	1,9254	1,9255
05	Train	0,97	7,6900	3,85	0,9930	7,6921	3,8466
06	Validation	1,93	0,1300	7,69	1,9950	0,1308	7,7082
07	Train	1,93	0,2500	7,69	1,9558	0,2504	7,7101
08	Train	3,85	1,9300	7,69	3,8596	1,9281	7,6718
09	Train	7,69	3,8500	3,85	7,6790	3,8463	3,8283
10	Validation	15,38	30,7500	15,38	15,5381	30,6809	15,3840
11	Train	30,75	0,2500	30,75	30,7508	0,2508	30,8513
12	Validation	61,50	0,4900	61,50	61,1283	0,4935	61,6008
13	Train	3,85	1,9300	7,69	3,8495	1,9254	7,6718
14	Train	7,69	7,6900	15,38	7,7321	7,6942	15,3843
15	Train	15,38	61,5000	30,75	15,5052	61,4997	30,8404
16	Train	30,75	0,1300	61,50	30,7556	0,1315	61,6008
17	Test	61,50	0,2500	123,00	61,4956	0,2526	122,9942
18	Validation	0,00	3,8500	246,00	0,0443	3,8430	0,0569
19	Train	30,75	15,3800	15,38	30,7481	15,3804	15,3745
20	Validation	61,50	123,0000	61,50	61,4990	122,6478	61,6474
21	Train	123,00	0,1300	61,50	118,8113	0,1319	61,4980
22	Train	0,00	0,4900	0,00	-0,0115	0,4937	-0,0149
23	Train	0,00	3,8500	0,00	-0,0098	3,8507	-0,0133
24	Validation	0,00	30,7500	0,00	0,0637	30,7798	0,0809
25	Train	0,49	123,0000	0,97	0,4718	123,0000	0,9660
26	Test	0,49	0,1300	0,97	0,4743	0,1322	0,9659
27	Train	0,49	0,4900	0,97	0,4771	0,4900	0,9655
28	Train	0,49	7,6900	0,97	0,4794	7,6890	0,9658
29	Validation	0,49	30,7500	0,97	0,4820	30,9955	0,9657
30	Validation	0,49	0,0000	0,97	0,4846	0,0741	0,9657

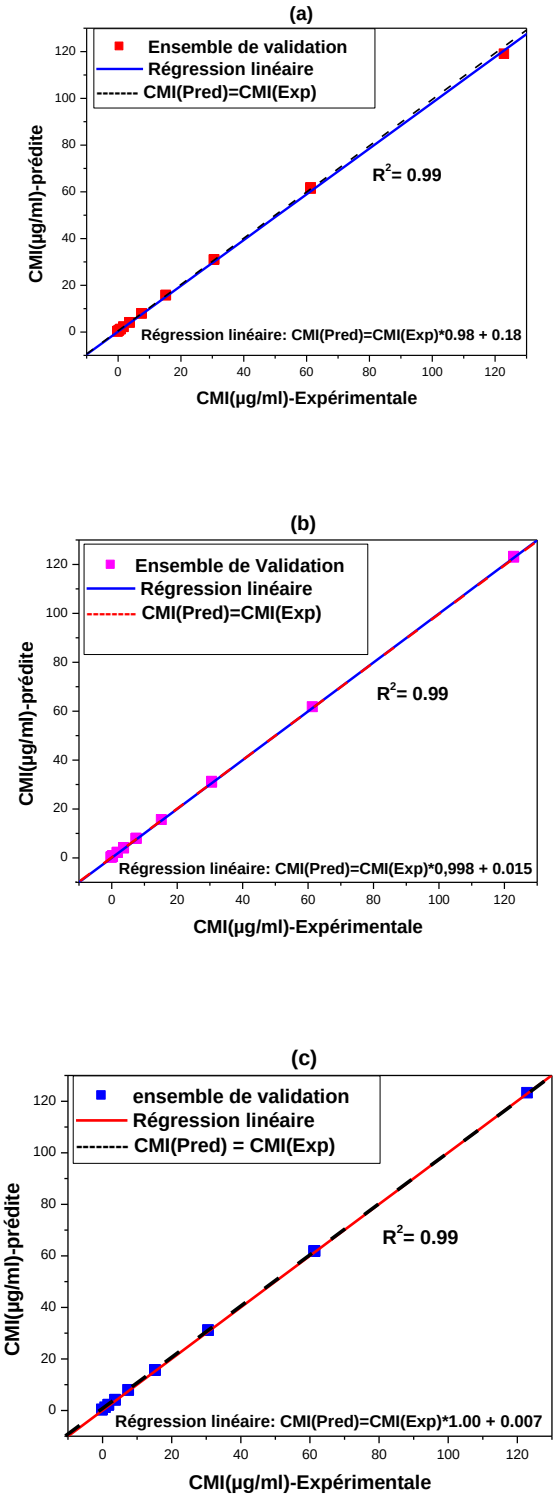


Figure.III.42. Corrélation entre les valeurs expérimentales et prédites des (CMI) pour le modèle ANN pour l'ensemble d'apprentissage, de test et de validation (N=30). (a) *E.coli* ($p<0.0001$), (b) *B.subtilus* ($p<0.0001$), (c) *S.aureus* ($p<0.0001$).

Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice expérimentale (CMI) en fonction de celles prédites par le réseau pour les trois souches étudiées (Figure III.42.), corrèlent avec un coefficient de détermination R^2 supérieur à 99% et une RMSE inférieure à 0,90 (Tableau III.8).

Ces résultats montrent que ce modèle a non seulement donné de bons résultats lors de son développement, mais fournit également un excellent pouvoir de prédiction. Les résultats suggèrent également qu'il existe une corrélation non linéaire entre l'activité antibactérienne (représentée par le diamètre d'inhibition) et les paramètres étudiés, principalement la température, le temps de stockage et la concentration des échantillons aqueux d'extrait d'ail. Sur la base de ces résultats, le modèle neuronal établi avec trois sorties peut être utilisé efficacement pour prédire les concentrations minimales inhibitrices de l'extrait d'ail pour les trois *souches E. coli, S. aureus. B. Subtilis.*

Tableau.III.8. Performance du modèle MLP-ANN pour les trois souches bactériennes.

	E.coli	***B.subtilis***	***S.aureus***
R^2	0.9906	0.9928	0.9998
RMSE	0.9998	0.9085	0.9002

Notons que cette étude portant sur la prédiction de l'activité antibactérienne de l'extrait d'ail vis-à-vis de trois souches bactériennes *E. coli*, *B. subtilis* et *S. aureus* a fait l'objet d'une publication scientifique : Atsamnia D., Hamadache M., Hanini S., Benkortbi O., Oukrif D. (2017) Prediction of the antibacterial activity of garlic extract on *E. coli*, *S. aureus* and *B. subtilis* by determining the diameter of the inhibition zones using artificial neural networks. LWT - Food Science and Technology 82, 287-295).

Conclusion & perspectives

CONCLUSION

Ce présent 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 biologiques et microbiologiques.

Du point de vue choix de la méthode d'extraction, notre choix s'est porté sur celui par solvant à froid avec une légère modification qui a été apportée au mode opératoire et ce selon l'utilisation de l'extrait. Dans une étude d'optimisation portant sur le choix des solvants d'extraction, nous sommes arrivés à la conclusion que les solvants mixtes se sont montrés particulièrement efficaces. En effet, les mélanges méthanol/eau (50/50) et éthanol/eau (50/50) présentent les plus forts rendements suivis par les extraits méthanolique et éthanolique. De plus, les résultats indiquent que les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux varient significativement selon le solvant utilisé

Dans une seconde étape, nous avons étudié la stabilité thermique des composés bioactifs de l'ail comme l'allicine et les composés phenoliques. Plusieurs échantillons d'extraits conservés à différentes températures ont été utilisés. Les résultats obtenus à l'aide de la chromatographie liquide (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 des températures qui se situent entre 4°C et 25°C. Par contre, pour les composés phénoliques, nous avons constaté que l'activité antioxydante des composés phénoliques totaux augmentent à 80, 100 et 120 ° C par rapport à la température ambiante, alors que la teneur totale en flavonoïdes tels que la quercetine montrait une tendance régulière jusqu'à 100°C, puis une diminution avec l'augmentation de la température de chauffage. Les résultats suggèrent qu'il est inapproprié d'exposer l'ail à des températures supérieures à 120°C.

Par ailleurs, les extraits eau/méthanol (50/50) et le méthanol pur, ont montré des activités anti radicalaires importantes pour les trois tests utilisés avec des valeurs de concentration inhibitrice (IC_{50}) les plus faibles. De plus, les activités de ces extraits se sont avérées supérieures ou à la limite proche de celles des antioxydants de références comme la vitamine C ou le trolox.

On a également trouvé que les valeurs de DPPH IC_{50} et ABTS IC_{50}, sont fortement corrélées avec le contenu des flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux et ce notamment pour le test DPPH. En outre, une mauvaise corrélation est observée entre $RP_{0.5}$ et le contenu phénolique. L'évaluation de ces trois variables et de leurs corrélations pourra servir d'indice pour mesurer efficacement l'activité antioxydante des extraits d'Allium

Suite à cela, des tests d'hépatotoxicité médicamenteuse menés sur des rats Wistar montrent clairement que l'extrait d'ail utilisé possède des effets curatif et protecteur significatifs contre la cytotoxicité induite par le paracétamol. C'est la raison pour laquelle l'hépatotoxicité ne s'est pas manifestée chez les animaux traités par des surdoses de paracétamol car protégés par les flavonoïdes et les polyphénols. Les résultats de la présente étude suggèrent que ces extraits possèdent une propriété antioxydante qui pourrait être probablement responsable de la puissante propriété hépato protectrice observée. Ces résultats sont confirmés par la bonne corrélation existant entre les doses de quercetine et d'extrait phénolique administrées et le taux des transaminases (GOT et GPT) dans le sang. Il est possible que le mécanisme d'hépato protection de l'ail soit dû à son effet antioxydant, principalement influencé par les composés phénoliques. Aussi, les extraits d'ail peuvent être bénéfiques dans le traitement des lésions hépatiques dues à une exposition chimique ou médicamenteuse.

Les multiples expériences entreprises, sur des rats à glycémie normale et ceux à glycémie élevée, ont dévoilé deux choses : la première est que l'ail 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 vue que l'administration d'allicine aux sujets normaux n'a eu aucune incidence sur sa valeur.

D'autre part, selon les résultats des tests sur les effets antibactériens de l'ail, les trois extraits testés (méthanolique, éthanolique et aqueux) présentaient une activité antibactérienne vis-à-vis des trois souches bactériennes. Néanmoins, la meilleure activité a été obtenue avec les extraits méthanolique (CMI$_{(E.coli)}$= 0,046 µg */ml*, CMI($_{B.subtilis)}$= 0,023 µg */ml*, CMI$_{(S.aureus)}$= 0,093µg */ml***)** et éthanolique (CMI$_{(E.coli)}$= 0,046 µg */ml*, CMI($_{B.subtilis)}$= 0,023 µg */ml*, CMI$_{(S.aureus)}$= 0,093µg */ml***)**. En outre, des tests menés avec la quercetine et l'acide gallique, montrent que les composés phénoliques se manifestent faiblement vis-à-vis des trois souches étudiées. Ce qui laisse suggérer que les effets antimicrobiens de l'ail sont dus en grande partie à d'autres composés autres que les polyphénols ou à l'effet synergique des polyphénols dans l'extrait d'ail.

La prédiction de l'activité antibactérienne (C.M.I : Concentration Minimale Inhibitrice) de l'extrait d'ail par utilisation des réseaux de neurones artificiels (R.N.A) a été entreprise. Cette modélisation a porté sur trois différentes souches de bactéries.
A cette fin, un modèle avec trois sorties différentes a été élaboré. Le modèle élaboré offre de nouvelles perspectives, particulièrement dans le domaine de la microbiologie, puisqu'il pourrait être appliqué à la détermination de la C.M.I pour différentes concentrations, températures et valeurs temporelles et ce sans recourir à des expériences.

Nous espérons, avec nos résultats, avoir participé à la valorisation de la médecine traditionnelle pour parvenir à la disponibilité de médicaments à base de plantes médicinales locales, efficaces et accessibles pour le traitement des différentes pathologies.

PERSPECTIVES

Suite à ce travail, nous suggérons qu'il serait intéressant :

- d'élargir l'action pharmacologique de l'ail sur d'autres applications.
- d'isoler et de caractériser les composés bioactifs de l'ail.
- d'évaluer in vitro et in vivo l'activité antioxydante de chacun de ces composés pris séparément.
- de mettre en évidence les mécanismes d'actions de chacun de ces principes actifs.

Références

Agarwal, KC. (1996). Therapeutic actions of garlic constituents. Medicinal Research Reviews, 16, 111–124.

Agarwal, M. K., Iqbal, M., Athar, M. (2007). Garlic oil ameliorates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced damage and tumor promotion: implications for cancer prevention. Food Chem Toxicol, 45(9), 1634–1640.

Aguayo-Mazzucato, *C.,* Bonner-Weir, *S.* (2017*)*. Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. Cell Metab, 1550-4131, (17), 30492-8.

Ahmad, M. S., Ahmed, N. (2006). Antiglycation property of aged garlic extract; possible role in prevention of diabetic complications. Journal of Nutrition, 136, 796s–799s.

Amagase, H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. Journal of Nutrition, 136,716S–25S.

Amagase, H., Milner, J. A. (1993) Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene binding to mammary cell DNA. Carcinogenesis, 14, 1627–1631.

Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. Journal of Nutrition, 136, 716–725.

Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H. Kasuga, S., Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. Journal of Nutrition, 131, 955S-962S.

Ana, L. C. G., Ricardo, A. S., Carlos, A. S. I., Maria, E. C. C., Abel, S. and Perla, D. M. (2012). The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extractand S-allylcysteine-induced protection. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 1-16.

Ana, L., Colín-González, R.A., Santana, C.A., Silva-Islas, M.E., Chánez-Cárdenas,Abel S., Perla, D. M. (2012). The Antioxidant Mechanisms Underlying the Aged Garlic Extract- and S-Allylcysteine-Induced Protection. Oxidative Medicine and Cellular Longevity,16, 907162.

Anibijuwon, I.I., Oladejo, B.O., Adetitun D.O., Kolawole, O.M.(2012). Antimicrobial Activities of Vernonia amygdalina Against Oral Microbes. Global Journal of Pharmacology, 6 (3),178-185

Anoush, M., Eghbal, MA., Fathiazad, FH., Hamzeiy, H., Kouzehkonani NS. (2009). The protective effects of garlic extract against acetaminophen-induced oxidative stress and glutathione depletion. Pakistan Journal of Biological Sciences, 12(10), 765-71

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Esin Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, I.I., Özyurt, D. **(**2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Molecules, 12, 1496-1547.

Arzanlou, M. (2016). Inhibition of streptococcal pyrogenic exotoxin B using allicin from garlic. Microbial Pathogenesis, 93, 166–71.

Arzanlou, M. (2016). Inhibition of streptococcal pyrogenic exotoxin B using allicin from garlic. Microbial Pathogenesis, 93, 166–171.

Arzanlou, M., Bohlooli, S. (2010). Inhibition of streptolysin O by allicin – an active component of garlic. Journal of Medical Microbiology, 59, 1044–1049.

Ashraf, R., Aamir, K., Shaikh, A. R., Ahmed, T. (2005). Effects of garlic on dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. Journal of Ayub Medical College Abbottabad, 17(3), 60–64.

Ashraf, R., Khan, R. A., Ashraf, I. (2011). Garlic (Allium sativum) supplementation with standard antidiabetic agent provides better diabetic control in type 2 diabetes patients. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 24(4), 565–570.

Augusti, K. T. (1996). Therapeutic values of onion (Allium cepa L.) and garlic (Allium Sativum L). Indian Journal of Experimental Biology, 34, 634–640.

Bai, Y., Yan, R., Huo, F., Qian, J., Zhang,X., Zhang,S. (2017). Recovery of methacrylic acid from dilute aqueous solutions by ionic liquids though hydrogen bonding interaction. Separation and Purification Technology, 354-364.

Balasundram, N., Ai, TY., Sambanthamurthi, R., Sundram K., Samman, S. (2005). Antioxidant properties of palm fruit extracts. Asia Pacific Journal Clinical Nutrition, 14(4), 319-324.

Banerjee, S.K., Maulik, M., Mancahanda, S.C., Dinda, A.K., Das, T.K., Maulik, S.K., (2002). Dose- dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. Life Science, 70, 1509–1518.

Banerjee, S.K., Mukherjee, P.K., Maulik, S.K., **(**2003). Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. Phytotherapy Research, 17, 97–106.

Bayan, L., Hossain, P., Gorji,A. (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. Avicenna Journal of Phytomedicin., 4(1), 1–14

Benkeblia, N., Lanzotti V. (2007). Allium thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. Food, 1,193–201.

Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (Allium cepa) and garlic (Allium sativum) Lebensm Wiss Technol, 37, 263–268.

Berger, M. M. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally. Clinical Nutrition, 24, 172–183.

Bhagyalakshmi, N., Thimmaraju, R., Venkatachalam, L., Chidambara, A., Murthy, K.N., Sreedhar, R.V., **(**2005). Nutraceutical applications of garlic and the intervention of biotechnology. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45, 607–621.

Biljana, B., Neda, M.D., Isidora, S., Anackov, G., Ruzica, I. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (Allium sativum L., Alliaceae). Food Chemistry, 111, 925–929.

Block, E., Naganathan., S. Putman., D. Zhao, S.H. (1992). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 402-418.

Block, E. (2010). Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science. Royal Society of Chemistry. ISBN 0854041907.

Block, E., O'Connor, J. (1974). Chemistry of alkyl thiosulfinate esters. VII. Mechanistic studies and synthetic applications.Journal of the American Chemical Society, 96 (12), 3921–3929.

Bnouham, M., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Tahri, A., Legssyer, A. **(**2006). Medicinal plants with potential antidiabetic activity – A review of ten years of herbal medicine research. International Journal of Diabetes and Metabolism, 14, 1–25.

Bolanca, T., Cerjan-Stefanovic, S., Lusa, M., Ukic, S. M. (2008). Rogosic, Evaluation of separation in gradient elution ion chromatography by combining several retention models and objective functions, Journal of Separation Science, 31,705-13.

Bonnevie-Nielsen, V., Steffes, M.W., Lernmark, A.A. (1981). Major loss in islet mass and B-cells function precedes hyperglycemia in mice given multiple low doses of streptozotocin. Diabetes, 30, 424–429.

Borek, C., **(**2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. Journal of nutrition, 131, 1010-1015.

Brookes, MJ., Tewarie, PK., Hunt, B.A., (2016). A multi-layer network approach to meg onnectivity analysis. Neuroimage, 132, 425–438.

Butt, M.S., Sultan, M.T., Butt, M.S., Iqbal, J. **(**2009). Garlic, nature's protection against physiological threats. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49, 538-551.

Cai ,Y., Luo , Q., Sun , M., Corke , H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences, 74(17), 2157-84.

Canizares, P., Saez, C., Lobato, J., Rodrigo, M.A. (2004). Electrochemical oxidation of polyhydroxybenzenes on boron-doped diamond anodes. Industrial & Engineering Chemistry Research, 43(21), 6629–663.

Cavallito, C.J., Bailey, J.H. (1950). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum.* I. Isolation, physical properties, and antibacterial action. Journal of the American Chemical Society, 1944- 66.

Chai, T., and Draxler, R.R. (2014). Root mean square error (RMSE) or mean absolute error (MAE)? Arguments against avoiding RMSE in the literature. Geoscientific Model Development, 7, 1247–1250.

Chandra-Kuntal, K., Singh, S.V. (2010). Diallyl trisulfide inhibits activation of signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer cells in culture and in vivo. Cancer prevention research (Philadelphia), 3(11), 1473–1483.

Cheung, L. M., Peter, C. K., Vincent, E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. Food Chemistry, 81,249–255.

Cho, J., Park, M., Choi, D., Lee, S.K. (2012). Cloning and expression of γ-glutamyl transpeptidase and its relationship to greening in crushed garlic (*Allium sativum*) cloves. Journal of the Science of Food and Agricultur, 92, 253–257.

Chung, I., Kwon, S.H., Shim, S.T., Kyung, K.H. (2007). Synergistic antiyeast activity of garlic oil and allyl alcohol derived from alliin in garlic. Journal of Food Science, 72(9), M437-40.

Colín-González, A.L., Santana, R.A., Silva-Islas, C.A., Chánez-Cárdenas, M.E., Santamaría, A., Maldonado, P.D. (2012).The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. Oxid Med Cell Longev, 2012, 907-162

Cushnie, T. P., Lamb, A. J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids**.** International Journal of Antimicrobial Agents**,** 26(5), 343-56.

Cusi, K., Consoli, A., De Fronzo, R.A., **(**1996). Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Journal of Clinical Endocrinology Metabolism, 81,4059–67.

Dannesteter J. (2003). The origins of medicine.Translated from Sacred Books of the East, American Edition. New York: The Christian Literature Company, Available at www.avesta.org.

Diem Do, Q., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., HuongHuynh,L., Soetaredjo,F.E., Ismadji.S., Yi-Hsu,J. (2014), Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. Journal of Food and Drug Analysis, 22, 296-302.

Dorta, E., M. Lobo, G., Gonzalez M. (2012). Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. Journal of Food Science, 77, 80–88.

Ebomoyi, Isoken M., Onobu, A., **(**2010). Blood glucose and morphology of the liver and pancreas in garlicfed Wistar rats. Journal of Medicinal Plants Research, 4 (18), 1877–1882.

Edgerton, D.S., Ramnanan, C.J., Grueter, C.A., Kathryn, M.S., Lautz, M., Doss, W., Neal, P.E., Cherrington, A.D., (2009). Effects of Insulin on the Metabolic Control of Hepatic Gluconeogenesis In Vivo.diabetes, 12, 2766-2775.

Eidi, A., Eidi, M., Esmaeili, E., 2006. Antidiabetic effect of garlic (Allium sativum) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Phytomedicine, 13 (9), 624–629.

El-Akabawy, G., El-Sherif, N.M. (2016). Protective role of garlic oil against oxidative damage induced by furan exposure from weaning through adulthood in adult rat testis. Acta Histochemica, 118(5), 456-63.

El-Demerdash, F,M., Yousef, M.I., El-Naga, N.I. (2005). Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. Food Chem Toxicol, 43,57–63.

Elsner M, Gurgul-Convey E, Lenzen S., (2006). The relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid of insulin-producing cells. Free Radical Biology & Medicine, 41, 825–34.

Freeman, J.S, Horton, E.S. (2012). What have we learned about the treatment of type 2 diabetes? The evolving paradigms. Am J Ther, 19,449–64.

Fischer N., Hammerschmidt F., Brunke E. 1995. Analytical investigation of the fl avor of Cupuacu. In Rouseff RL, Leahy MM (eds.), Fruity Flavors: Biogenesis, Characterization and Authentication. ACS Symposium Series 596. Washington, DC: American Chemical Society, pp. 8 – 20.

Fukao, T., Hosono, T., Misawa, S., Seki, T., & Ariga, T. (2004). The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. Food Chemistry and Toxicology, 42, 743.

Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Seki,T., Ariga,T. (2014). Thermostability of Allicin Determined by Chemical and Biological Assays. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1347-6947.

Gil-Ramírez, A., Pavo-Caballero, C., Baeza, E., Baenas, N., Garcia-Viguera,V., Marín,R.F., Soler-Rivas,C. (2016). Mushrooms do not contain flavonoids. Journal of Functional Foods, 6 (3), 178-185.

Giovanelli, G., Buratti, S. (2009). Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. Food Chemistry, 112 (4), 903-908.

Goetz P et Ghedira K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. Springer-verlag France, Paris, 210p.

Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Drzewiecki, J., Cvikrova, M., Martincova, O., atrich, Trakhtenberg, S. (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 4418-26.

Gorinstein, S., Lojek, A., Ciz, M., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Medina, O. J., et al. (2008). Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals. International Journal of Food Science and Technology, 43, 629-637

Gouvea, S. A., Moyses, M. R., Bissoli, N. S., Pires, J. G., Cabral, A. M., Abreu, G. R. (2003). Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 36(7), 943–949.

Guil-Guerrero, J.L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes., J.C., Carlosama-Yepez, M., Ruales, P., (2016). Antimicrobial activity of plant-food by-products: Livestock Science, 189, 32–49.

Guo, J.J., Kuo, C.M., Chuang, Y.C., Hong, J.W., Chou, R.L., & Chen, T.I. (2012). The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against Streptococcus iniae and on growth in orange-spotted grouper, Epinephelus coioides. Aquaculture, 364–365, 33–38.

Hamadache, M., Benkortbi, O., Hanini, S., Amrane, A., Khaouane, L., Si moussa, C. (2016). Quantitative Structure Activity Relationship for acute oral toxicity of pesticides on rats: Validation, domain of application and prediction. Journal of Hazardous Materials, 303, 28-40

Hasani, M. Moloudi, M. and Emami, F. 2007.Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of tryptophan, tyrosine, and histidine with the aid of principal component-artificial neural network models, Analytical Biochemistry, 370, 68-76.

Hasanjani, H.R.A., Sohrabi, M.R. (2017). Artificial Neural Networks (ANN) for the Simultaneous Spectrophotometric Determination of Fluoxetine and Sertraline in Pharmaceutical Formulations and Biological Fluid. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 16(2), 478–489.

Heim, C., Newport, D.J., Wagner, D., Wilcox, M.M., Miller, A.H., Nemeroff, C.B. (2002). The role of early adverse experience and adulthood stress in the prediction of neuroendocrine stress reactivity in women: a multiple regression analysis. Depress Anxiety, 15, 117–125.

Huan-xia, H., Hai-sheng, Z., Shu-fang, Y. (2016) Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. Food Science and Human Wellness, 82, 183-190).

Huk, I., Brovkovych, V., Nanobash Vili, J., Weigel, G., Neumayer, C., Partyka, L., Patton, S., Malinski, T., **(**1998). Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. British Journal of Surgery, 85**,** 1080-5.

Hundal, R.S., Krssak, M., Dufour, S., Laurent, D., Lebon, V., Chandramouli, V., Inzucchi, S.E., Schumann, W.C., Petersen, K.F., Landau, B.R., Shulman, G.I., (2002). Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. Diabetes, 49(12), 2063-2069.

Hung, S.-H., Shen, Y., Chiao, L.-Y. (2004). Imaging seismic velocity structure beneath the Iceland hot spot: A finite frequency approach, Journal of Geophysical Research,109, B08305.

Hyung, D., Lee, C., Kim, J.-H., Yoo, D., Seo, Y.-S., Jeong, S.-C., et al. (2014). Cross-family translational genomics of abiotic stress-responsive genes between Arabidopsis and Medicago truncatula. Plos One, 9, 91-721.

Iberl, B., Winkler, G., Muller, B., Knobloch, K., (1990). Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. Planta Medica, 56,320–326.

Iciek, M., Kwiecien I., Chwatko, G., Sokolowska-Jezewicz, M., Kowalczyk-Pachel, D., Rokita, H. (2012).The effects of garlic-derived sulfur compounds on cell proliferation, caspase 3 activity, thiol levels and anaerobic sulfur metabolism in human hepatoblastoma HepG2 cells. Cell Biochemistry and Function, 30,198–204.

Ide, N., Lau, B.H., 2001. Garlic compounds minimise intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-KB activation. Journal of Nutrition, 131, 1020–1026.

Ide, N., Lau, BH., (2001). Garlic compounds minimize intracellular oxidative stress and inhibit nuclear factor-kappa b activation. Journal of Nutrition ,131(3), 1020S–6S.

Ioannou, I. and Ghoul, M. (2012) Biological Activities and Effects of Food Processing on Flavonoids as Phenolic Antioxidants. Advances in Applied Biotechnology, Chapter 5, InTech, 101-124.

Ioku, K., Aoyama, Y., Tokuno, A., Terao, J., Nakatani, N., Takei, Y. (2001). Various cooking methods and the flavonoid content in onion. Journal of Nutritional Science and Vitaminology**,** 47, 78-83.

Jamshed, I.; Sumera, Z.1., Umar, F., Afsa, K., Irum, B., Saba, S. (2012). Antioxidant, Antimicrobial, and Free Radical Scavenging Potential of Aerial Parts of Periploca aphylla and Ricinus communis. International Scholarly Research Network, 6, 563-267,

Jansen, H., Muller, B., & Knobloch, K. (1989). Characterization of an alliin lyase preparation from garlic (Allium sativum). Planta Medica, 55, 434–439.

Jelodar, G.A., Maleki, M., Motadayen, M.H., Sirus, S., **(**2005). Effect of fenugreek, onion and garlic on blood glucose and histopathology of pancreas of alloxan-induced diabetic rats. Indian Journal of Medical Sciences, 59, 64–69.

Ji, L.L., and Peterson, D.M., (2004). Aging, exercise, and phytochemicals promises and pitfalls. Ann NY Acad Sci, 1019, 453–461.

Juneja, V.K., (2003). Food Preservation Techniques. CRC Press, England, pp. 204.

Jung, B.J., Ji, S.K., Chang, W.C, G.P., Rajarajan, T., Hae, K.L., Tae-Kyun, O., Sei, C.K. (2008). Comparison between ethanolic and aqueous extracts from Chinese juniper berries for hypoglycaemic and hypolipidemic effects in alloxan-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, 115, 110–5.

Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Belghith, L., Bouaziz, F., Ghorbel, R., Ellouz Chaabouni, S. (2014). Garlic (Allium sativum L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents On its antimicrobial and antioxidant properties. Industrial Crops and Products, 62, 34–41.

Kalra, N., Arora, A., Shukla, Y. (2006). Involvement of multiple signaling pathways in diallyl sulfide mediated apoptosis in mouse skin tumors. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 7(4), 556–562.

Kavita, S., Eun, Y. K., Awraris, D. A., Soyoung, H., Shivraj, H.N., Eul, T.L., Se,W.P.(2014). Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. Journal of food and drug analysis, 91, 107-113.

Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J.O., Dommes, J., Pincemail, J. (2007). Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(21), 8596–8603.

Kim, J.M., Lee, J.C., Chang, N., Chun, H.S., Kim, W.K. 2006. S-Allyl-l-cysteine attenuates cerebral ischemic injury by scavenging peroxynitrite and inhibiting the activity of extracellular signal-regulated kinase. Free Radical Research, 40(8), 827–835.

Kim, K.H., Lee K.W., Kim, D.Y., Park, H.H., Kwon, I.B., Lee, H.J. (2004). Extraction and fractionation of glucosyltransf erase inhibitors from cacao bean husk, Process Biochem, 39, 2043-2046.

Kim, D.O., Lee, C.Y. (2002). Extraction and isolation of polyphenolics. Current Protocols *in* Food Analytical Chemistry, 6, I1.2.1–I1.2.12.

Kimbaris, A., C., Siatis, N.G., Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Daferera, D.J., Polissiou, M.G. (2006). Quantitative analysis of garlic (Allium sativum) oil unsaturated acyclic components using FT-Raman spectroscopy. Food Chemistry, 94, 287-295.

Kiruthiga, P.V., Shafreen, R.B., Pandian, S.K., Devi, K.P. (2007). Silymarin protection against major reactive oxygen species released by environmental toxins: exogenous H2O2 exposure in erythrocytes. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 100(6), 414–419.

Kodai, S., Takemura., S., Minamiyama, Y. (2007). *S*-allyl cysteine prevents CCl_4-induced acute liver injury in rats. Free Radic Res, 41, 489–497

Kojuri, J., Vosoughi, A. R., & Akrami, M. (2007). Effects of anethum graveolens and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. Lipids in Health *a*nd Disease, 6-5.

Kozlowska, M., Laudy, A.E., Przybyl, J., Ziarno, M., Majewska, E. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from Lamiaceae family. Acta Poloniae Pharmaceutica, 72,757–767

Krzymińska, A., Gawłowska, M., Wolko, B., Bocianowski, J. (2008). Genetic diversity of ornamental *Allium* species and cultivars assessed with isozymes. Journal of Applied Genetics, 49, 213–220.

Kuriakose, G., Kurup, M.G. (2010). Hepatoprotective effect of Spirulina lonar on paracetamol-induced liver damage in rats, Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 1, 614-623

Lagunas, M. L.L., Castaigne, F. (2008). Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. Food Chemistry, 111, 56–60.

Lambinonj, J., Delvosallel, L., Duvigneaudj, J. (2004). Nouvelle flore de la Belgique, du Grand Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines. Editions du Patrimoine du jardin botanique nationale de Belgique, Meise. 1167 p

Lau, B.H. (2006). Suppression of LDL oxidation by garlic compounds is a possible mechanism of cardiovascular health benefit. Nutrition, 136(3),765-768.

Lau, B.H. (2006). Suppression of LDL oxidation by garlic compounds is a possible mechanism of cardiovascular health benefit. Journal of Nutrition, 136, 765s–768s.

Lawson, L. D., Ransom, D. K., Hughes, B. G. (1992). Inhibition of whole blood platelet-aggregation by compounds in garlic clove extracts and commercial garlic products.Thrombosis Research, 65, 141–156

Lee, S., Lee, Y.S, Jung, S.H, Kang, S.S, Shin, K.H. (2002). Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae Pelvetia siliquosa. Archives of Pharmacal Research, 26,719–22.

Lenzen, S., **(**2008). Oxidative stress: the vulnerable *β*-cell. Biochemical Society Transactions, 36, 343–347.

Liu, C.T., Hse, C.K., Lii, P.S., Chen, Sheen, P.Y., **(**2005). Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats. European Journal of Pharmacology, 516, 165–173.

Liu, C.T., Hse, H., Lii, C.K., Chen, P., Sheen, L.Y., **(**2005). Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on Glycemic control in diabetic rats. European Journal of Pharmacology, 5 (6), 165–173.

Liu, L., Yeh, Y. Y. (2001). Water-soluble organosulfur compounds of garlic inhibit fatty acid and triglyceride syntheses in cultured rat hepatocytes. Lipids, 36(4), 395–400.

Locatelli, D.A., Nazareno, M.A., Fusari, C.M., Camargo, A.B. (2017). Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition. Food Chemistry, 220, 219–224.

Macan, H., Uykimpang, R., Alconcel, M., Takasu, J., Razon, R., Amagase, H. & Niihara, Y. (2006). Aged garlic extract may be safe for patients on warfarin therapy. Journal of Nutrition, 136, 793S-795S.

Madineh, H., Yadollahi, F., Yadollahi, F., Pouria-Mofrad, E., Kabiri, M. (2017). Impact of garlic tablets on nosocomial infections in hospitalized patients in intensive care units. Electron Physician. Pharm, 9(4), 4064–4071

Mahmoodi, M., Islami, M.R., Asadi Karam, G.R., (2006). Study of the effects of raw garlic consumption on the level of lipids and other blood biochemical factors in hyperlipidemic individuals. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 19 (4), 295–298.

Makris, D.P., Kefalas, P. (2004). Carob pods (Ceratonia siliqua L.) as a source of polyphenolic antioxidants. Food Technology and Biotechnology, 42 (2), 105-108.

Maldonado, P.D., Barrera, D., Rivero, I. (2003). Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. Free Radical Biology and Medicine, 5(3), 317–324.

Maldonado, P.D., Chánez-Cárdenas, M.E., Pedraza-Chaverrí, J. (2005). Aged garlic extract, garlic powder extract, S-allyl cysteine, diallyl sulfide and diallyl disulfide does not interfere with the antibiotic activity of gentamycin. Journal of Chromatography A, 19(3), 252-254.

Martin, C.H., Gruhlke, A., Slusarenko, J. (2012). The biology of reactive sulfur species (RSS). Plant Physiology and Biochemistry, 59, 98–107.

McCulloch, W., S., Pitts, W. (1943). A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. Bulletin of Mathematical Biophysics, 5,115–133.

Medina-Campos, O.N., Barrera, D., Segoviano-Murillo, S. (2007). S-allylcysteine scavenges singlet oxygen and hypochlorous acid and protects LLC-PK1 cells of potassium dichromate-induced toxicity. Food and Chemical Toxicology, 45(10), 2030–2039.

Meitinger, M., Hartmann, S., Schieberle, P. (2014). Development of Stable Isotope Dilution Assays for the Quantitation of Amadori Compounds in Foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(22), 5020–7.

Miller, H. E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A. and Kanter, M. (2000), Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. Journal of the American College of Nutrition, 19, 312S-319S.

Mogoşanu, G.D., Grumezescu, A. M., Bejenaru, C., Bejenaru., L. E. (2017). Natural products used for food preservation. Food Preservation, 365–411

Mohammedi, Z., Atik, F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from Tamarix aphylla (L.) karst. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2, 609-615.

Natali, A., Ferrannini, E., (2006). Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. Diabetologia, 49, 434-41.

Nataraj, L., Perumal, S., Sellamuthu, M. (2013). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. Journal of Food Science and Technology, 50(4), 687-95

Naznin, M.T., Akagawa, M., Okukawa, K., Maeda, T., Morita, N. (2008). Characterization of E- and Z-ajoene obtained from different varieties of garlics. Food Chem, 106, 1113–1119.

Nencini, C., Franchi, G. G., Cavallo, F., Micheli, L. (2010). Protective effect of Allium neapolitanum Cyr. versus Allium sativum L. on acute ethanol-induced oxidative stress in rat liver. Journal of Medicinal Food, 13(2), 329–335.

Nishimura, H., Takahashi, T., Wijaya, C.H., Satoh, A., Ariga, T., **(**2000). Thermochemical transformation of sulfur compounds in Japanese domestic Allium, *Allium victorialis L*. BioFactors, 13, 0951-6433.

Nuutila, A. M., Puupponen-Pimiä, R., Aarni, M. and Oksman-Caldentey, K. M. (2003), Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. Food Chemistry, 81, 485-493.

Okada, Y., Tanaka, K., Fujita, I., Sato, E., Okajima, H., **(**2005). Antioxidant activity of thiosulfinates derived from garlic. Redox report: communications in free radical research, 10, (2), 96-102.

Oktay, M., Gülçin, I., Küfrevio˘glu, Ö.I., (2003). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (Foeniculum vulgare) seed extracts. Lebensmittel-Wissenchaft und Technologie, 36, 263–271.

Omar, S.H., Al-Wabel, N.A. (2010). Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. Saudi Pharmaceutical Journal ,18(1), 51–58.

Ordoudi, S.A., Tsimidou, M.Z., Vafiadis, A.P., BakalBassis, E.G. (2006). Structure-DPPH. scavenging activity relationships: parallel study of catechol and guaiacol acid derivatives. The Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 5763–5768.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. Journal of Agricultural and Food Chemistry,50(11), 3122-8

Pal, R., Vaiphei, K., et al. (2006). (India) Effect of garlic on isoniazid and rifampicin-induced hepatic injury in rats; World Journal of Gastroenterology (, 12 (4), 636-9.

Petropoulos, S.A., Ntatsi, G., Fernandes, Â., Barros, L., Barreira, J.C.M., Ferreira, I.C.F.R., Antoniadis, V., (2016). Long-term storage effect on chemical composition, nutritional value and quality of Greek onion landrace Vatikiotiko. Food and Chemical, 201, 168–176.

Prakasam, A., Sethupathy, S., Pugalendi, K.V., **(**2005). Antiperoxidative and Antioxidant Prasad, K., Haxdal, A., Yu, M. (1995). Antioxidant activity of Allicin, an active principle in garlic. Molecular and Cellular Biochemistry, 148, 183–189.

Prakasam, A., Sethupathy, S., Pugalendi, K.V. (2005). Effects of Casearia Esculenta Root Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.yale journal of biology and medicine, 78, 15 - 23.

Qidwai, W., Ashfaq, T. (2013). Role of garlic usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1,125-649.

Queiroz, Y. S., Antunes, P. B., Vicente, S. J. V., Sampaio, G. R., Shibao, J., Bastos, D. H. M., Torres, E. A.F. (2014). Bioactive compounds, in vitro antioxidant capacity and Maillard reaction products of raw, boiled and fried garlic (*Allium sativum* L.). International Journal of Food Science & Technology, 49(5), 1308-1314.

Ramirez, D.A., Locatelli, D.A., González, R.E., Cavagnaro, P.F., Camargo. (2016). Analytical methods for bioactive sulfur compounds in Allium: An integrated review and future directions. Journal of Food Composition and Analysis, 61, 4-19

Ried, K., Frank, O. R., Stocks, N. P. (2010). Aged garlic extract lowers blood pressure in patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomised controlled trial. Maturitas, 67(2), 144–150.

Rivlin, R.S. (2001). Historical perspective on the use of garlic. Journal of Nutrition, 131, 951S–954S.

Ryan, E.A., Pick, M.E., Marceau, C. (2001). Use of alternative medicine in diabetes mellitus. Diabet Med,18,242–245.

Salem, M., Kosanovic, M., Qureshi, A., Ljubisavljevic, M., Howarth, F.C. (2009). The direct effects of streptozotocin and alloxan on contractile function in rat heart. Pharmacological Research, 235–241.

Sallam, K. I., Ishioroshi, M., Samejima, K. (2004). Antioxidan antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. Food Science Technolog, 37, 849-55.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture, 76, 270–276.

Santhosha, S.G., Prakash, J., Prabhavathi, S.N. **(**2013). Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance. Food Bioscience, 3, 59 –74.

Sarkhail, P., Rahmanipour, S., Fadyevatan, S., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Amin, G., Shafiee, A., Abdollahi, M. **(**2007). Antidiabetic effect of Phlomis anisodonta: effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. Pharmacological Research, 56, 261–266.

Scalzo, J., Capocasa, F., Palandrani, A., Mezzetti, B., Battino M. (2004). Quality and nutritional value in strawberry breeding and cultivar evaluation, Acta Horticulturae, 649, 61- 64.

Scarpello, J.H., Howlett, H.C., **(**2008). Metformin therapy and clinical uses. Diabetes & Vascular Disease Research, 5, 157–67.

Semantee.B., Prasenjit, M., Ratan,G. (2011). D-saccharic acid-1, 4-lactone ameliorates alloxan-induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats through inhibiting pancreatic beta-cells from apoptosis via mitochondrial dependent pathway. Toxicology and Applied Pharmacology, 257, 272–283.

Sengupta, A., Ghosh, S., Bhattacharjee, S., & Das, S. (2004). Indian food ingredients and cancer prevention—an experimental evaluation of anticarcinogenic effects of garlic in rat colon. Asian Pac J Cancer Prev, 5(2), 126–132.

Sha, L., Hor-Yue, T., Ning, W., Zhang-Jin, Z., Lixing, L., Chi-Woon, W., Yibin, F. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. International journal of molecular sciences Molecular, 55(21), 8596–8603.

Shankar, S., Chen, Q., Ganapathy, S., Singh, K. P., & Srivastava, R. K. (2008). Diallyl trisulfide increases the effectiveness of TRAIL and inhibits prostate cancer growth in an orthotopic model: molecular mechanisms. Molecular Cancer Therapeutics, 7(8), 2328–2338.

Siddhuraju, P., Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (Moringa oleifera Lam.) leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(8), 2144-55.

Siddiqui, N, A., Mothana, R., Alam, P. (2016). Quantitative determination of alliin in dried garlic cloves and products by high-performance thin-layer chromatography. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15 (8), 1759-1765.

Sobenin, I. A., Nedosugova, L. V., Filatova, L. V., Balabolkin, M. I., Gorchakova, T. V., & Orekhov, A. N. (2008). Metabolic effects of time-released garlic powder tablets in type 2 diabetes mellitus: the results of double-blinded placebo-controlled study. Acta Diabetol, 45(1), 1–6.

Sobenin, I. A., Pryanishnikov, V. V., Kunnova, L. M., Rabinovich, Y. A., Martirosyan, D. M., Orekhov, A. N. (2010). The effects of time-released garlic powder tablets on multifunctional cardiovascular risk in patients with coronary artery disease. Lipids Health Dis 9, 119.

Sreedevi, C. D., Latha, P. G., Ancy, P., Suja, S. R., Shyamal, S., Shine, V. J., Sini, S., Anuja, G. I., Rajasekharan, S. (2009). Hepatoprotective studies on Sida acuta Burm. f. Journal of Ethnopharmacology, 124, 171– 175.

Sreedevi, P., Latha,P., Ancy,S., Suja,S., Shyamal,V.J., Shine,S., Sini,G.I.,Anuja,S., Rajasekharan. (2009) Hepatoprotective studies on Sida Acuta burm, Journal of Ethnopharmacology, 124, 171–175.

Sreeramulu, D., Raghunath, M. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in India. Food Research International, 43, 1017–1020.

Srinivasan, K., **(**2005). Plants food in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. International Journal of Food Science and Nutrition, 56, 399 – 414.

Stoll, A., Seebeck, E. (1951).Chemical Investigations on Alicin the specific Principle of Garlic, Advances in Enymology, (11),377-400.

Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G., Gerich, J.E., **(**1995). Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. New England Journal of Medicine, 333, 550–4.

Suleria, HA., Osborne, S., Masci, P., Gobe, G. 2015. Marine-Based Nutraceuticals: An innovative trend in the food and supplement industries**.** Marine Drugs**,** 13, 6336-6351.

Sun, C., Wu, Z., Wan, Z., Zhang, H. (2015). Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 9, 595-393.

Sun, T., Ho, C. T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. Food Chemistry, 90, 743–749.

Tan, L., Su, J., Wu, D., Yu, X., Su, Z., He, J. (2013). Kinetics and mechanism study of competitive inhibition of Jack -bean urease by baicalin. The Scientific World Journal, 9, 879-501.

Tang, G., Wu, L., Wang, R. (2010). Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 37(7), 753–763.

Tebay, L.E., Robertson, H., Durant, S.T., Vitale, SR., Penning, T.M., Dinkova-Kostova, A.T., Hayes, J.D. 2015. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. Free Radical Biology & Medicine , 88,108-146.

Teke, A.,Yıldırım, H., Çelik, Ö. (2015).“Evaluation and Performance Comparison of Different Models for the Estimation of Solar Radiation.”Renewable and Sustainable Energy Reviews, 50,1097–1107.

Tham S, Y., Agatonovic-Kustrin, S. (2002). Application of the artificial neural network in quantitative structure-gradient elution retention relationship of phenylthiocarbamyl amino acids derivatives, Journal of Pharmaceutical and Biomedica, 28, 581-90.

Thomson, M., Ali, M. (2003). Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. Current Cancer Drug Targets, 3, 67–81.

Togashi, Y., Shirakawa, J., Okuyama, T., Yamazaki,S., Kyohara,M. (2016)., Miyazawa, A., Suzuki,T Evaluation of the appropriateness of using glucometers for measuring the blood glucose levels in mice. Scientific Reports, 6, 25465.

Tsai, T.H., Tsai, P.J., Ho, H.C. (2005). Antioxidant and antiinflammatory activities of several commonly used spices. Journal of Food Science, 70(1), C93–C97.

Turner, B., Molgaard, C., Marckmann, P. (2004). Effect of garlic (Allium sativum) powder tablets on serum lipids, blood pressure and arterial stiffness in normo-lipidaemic volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. British Journal of Nutrition, 92(4), 701–706.

Tyagi, G., Pradhan, S., Srivastava, T., Mehrotra, R. (2014). Nucleic acid binding properties of allicin: Spectroscopic analysis and estimation of anti-tumor potential. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1840(1), 350-6.

Valgimigli, L., Amorati, R., Fumo, M.G., Dilabio, G.A., Pedulli, G.F., Ingold, K.U., Pratt, D.A., (2008). The unusual reaction of semiquinone radicals with molecular oxygen. The Journal of Organic Chemistry, 73, 1830–1841.

Vasquez-Caicedo, A.L., Heller, A., Neidhart, S., Carle, R. (2006). "Chromoplast morphology and β-carotene accumulation during postharvest ripening of Mango Cv. 'Tommy Atkins'". J. Agric. Food Chem, 54 (16), 5769–76.

Vijayanandraj S., Brinda R., Kannan K., Adhithya R., Vinothini S., Senthil K., et al. (2014). Detoxification of aflatoxin B1 by an aqueous extract from leaves of *Adhatoda* vasica Nees. Microbiological Research. 169 294–300

Vina, J., Borras, C., Gomez-Cabrera, M. C., Orr, W. C. (2006). Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression. Role of reactive oxygen species and (phyto)oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. Free Radic Res, 40,111–119.

Viškelis, P., Rubinskienė, M., Dambrauskienė, E., Karklelienė, R., Radzevičius, A., (2012). Quality parameters of dill (Anethum graveolens L.) and their changes during storage. In: Proceedings Innovative and healthy food for consumers, 112, 17–18.

Wang, H., Li, X., Liu, X., Shen, D., Qiu, Y., Zhang, X. (2015). Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (Allium sativum L.) aqueous extract as measured by UPLC. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95, 1838–1844.

Wang**,** J., Zhang, X., Lan, H., Wang, W. (2017). Effect of garlic supplement in the management of type 2 diabetes mellitus (T2DM): a meta-analysis of randomized controlled trials**.** Food & Nutrition Research**,** 61(1), 1377-571.

Wang, Y., M. Cella, K., Mallinson, J.D., Ulrich, K. L., Young, M. L., Robinette, S., Gilfillan, Wilcock, C., Bailey, C.J., **(**1994). Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. Xenobiotica, 24, 49–57.

Wilson, E. A., Demmig-Adams, B. (2007). Antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of garlic and onions. Nutr Food Sci.37:178–183.

Wong-Paz, J.E., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M.L., López, L.I., Neváarez-Moorillón, G.V. (2015). Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 8(2), 104-111**.**

Wu, P.P., Liu, K.C., Huang, W.W., Chueh, F. S., Ko, Y.C., Chiu, T.H. (2011). Diallyl trisulfide (DATS) inhibits mouse colon tumor in mouse CT-26 cells allograft model in vivo. Phytomedicine, 18(8–9), 672–676.

Wu, W.D., Wang, Y., Fang, Y.M., Zhou, H.Y. (2009). Polymorphism of the micro-opioid receptor gene (oprm1 118a>g) affects fentanyl-induced analgesia during anesthesia and recovery. Mol Diagn Ther, 13, 331-337.

Xiao, J., Ching, Y. P., Liong, E. C., Nanji, A. A., Fung, M. L., Tipoe, G. L. (2013). Garlic-derived S-allylmercaptocysteine is a hepato-protective agent in non-alcoholic fatty liver disease in vivo animal model. European Journal of Nutrition, 52(1), 179–191.

Xu, B., Monsarrat, B., Gairin, J. E., Girbal-Neuhauser, E. (2004). Effect of ajoene, a natural antitumor small molecule, on human 20S proteasome activity in vitro and in human leukemic HL60 cells. Fundam Clin Pharmacol, 18(2), 171–180

Yeh, Y. Y., Liu, L. (2001). Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. Journal of Nutrition, 131(3s), 989S–993S

Yousefi, K., Hamedeyazdan, S., Torbati, M., Fathiazad, F. (2016). Chromatographic Fingerprint Analysis of Marrubiin in *Marrubium vulgare* L. via HPTLC Technique. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 6(1), 131–136.

Yun, H.M., Ban, J.O., Park, K.R., Lee, C. K., Jeong, H.S., Han S. B., Hong, J.T. (2014). Pharmacology & Therapeutics, 142, 183–195.

Zeng, T., Guo, F.F., Zhang, C.L., Zhao, S., Dou, D.D., Gao, X.C. (2008). The anti-fatty liver effects of garlic oil on acute ethanol-exposed mice. Chem Biol Interact 176(2–3), 234–242.

Zhao, J., Huang, W. G., He, J., Tan, H., Liao, Q. J., Su, Q. (2006). Diallyl disulfide suppresses growth of HL-60 cell through increasing histone acetylation and p21WAF1 expression in vivo and in vitro. Acta Pharmacol Sin, 27(11), 1459–1466.

Zobia, N., Zhihui, C., Cuinan, W., Yanbin, W., Haiyan, D. (2017). Total polyphenols, total flavonoids, allicin and antioxidant capacities in garlic scape cultivars during controlled atmosphere storage. Postharvest Biology and Technology, 142, 183–195.

Annexe 1

Qualité d'extrait obtenu par les différents procédés d'extraction



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

Caractérisation de l'extrait obtenu par solvant à froid

- **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.

- **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.**

Annexe 2

Courbe de balayage de l'extrait méthanolique par spectrophotomètre UV :

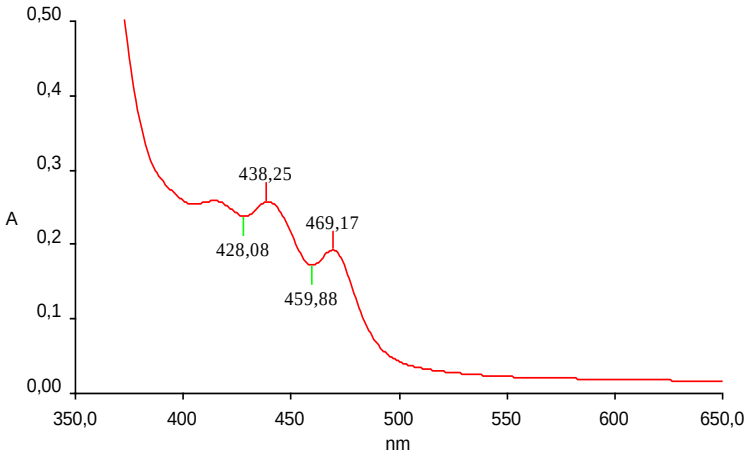


Figure. 1. : Spectre d'analyse de l'extrait méthanolique par UV.

Courbe de balayage de l'extrait aqueux très dilué :

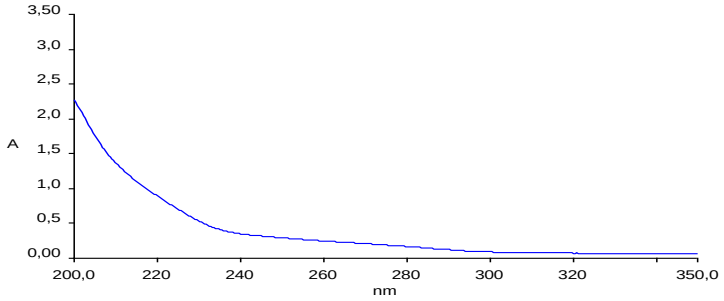


Figure. 2. : Spectre d'analyse de l'extrait aqueux de l'ail par UV.

Annexe 3

- **Choix de 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. 1. Composition du milieu de culture

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

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

- **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.
    - **Souches utilisées**
        - ***Escherichia*** *coli* (colibacille) : Bacille à gram négatif apparentant à la famille des Entérobactérie. E coli se développe sur gélose ordinaire. Indole^{+}, urée-fermente le lactose, gazogène, mais ne produit pas d'acétine (Figure. 1).
            - **Habitat :** E. coli est une hôte normale du tube digestif de l'homme et des animaux. Chez l'homme, il est présent à raison de 10à10 bactéries /g de selles, densité cependant très inférieure à celle des anaérobies qui constituent la flore dominante. La présence d'*E. coli* dans l'environnement est le témoin d'une contamination fécale.

- **Pouvoir pathogène :**
    - **Infection urinaire :** Plus fréquent chez la femme en raison de la brièveté, chez l'homme l'infection est généralement secondaire à un obstacle sur les voies urinaires.
    - **Infection intestinal :** Responsable de gastro-entérites.
    - **Infection néonatale :** Peut se traduire par une méningite ou une septicémie.
    - **Infection diverses :** *Escherichia coli* est impliqué dans de nombreuses infections à point de départ digestif ou urinaire, suppuration localisées, il peut s'agir d'infections communautaires Ou nosocomiales.
- **Sensibilité aux antibiotiques :** La bactérie était initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, mais l'acquisition de résistance est fréquente, surtout en milieu hospitalier (Nauciel et vildé, 2005 in FAUCHERE et AVRIL, 2002). Cependant la résistance aux amino et aux carboxipénicillines par production de pénicillinase défasse 40 des souches, une partie de ces souches résistent à l'association amoxicilline-acide clavulainiquepour les autres antibiotiques, les fréquences de résistance, sont faible à l'exception des sulfa- mides (50%), et tétracyclines (40 %) et du chloromphimcol (25%) (FAUCHERE et AVRIL, 2002).

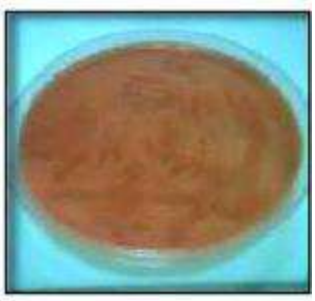


Figure. 1. *Echirichia coli* sur Hecktoen

1.6.2.1. *Staphylococcus aureus*

- **Habitat :** C'est un germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol, l'air. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. On le trouve à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles au niveau du Périnée ou des aisselles.
- **Caractères principaux :** Cocci à gram positif, immobile, pigmenté à jaune, non sporulé en amas (grappes de raisin), G+C: 30-39%, température optimal à 37°C, PH optimal: 7.2-7.4, NaCl: 7.5%, Anaérobie facultatif, oxydase+, catalase+.
- **Pouvoir pathogène :** Les manifestations dues à *Staphylococcus aureus* sont très nombreuses, elles sont suppurations, nécrotiques ou entériques :
    - les suppurations localisées.
    - les manifestations digestives.
    - le syndrome de choc toxique **(**Fauchere et Avril, 2002**)**.
- **Sensibilité aux antibiotiques :** Les souches communautaires sont généralement résistantes aux pénicillines G et A, mais sensibles aux pénicillines M. Elles sont souvent sensibles aux macrolides, aux synergistines, aux fluoroquinolones (Figure. 2).

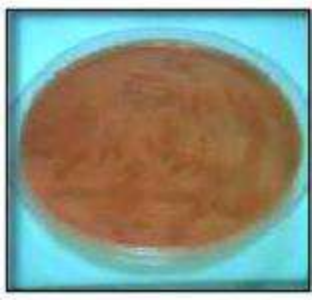


Figure. 2 . *Staphylococcus aureus* sur Chapman

3**. *Bacillus subtilus***

- **Caractères bactériologiques :** Les bacillus correspondent à des grands bacilles:
    - Gram +, sporogènes ;
    - faciles à cultiver ;
    - aérobies stricts ou facultatifs ;
    - possédant une catalase.
- **Morphologie :** Taille : 3 à 9 micromètres et 1 micromètre de large, forme rectangulaire et mobile. Isolés ou groupés en chaînes, ils peuvent représenter l'aspect en "canne de bambou". Coloration au Gram variable car ils se décolorent rapidement. On peut donc les voir Gram + et Gram – sur un frottis **(Figure. 3)**.

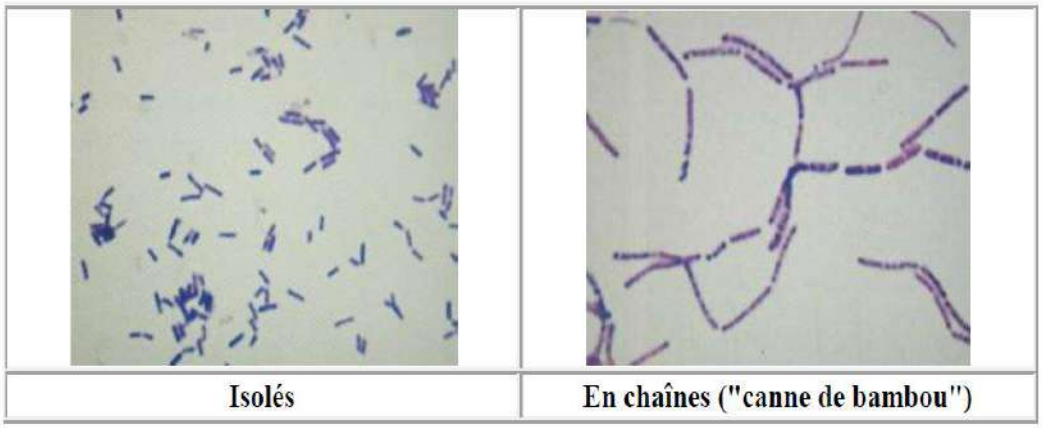


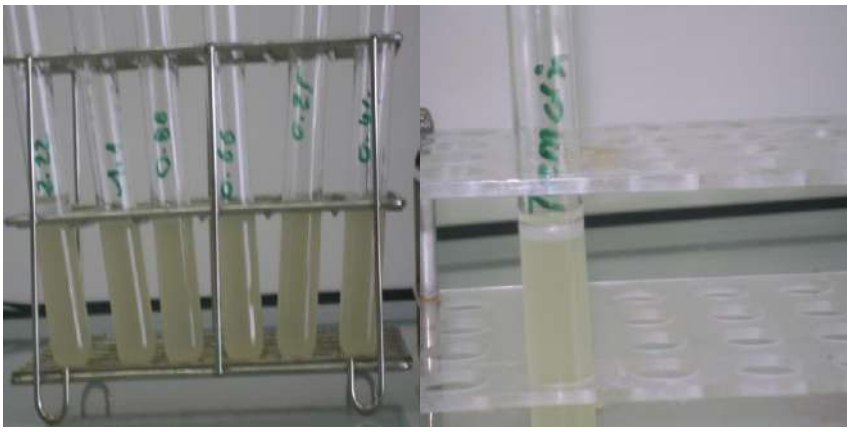
Figure. 3. *Bacillus subtilus*

Méthode de dilution en milieu liquide

- **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.

- **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.

Dilutions en milieu liquide :



I **II**

Figure. 4. Méthode des dilutions en milieu liquide (**I :** Dilution de concentration décroissante, **II :** Solution témoin)

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. 4). 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.

LWT - Food Science and Technology 82 (2017) 287–295

Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Prediction of the antibacterial activity of garlic extract on *E. coli, S. aureus* and *B. subtilis* by determining the diameter of the inhibition zones using artificial neural networks

Djamel Atsamnia [a, *], Mabrouk Hamadache [a], Salah Hanini [a], Othmane Benkortbi [a], Dahmane Oukrif [b]

[a] *Biomaterials and Transport Phenomena Laboratory (LBMPT), Yahia Fares University, Department of Chemical Engineering and Environment, Medea, 26000, Algeria*

[b] *University College London, Department of Pathology, England, United Kingdom*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 September 2016
Received in revised form
13 April 2017
Accepted 17 April 2017
Available online 20 April 2017

Keywords:
Inhibition diameter
Bacterial strain
Neural networks
Prediction
Validation

ABSTRACT

The aim of this study was to devise a model that predicts the inhibition zone diameter using artificial neural networks. The concentration, temperature and the exposure time of our extract were taken as input variables. The neural architecture model 3-13-3 and a learning algorithm Quasi-Newton (BFGS) revealed a positive correlation between the experimental results and those artificially predicted, which were measured according to a mean squared error (RMSE) and an R^2 coefficient of *E. coli* (RMSE = 1.28; R^2 = 0,96), *S. aureus* (RMSE = 1.46; R^2 = 0,97) and *B. subtilis* (RMSE = 1.88; R^2 = 0,96) respectively. Based on these results, an external and an internal model validation were attained. A neuronal mathematical equation was created to predict the inhibition diameters for experimental data not included in the basic learning. Consequently, a good correlation was observed between the values predicted by the equation and those obtained experimentally, as demonstrated by the R^2 and RMSE values. The results regarding the sensitivity analysis showed that the concentration was the most determinant parameter compared to Temperature and Time variables. Ultimately, the model developed in this study will be used reliably to predict the variation of garlic extract's inhibition diameter.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

For centuries, garlic (*Allium sativum*) has been known for its medicinal properties. Its anti-microbial activity is well known against a wide range of bacterial strains including: Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (two types of bacteria commonly associated with the human environment) (Bakri & Douglas, 2005; Whitemore & Naidu, 2000; Zhang et al., 2016). The effectiveness of fresh garlic extract against a wide range of pathogenic bacteria has been well-established (Curtis, Noll, Störmann, & Slusarenko, 2004; Kumar & Sharma, 1982), even amongst strains with an acquired resistance to antibiotics, such as *Staphylococcus aureus* (Curtis et al., 2004; Marchese et al., 2016). Because of its bactericidal capacity, garlic prevents bacteria from secreting toxins.

The main factors affecting stability and microbiological activity are temperature, pH, concentration and retention time. Since these factors can largely vary in food production and storage, mathematical models are needed to predict microbial behavior in the food matrix related to different microbial strains. In recent years, they have been growing interests in modeling food microorganisms (Keeratipibul, Phewpan, & Lursinsap, 2011), including modeling predictive microbiology, which generally focuses on the potential for alteration of food-borne pathogenic bacteria (Leroy, Degeest, & Vuyst, 2002).

In the present context, resides the importance of the Artificial Neurons Networks (ANN) in the bioactivity modelling making possible the prediction of microbial behaviour in specific operating conditions. (Marzouk & Elkadi, 2016). It is important to note that many studies have shown the benefits of the application of technical ANN compared to other statistical methods (Ross & McMeekin, 2003; Sagdic, Ozturk, & Kisi, 2012; Yamamura et al., 2008). In food microbiology, Artificial Neural Networks could be used to describe the effects of the interaction of environmental

* Corresponding author.
E-mail address: atsame2000@yahoo.fr (D. Atsamnia).

http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.053
0023-6438/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

factors more precisely, such as temperature, pH, and storage time, as compared to conventional models predictive Microbiology (Fang, Huang, Liu, Mei, & Chen, 2015; Lou & Nakai, 2000). Predicting the bioactivity and the evaluation of the antibacterial activity of compounds having a microbiological capacity was achieved by determining experimentally the diameters of the inhibition zones and the minimum inhibitory concentration (MIC). Ascertaining these parameters for different temperatures, times and concentrations using artificial neural networks (ANN), is an idea that has not yet been explored in this field.

The objective of this study is to examine the antibacterial activity of several samples of garlic extract, exposed for six hours at different temperatures on the growth of three bacterial strains, *staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), and *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). The other objective is to establish a mathematical model that allows us to determine the diameter of inhibition zone of garlic extract on the three bacterial species. Furthermore, this model enables us to precisely determine the inhibitory zone for different values of concentrations, temperatures, and incubation times, which are not included in the database used in this model. The second objective is to validate this model (Artificial Neural Networks) in comparison with other observed results obtained experimentally.

An ANN model was developed to predict the antibacterial properties (inhibition zones) and to set up an approach to analyze the predicted values of inhibitions diameters (d_{inh}) and the values obtained through different experiments. For this we opted for a model with three simultaneous outputs, d_{inh} *E. coli*, d_{inh} *S. aureus* and d_{inh} *B. subtilis*.

The methodology adopted to meet the objectives of assessing the model to average statistical performance criteria were coefficient of determination, square root of the mean square error, and bias on the average. To test the robustness of the ANN model, we used data that is not part of the original database.

This model can be used to avoid the multiplicity of microbiological tests, which causes instability of biological material due to mutation of some bacterial strains. It can also solve the problems of anti-bacterial activity concentrations, which are difficult to use in practice, including very low and very high concentrations.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of garlic extract

Fresh garlic bulbs (*A. sativum* L.*)* were collected in the region of Benchicaou (Medea, Algeria). The cloves were peeled, sliced and ground into a paste and suspended in distilled water, for 24 h at a temperature of 4 ± 0.5 °C. The maceration obtained was filtered through a gauze and then through a 0.45 microns micro filter. The obtained aqueous extract of garlic was stored at 4 ± 0.5 °C until it was used.

2.2. Reference strain preparation

According to the ATCC's recommendations: a seed lot system was followed whereby the reference strain is sub-cultured into several replicates at a time within a passage. Only 5 passages are permitted from the reference strain, therefore the risk of phenotypic alteration or genetic mutation is kept to a minimum.

Buffered sodium chloride-peptone solution Ph7.0 was used to prepare control suspensions. To obtain a spore suspension of *Aspergillus Brasiliensis* (ATCC 16404), 0.005% of polysorbate 80, was added to the buffer solutions. This suspension may be maintained at 2–8 °C for a limited period of time.

To check the operating conditions, a negative control obtained by substituting the diluent chosen in the preparation to be examined, consequently no microbial growth was observed. According to the (European Pharmacopoeia 2007), Non-compliant results required an investigation.

2.3. Microbiological method

We used the solid diffusion of depositing on the agar discs (6 mm in diameter) impregnated with antimicrobial substances to be studied. In our study, we used the Tropic soy agar; strains have summers selected from the reference strains listed in the ATCC institutes (American Type Culture Collection), *E. coli* (ATCC 11105), *S. aureus* (ATCC 6633) and *B. subtilis* (ATCC 6538) Clearly defined inhibition diameters that were obtained after suitable incubation time (18 h).

We later used a series of six tubes in which we distributed our garlic extract. Each tube was brought to a selected temperature (4 °C, 25 °C, 37 °C, 42 °C and 75 °C) for a total period of 6 h. We then prepared garlic extract solutions of decreasing concentrations from samples taken at intervals of one hour. Each solution was obtained by mixing 0.5 ml of the previous solution and 0.5 ml of myristate, an organic solvent, used in microbiology, without antimicrobial effect (European Pharmacopoeia 2007), until the 15th tube. The concentration decreased from the 1st to the 15th Tube to the order of 50% of a solution to another. Petri dishes were then prepared by depositing one blank disc on the surface of each one; they were inhibited by 25 µl (Microliters) of each of these concentrations of garlic extract to be tested. The same method was performed at different time intervals and temperatures of 18 °C, 50 °C and 90 °C for the same concentration of garlic extract.

2.4. Elaboration of the ANN model

Artificial neural networks (ANN) are nonlinear empirical models (Panagou & Kodogiannis, 2009), In general, they are composed of many units (neurons) operating in parallel. The operation of this network is largely determined by the connections between these elements (Zilouchian & Jafar, 2001). These neurons are spread over three layers: an input layer, an output layer, and a hidden layer. The number of neurons of the input layer is related to the number of input variables and the number of neurons of the output layer is identical to the number of output variables. Between these two layers, there is at least one hidden layer with the number of neurons depends on the application of the network (Yolmeh, Najafi, Farhoosh, & Salehi, 2014). The Neuronal regression optimized by passing through the network architecture, which concerns the distribution of the database into three sets: (Learning, Test and Validation), the transfer functions, the number of neurons in the hidden layer and the training algorithm.

In this work, 450 experimental datasets were selected to form the final database (Supplementary File S1). A multilayer perceptron network (MLP) was chosen for modeling. This is an artificial neural network of anticipation, owing to its excellent nonlinear generalization capabilities (Hamadache et al., 2016a; Rafei, Sorkhabi, & Mosavi, 2014; Wang, Zhang, Wang, Han, & Kong, 2014). The input vector was composed of the following variables: concentration, temperature and time. The output vector represents three outputs, which are as follows: inhibitions diameters of our garlic extract on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

Model performance was evaluated with the coefficient of determination R^2 between predicted and experimental values (Yang, Yang, Liu, & Hoogenboom, 2014), and by the square root of mean squared error RMSE (Chai & Draxler, 2014; Teke, Yıldırım, & Çelik, 2015) calculated by the following equation (1)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(Y_i^{\exp} - Y_{i=1}^{pred}\right)^2}{n}} \quad (1)$$

In this equation, n is the number of compounds in the dataset, and y_i^{exp}, y_i^{pred} are the experimental and the predicted values, respectively.

2.5. Model validation

In order to validate the model, two developed basic principles were commonly used, Internal validation and external validation (Hamadache et al., 2016b), they were judged by the following statistical parameters: $RMSE_{ext}$, $RMSE_{int}$, Q^2_{ext} and Q^2_{int} (Zhou et al., 2015), and calculated using the following equations:

$$RMSE_{ext} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(Y_{test} - \widehat{Y}_{test}\right)^2}{n}} \quad (2)$$

$$RMSE_{\text{int}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(Y_{train} - \widehat{Y}_{train}\right)^2}{n}} \quad (3)$$

$$Q^2_{ext} = 1 - \frac{\sum\left(Y_{test} - \widehat{Y}_{test)}\right)^2}{\sum\left(Y_{test} - \bar{Y}_{train}\right)^2} \quad (4)$$

$$Q^2_{\text{int}} = 1 - \frac{\sum\left(Y_{train} - \widehat{Y}_{train)}\right)^2}{\sum\left(Y_{train} - \bar{Y}_{train}\right)^2} \quad (5)$$

In these equations, n is the number of compounds in the dataset, y_{test} the experimental value of the test set, $\hat{y}_{test}$ the predicted value of the test set, $\hat{y}_{train}$ the predicted value of the training set, $\bar{y}_{train}$ the mean experimental value of the training set and y_{train} the experimental value of the training set. Great importance is attributed for these terms of validation. A value of $Q^2_{\text{int}} > 0,5$ is generally considered satisfactory, and a value greater than 0.9 is seen as excellent (Eriksson et al., 2003). Furthermore, in order to judge the quality of the model, it was a necessity to conduct further experiments to have a generalization of the real predictive ability of the model. For this, we have operated on other experimental values in temperature (T = 18 °C, T = 50 °C and T = 90 °C) and time (t = 0.5 h, t = 1.5 h, t = 2.5 h, t = 3.5 h, t = 4.5 h, t = 5.5 h and t = 6.5 h), which were randomly selected, in the same operating conditions and which were not part of the database used for model development. This type of validation was evaluated by the coefficient of determination Q^2 (Robustness term) and the root mean square error RMSE.

A local and global sensitivity analysis approach was utilized to assess the impact of input parameters on antibacterial activity of garlic extract. The sensitivity values were obtained from Statistica 10.0.228.8.

3. Results and discussion

3.1. Microbiological results

The results obtained (Supplementary File S1) show that the media temperature influences the inhibition diameter and consequently the antibacterial activity of garlic. The inhibition zones became increasingly important as the temperature rises from 25 °C to 37 °C. This demonstrates the great antibacterial effect of the garlic extract with increasing temperatures. However, increasing the temperature above 42 °C causes a reduction of the antibacterial activity of our extract, marked by a reduction of inhibition zones. Our results are in agreement with other authors, e.g. Jansen, Muller, and Knobloch (1989), Rybak, Calvey, and Harnly (2004), Lagunas and Castaigne (2008) and Guo et al. (2012).

Table 1
Selected parameters (best distribution of the database and best learning algorithm) of the optimal multi-layer perceptron.

The distribution of the database	Algorithm	R^2 *E. coli*	R^2 *S. aureus*	R^2 *B. subtilus*	RMSE *E. coli*	RMSE *S. aureus*	RMSE *B. subtilis*
80 10 10	BGFS	Train: 0,94 Valid: 0,94	Train: 0,94 Valid: 0,95	Train: 0,93 Valid: 0,94	2,06	2,02	2,48
	Gradient decert	Train: 0,63 Valid: 0,58	Train: 0,61 Valid: 0,53	Train: 0,67 Valid: 0,61	6,19	5,93	6,43
	Conjugate gradient	Train: 0,66 Valid: 0,66	Train: 0,67 Valid: 0,64	Train: 0,70 Valid: 0,71	6,36	6,35	6,25
70 15 15	**BGFS**	**Train: 0,97 Valid: 0,97**	**Train: 0,96 Valid: 0,96**	**Train: 0,96 Valid: 0,96**	**1,48**	**1,63**	**1,80**
	Gradient decert	Train: 0,64 Valid: 0,61	Train:0,64 Valid:0,61	Train: 0,68 Valid: 0,65	5,70	5,39	5,82
	Conjugate gradient	Train: 0,87 Valid: 0,88	Train: 0,86 Valid: 0,85	Train: 0,85 Valid: 0,90	3,20	3,16	3,56
60 20 20	BGFS	Train: 0,94 Valid: 0,94	Train:0,93 Valid: 0,93	Train: 0,93 Valid: 0,92	2,21	2,18	2,60
	Gradient decert	Train: 0,41 Valid: 0,45	Train: 0,44 Valid: 0,49	Train: 0,43 Valid: 0,44	7,88	7,2457	8,58
	Conjugate gradient	Train: 0,79 Valid: 0,78	Train: 0,78 Valid: 0,74	Train: 0,81 Valid: 0,78	3,99	3,88	4,24
60 10 30	BGFS	Train: 0,94 Valid: 0,92	Train: 0,93 Valid: 0,92	Train: 0,93 Valid: 0,93	2,27	2,12	2,43
	Gradient decert	Train: 0,40 Valid: 0,39	Train: 0,42 Valid: 0,42	Train: 0,42 Valid: 0,40	7,71	7,15	8,42
	Conjugate gradient	Train:0,84 Valid:0,86	Train: 0,82 Valid: 0,83	Train: 0,83 Valid:0,82	3,53	3,42	4,03

Train: Training, Valid: Validation.

3.2. Model development and validation

The objective of this phase was to find the optimal architecture of the neural network so that the influence of temperature, time of conservation and concentration of garlic extract on antibacterial activity could be predicted using diameters of inhibition zones.

A multilayer perceptron (MLP) of a three-layer network, an input layer, a hidden layer and an output layer is adopted in this work. The number of neurons in the hidden layer, learning algorithms and the transfer function have been optimized after many tests. The optimal network was chosen following the values of the mean square error (RMSE) and the coefficient of determination (R^2). The results obtained in this optimization (Tables 1 and 2) show that BFGS (Quasi-Newton) is an acceptable learning algorithm that can be applied with a distribution of the database as follows: 70% training, 15% for the test and 15% for the validation set. In addition, the transfer functions, which have given good results, are the hyperbolic tangent function for the whole "input layer - hidden layer" and the logistic sigmoid function for the whole "hidden layer - layer output". The determination coefficient R^2 reaches 0.98 and a mean square error was less than 1.90 regarding the three strains studied. Furthermore, the number of neurons in the hidden layer was equal to thirteen. Finally, the architecture {3-13-3} of the neural network has been selected (Fig. 1). This network will be used to predict new data.

Based on these results, we can say that we have established a neuronal model with three outputs and predicted the zones inhibition diameters of the garlic extract with regard to the three strains *E. coli*, *S. aureus. B. Subtilis*. The results of selected optimal parameters were used to develop a non-linear model of ANN

Table 2
Selected parameters (Best transfer function and Number of artificial neurons per hidden layer) of the optimal multi-layer perceptron.

Transfer function	The Number of neurons per hidden layer	R^2 *E. coli*	R^2 *S. aureus*	R^2 *B. subtilus*	RMSE *E. coli*	RMSE *S. aureus*	RMSE *B. subtilus*
Logistic-identity	16	Train: 0,93 Valid: 0,92	Train: 0,92 Valid: 0,93	Train: 0,92 Valid: 0,93	2,40	2,25	2,61
Logistic-logistic	17	Train: 0,94 Valid: 0,94	Train: 0,94 Valid: 0,93	Train: 0,93 Valid: 0,92	2,18	2,07	2,59
Logistic-Tanh	15	Train: 0,93 Valid: 0,93	Train: 0,93 Valid: 0,93	Train: 0,96 Valid: 0,92	2,24	2.16	2,56
Logistic-exponentiel	13	Train: 0,93 Valid: 0,93	Train: 0,92 Valid: 0,93	Train: 0,91 Valid: 0,91	2,34	2,23	2,84
Tanh-identity	18	Train: 0,95 Valid: 0,95	Train: 0,94 Valid: 0,94	Train: 0,93 Valid: 0,93	1,99	1,93	2,43
Tanh-logistic	**13**	**Train: 0,98 Valid: 0,97**	**Train: 0,96 Valid: 0,96**	**Train: 0,96 Valid: 0,96**	**1,28**	**1,46**	**1,88**
Tanh-Tanh	18	Train: 0,93 Valid: 0,93	Train: 0,93 Valid: 0,93	Train: 0,92 Valid: 0,93	2,21	2,82	2,73
Tanh-exponentiel	15	Train: 0,94 Valid: 0,92	Train: 0,93 Valid: 0,92	Train: 0,93 Valid: 0,93	2,28	2,16	2,44
Exponentiel-identity	18	Train: 0,92 Valid: 0,92	Train: 0,91 Valid: 0,91	Train: 0,91 Valid: 0,93	2,48	2,46	2,77
Exponentiel-logistic	10	Train: 0,94 Valid: 0,94	Train: 0,93 Valid: 0,93	Train: 0,92 Valid: 0,93	2,16	2,17	2,58
Exponentiel-Tanh	10	Train: 0,92 Valid: 0,92	Train: 0,92 Valid: 0,92	Train: 0,92 Valid: 0,94	2,45	2,31	2,54
Exponentiel-Exponentiel	16	Train: 0,93 Valid: 0,93	Train: 0,92 Valid: 0,92	Train: 0,91 Valid: 0,91	2,34	2,33	2,90

Train: Training, Valid: Validation.

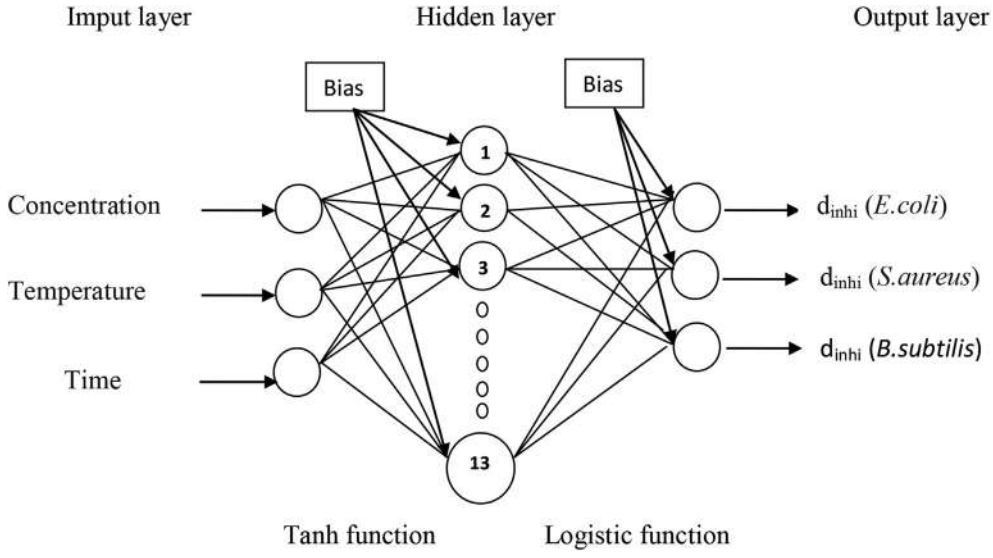


Fig. 1. Architecture of the optimums ANN model for prediction the diameter of inhibition zones. Profile 3:13:3.

networks (Table 1).

In Fig. 2 (a, b, c) the values shown of experimental inhibition diameter (d_{inh}) as a function of those produced by the selected network for all three strains. We note a significant correlation with the coefficient of determination R^2 greater than 96% and an RMSE less than 1.90.

To establish the performance of the developed model, the parameters of the internal and external validation were calculated and reported in Table 3. As can be seen in this Table, the nonlinear ANN model has given good results with impressive values of the determination coefficient (R^2) and a better robustness (Q^2) for assemblies training and test sets. The values of the diameters of inhibition produced for all three strains are close to the corresponding experimental values. These results indicate that this model not only gave good results during its development, but also provides an excellent predictive power. The results also suggest that there is a nonlinear correlation between the antibacterial activity (represented by the diameter of inhibition) and the studied parameters, mainly the temperature, storage time and concentration of the aqueous garlic extract samples. Therefore, the resulting ANN model can be effectively used to predict the antibacterial activity of aqueous extract of garlic on the strains used and at different temperatures, storage time, and the concentration of samples.

This will allow us to generate a large database where we can model the antibacterial activity by neural networks.

Table 3
Performance of MLP-ANN model for the three bacterial strains.

	Internal validation		External Validation	
	$RMSE_{int}$	Q^2_{int}	$RMSE_{ext}$	Q^2_{ext}
E. coli	1,91	0,965	1,56	0,936
S. aureus	1,93	0,961	1,39	0,941
B. subtilus	1,92	0,951	1,63	0,949

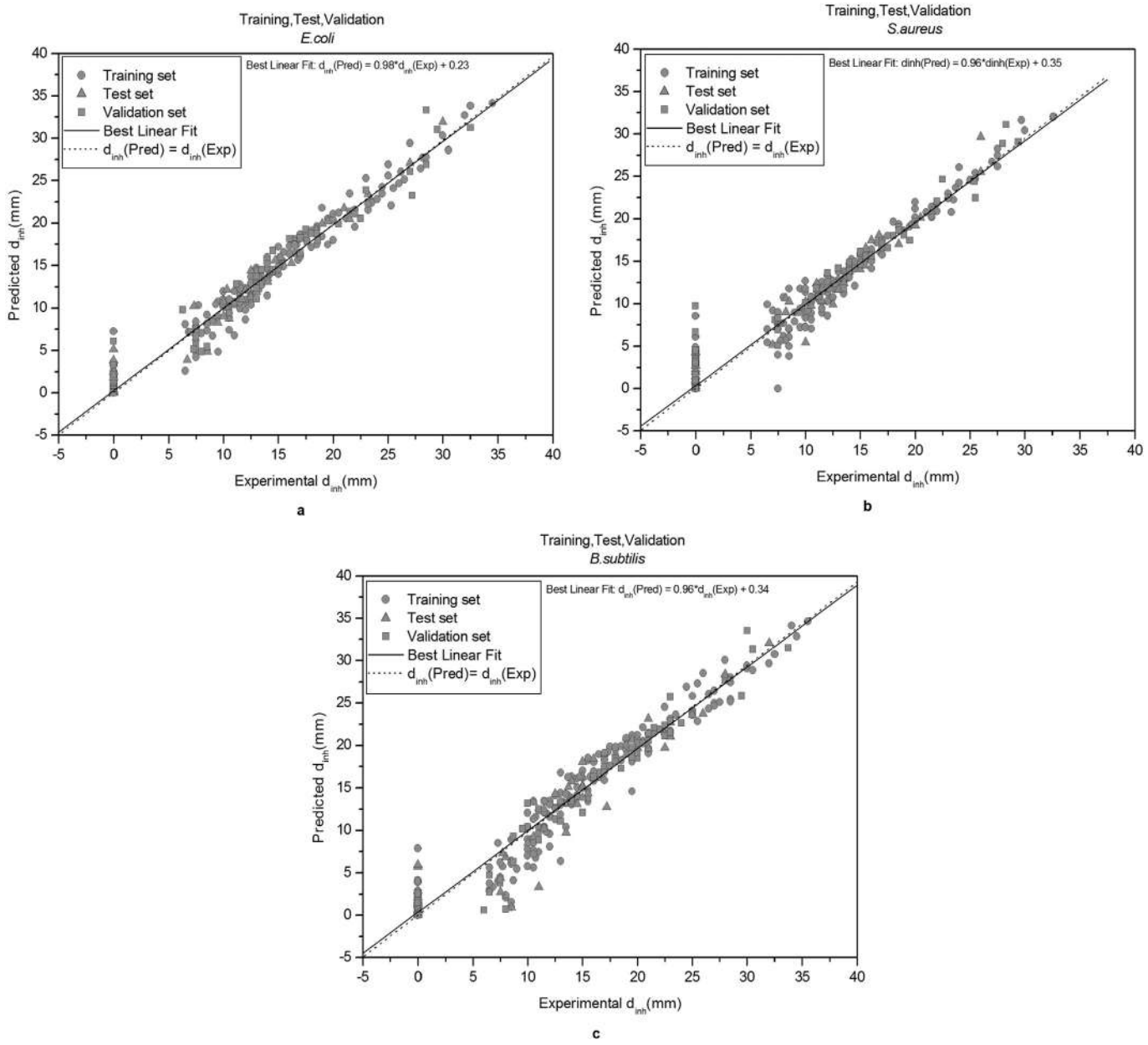


Fig. 2. Scatter plot of the predicted values of (d_{inh}) versus the experimental values by ANN model for the training-Test and Validation set. (a) E. coli, (b) S. aureus, (c) B. subtilus.

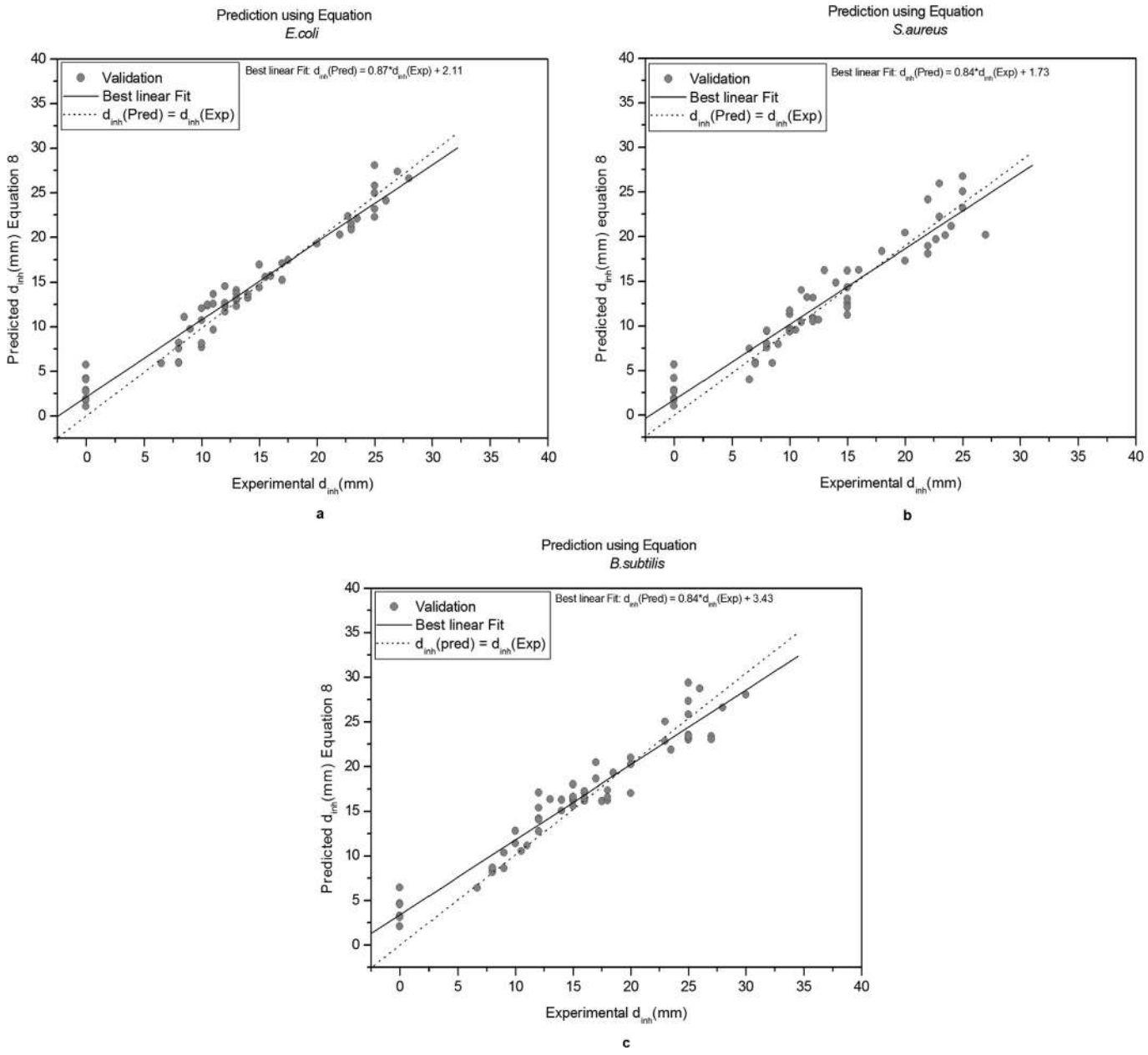


Fig. 3. Scatter plot of the predicted values of (d_{inh}) versus the experimental values by ANN model for the prediction using equation (8). (a) *E. coli*, (b) *S. aureus*, (c) *B. subtilus*.

3.3. Application of mathematical model equation

The architecture of the network developed in this study is a multi-layer perceptron {3-13-3}. The network is composed of three inputs (E_i, i = 1 à 3), an output (d_{inh}) for each strain and thirteen neurons in the hidden layer. The two transfer functions used in this study are the hyperbolic tangent and logistic sigmoid function. Their mathematical equations (6) and (7) are given below:

$$\text{Hyperbolic tangent}: \quad f(x) = \frac{e^{x} - e^{-x}}{e^{x} + e^{-x}} \tag{6}$$

$$\text{Logistic sigmoïd}: \quad f(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}} \tag{7}$$

The mathematical equation of the model (8), which can be used subsequently for the prediction of inhibition diameter d_{inh} is shown below:

$$d_{inh} = \frac{1}{1 + \exp\left(- \sum_{j=1}^{13} W_{kj} \left(\frac{\exp\left(\sum_{i=1}^{3} W_{ji}E_i + b_j^H\right) - \exp\left(-\sum_{i=1}^{3} W_{ji}E_i + b_j^H\right)}{\sum_{i=1}^{3} W_{ji}E_i + b_j^H) + \exp\left(-\sum_{i=1}^{3} W_{ji}E_i + b_j^H\right)} \right) + b_k^0 \right)} \tag{8}$$

W_{KJ} represents the weight associated with each output connection k/j hidden neuron, E_i the inputs, b^H_J biais associated to hidden neuron j, W_{ji} the weight associated with each input connection i/j hidden neuron, and b^0_k designates the bias associated with the output neuron k.

To validate the model and verify its predictive power, this equation was used for a set of 59 experimental values that were not used in the training and test sets. The results are shown in Fig.3a–c. A dotted line indicates the best linear fit. As seen in these figures, there is good correlation between the results of our mathematical equation and experimental data. Furthermore, as demonstrated by the statistical parameters (R^2 and RMSE) calculated for the results of the equation are reported in Table 4, the results show that the predicted values are very close to the observed values (see Table 5).

This type of validation is necessary for the model to have practical application. (Bagheri, Mirbagheri, Bagheri, & Kamarkhani, 2015; Luccarini et al., 2010).

The nonlinear model MLP-ANN gives good results for this type of prediction with an optimal coefficient of determination R^2 (Threshold value $R^2 > 0,6$) (Abbasi & Eslamloueyan, 2014), and root mean square error RMSE. These values indicate that the MLP-ANN model is reliable not only because we has obtained good results in the development of the model, but also good interpolation capacity (Fig. 3). These results allow us to predict the evolution of the inhibition diameters zones of garlic extract in different temperature and different incubation times without going through the individual experiments.

4. Analysis of the input variables for the prediction of the inhibition zone diameters

After validating the prediction power of the neural network model, a sensitivity analysis was utilized to provide better understanding of possible relationships between input and output variables of the prediction model. There are two types of sensitivity analysis: the local sensitivity analysis and the global sensitivity analysis.

Table 5
Statistical parameters obtained by application of the mathematical equation.

	R^2	RMSE
E. coli	0,958	1854
S. aureus	0,915	2022
B. subtilus	0,933	1899

4.1. Local sensitivity analysis

The local sensitivity of an input is measured by varying its value of an infinitesimal amount in 10 different equidistant points, encompassed by a minimum (point 1) and a maximum (point 10) (STATISTICA 10.0.228.8).

The Studied neural network (Fig. 4) can be very sensitive to small concentration variations in a certain zone of the input space (point 1). Whereas, that very input is negligible with a positive or negative influence on the output value (low sensitivity) in other points in space that are close to the input value; mainly, large variations in this latter can bring little change in the predictions of the network. However, local sensitivity measures may present a type of behavior that could not be interpreted based on how important (influential) an input variable is at a given point in space (Rodriguez-Fernandez, Banga, & Doyle, 2012).

These results show that the concentration is non-linearly dependent (interactions) with time and with temperature at the

Table 4
Experimental values (Exp) not included in basic learning and Predicted values (Pred) obtained by Equation (8).

N°	d_{inh} (mm) *E. coli*		d_{inh} (mm) *S. aureus*		d_{inh} (mm) *B. subtilis*		N°	d_{inh} (mm) *E. coli*		d_{inh} (mm) *S. aureus*		d_{inh} (mm) *B. subtilis*	
	Exp	Pred	Exp	Pred	Exp	Pred		Exp	Pred	Exp	Pred	Exp	Pred
01	10,5	12,39	10	9,63	13	16,37	31	10	8,15	9	7,96	11	11,19
02	12	12,31	10	9,46	15	16,23	32	8	5,98	8,5	5,85	9	8,63
03	13	12,30	10	9,38	16	16,18	33	0	4,24	0	4,15	0	6,45
04	12	12,37	10	9,37	15	16,20	34	0	2,90	0	2,84	0	4,68
05	10,5	12,51	10	9,43	14	16,29	35	0	1,92	0	1,87	0	3,30
06	12	12,71	10,5	9,56	15	16,44	36	13	13,74	12	10,84	18	17,37
07	13	12,97	10	9,75	15	16,65	37	14	13,21	12	10,52	16	16,51
08	25	28,08	25	26,75	25	29,39	38	13	13,22	12,5	10,69	17,5	16,16
09	27	27,36	23	25,93	26	28,74	39	14	13,66	15	11,26	18	16,24
10	28	26,60	25	25,07	30	28,06	40	15	14,40	15	12,11	18	16,59
11	25	25,80	22	24,15	25	27,35	41	17	15,25	15	13,07	20	17,04
12	25	24,97	25	23,20	28	26,62	42	25	20,30	20	17,32	23	22,83
13	26	24,10	23	22,19	25	25,85	43	23	20,88	25	18,10	25	23,00
14	25	23,18	24	21,15	23	25,04	44	23	21,55	25	18,96	25	23,27
15	23	21,15	20	20,42	25	23,52	45	23,5	22,10	25,7	19,69	25	23,45
16	20	19,27	18	18,32	23,5	21,86	46	22,7	22,38	23,7	20,12	27	23,40
17	17,5	17,45	16	16,27	20	20,22	47	25	22,26	27	20,16	27	23,03
18	16	15,71	15	14,34	17	18,63	48	15	16,97	13	16,24	17	20,47
19	13	14,09	15	12,56	16	17,10	49	12	14,55	11	14,02	15	18,01
20	11	12,58	12	10,94	15	15,64	50	10	12,09	10	11,72	12	15,42
21	8,5	11,12	8	9,44	12	14,21	51	9	9,73	8	9,49	10	12,83
22	17	17,145	15	16,21	20	20,97	52	8	7,59	6,5	7,45	9	10,39
23	15,5	15,58	14	14,84	18,5	19,28	53	0	5,75	0	5,67	8	8,18
24	13	13,73	12	13,17	16	17,28	54	8	8,23	8	8,00	10	11,41
25	12	11,71	10	11,32	14	15,07	55	6,5	5,93	7	5,77	8	8,70
26	11	9,67	10	9,41	12	12,78	56	0	4,10	6,5	3,99	6,7	6,41
27	10	7,74	8	7,58	10,5	10,54	57	0	2,73	0	2,65	0	4,56
28	8	6,00	7	5,91	8	8,46	58	0	1,75	0	1,69	0	3,14
29	11	13,67	11,5	13,22	12	17,12	59	0	1,08	0	1,03	0	2,09
30	10	10,75	11	10,44	12	14,06							

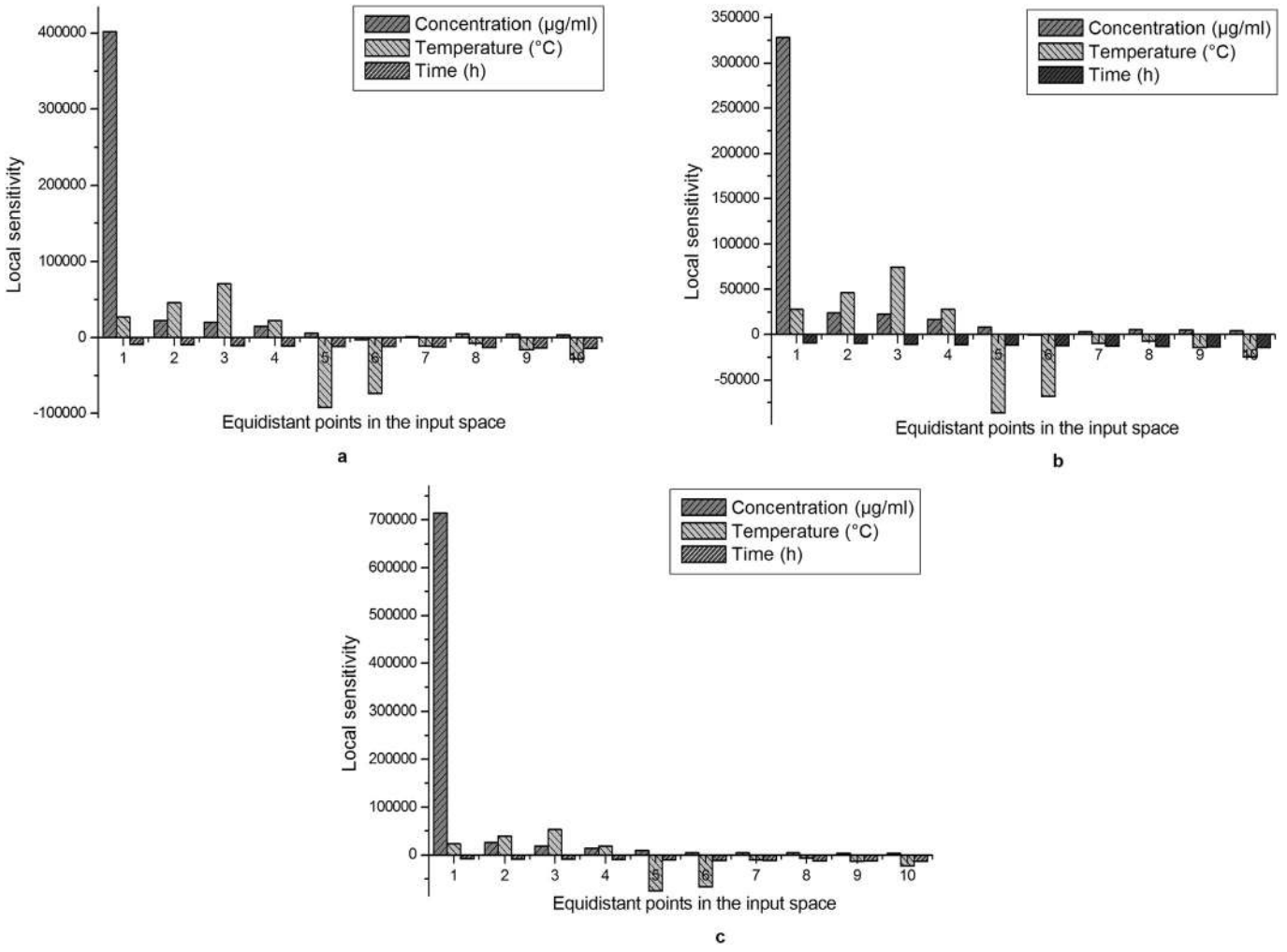


Fig. 4. Local Sensitivity analysis for. (a) d_{inh} *E. coli* (mm), (b) d_{inh} *S. aureus* (mm) and (c) d_{inh} *B. subtilus* (mm), Network: MLP 3-13-3. In the input space per variable (Concentration, Temperature, Time).

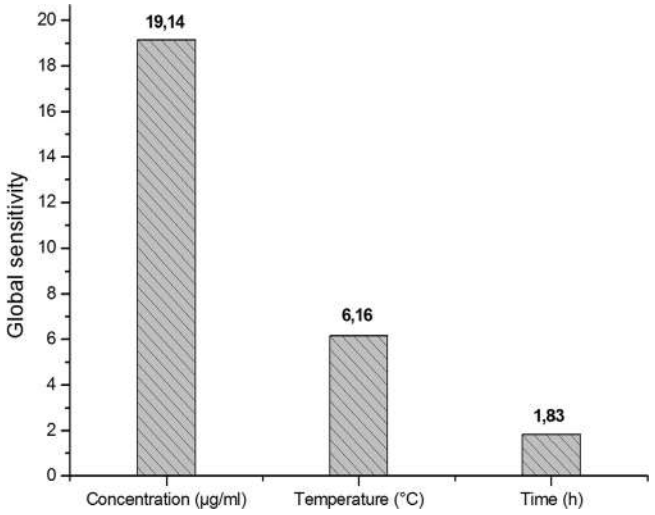


Fig. 5. Global Sensitivity analysis for: d_{inh} *E. Coli* (mm), d_{inh} *S. Aureus* (mm), and for d_{inh} *B. Subtilus* (mm). Samples: Train, Test and Validation.

same time. However, in the local sensitivity approach, a single factor is disrupted while all other factors are fixed to evaluate the variation of the production (Yi, Zou, & Guo, 2016).

Therefore, it is advantageous to evaluate not only the response to changes of a single input but also the response to simultaneous variations of all inputs. This indicates that the network is better made when all variables were considered.

4.2. Global sensitivity analysis

This method explores the influence of a factor throughout the full multi-dimensional space, it evaluates the effect of a parameter while all other parameters vary simultaneously (Laoun, Naceur, Khellaf, & Kannan, 2016; Younes, Delay, Fajraoui, Fahs, & Mara, 2016). The advantage of this approach is that it provides information regarding the interaction of various model parameters. A coefficient of higher global sensitivity corresponds to the highest influence on the output variables (Benković et al., 2015). Fig. 5 shows that the concentration of garlic extract was the most influential parameter (sensitive) affecting the inhibition diameter zone, followed by temperature. It is also found that the conservation duration (Time) is relatively the least sensitive parameter. These results indicate that the antibacterial activity of garlic extract on the three bacterial strains *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, is mainly controlled by the concentration and temperature of garlic extract.

5. Conclusion

The application of artificial neural network enabled the prediction of antibacterial activity of garlic extract in three different strains of bacteria. For this purpose, one model with three different outputs was designed. This study consists of 450 samples of extract, modeled for their antibacterial activity based on the artificial neural network (Multilayer Perceptron: MLP-ANN). All the internal and external validation methods indicate that the results of the constructed neural model were robust and satisfactory as shown by the values of R^2, Q^2 and RMSE respectively. A neuronal mathematical equation predicted the inhibition diameters for a series of 59 samples, which were not included in the training set. A good correlation was observed between the values predicted by the equation and those obtained experimentally. Furthermore, the sensitivity results reveal a dependence upon the different input parameters, and the most influential on power output are the garlic extract concentration and temperature. Moreover, the model developed could be used to predict the inhibition diameter of garlic extract using three bacterial strains. These results offer new perspectives, particularly in the field of microbiology, since they could be applied to other concentrations, temperatures, and time values, without resorting to experiments.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors thank the staff of the Microbiological laboratory of the Pharmaceutical Company (SAIDAL) of Medea (Algeria) for their support and for providing microbiological material.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.053.

References

Abbasi, A., & Eslamloueyan, R. (2014). Determination of binary diffusion coefficients of hydrocarbon mixtures using MLP and ANFIS networks based on QSPR method. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 132*, 39–51.

Bagheri, M., Mirbagheri, S. A., Bagheri, Z., & Kamarkhani, A. M. (2015). Modeling and optimization of activated sludge bulking for a real wastewater treatment plant using hybrid artificial neural networks-genetic algorithm approach. *Process Safety and Environmental Protection, 95*, 12–25.

Bakri, I. M., & Douglas, C. W. I. (2005). Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of Oral Biology, 50*, 645–651.

Benković, M., Tušek, A. J., Belščak-Cvitanović, A., Lenart, A., Domian, E., Komes, D., et al. (2015). Artificial neural network modelling of changes in physical and chemical properties of cocoa powder mixtures during agglomeration. *LWT - Food Science and Technology, 64*, 140–148.

Chai, T., & Draxler, R. R. (2014). Root mean square error (RMSE) or mean absolute error (MAE)?– Arguments against avoiding RMSE in the literature. *Geoscientific Model Development, 7*, 1247–1250.

Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., & Slusarenko, A. J. (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology, 65*, 79–89.

Eriksson, L., Jaworska, J., Worth, A. P., Cronin, M. T. D., McDowell, R. M., & Gramatica, P. (2003). Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability Evaluations of classification and regression-based QSARs. *Environmental Health Perspectives, 111*, 1361–1375.

Fang, T., Huang, L., Liu, L., Mei, F., & Chen, J. (2015). Mathematical modeling of growth of Salmonella spp. and spoilage microorganisms in raw oysters. *Food Control, 53*, 140–146.

Guo, J. J., Kuo, C. M., Chuang, Y. C., Hong, J. W., Chou, R. L., & Chen, T. I. (2012). The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against Streptococcus iniae and on growth in orange-spotted grouper, Epinephelus coioides. *Aquaculture, 364–365*, 33–38.

Hamadache, M., Benkortbi, O., Hanini, S., Amrane, A., Khaouane, L., & Si moussa, C. (2016b). Quantitative Structure Activity Relationship for acute oral toxicity of pesticides on rats: Validation, domain of application and prediction. *Journal of Hazardous Materials, 303*, 28–40.

Hamadache, M., Hanini, S., Benkortbi, O., Amrane, A., Khaouane, L., & Si moussa, C. (2016a). Artificial neural network-based equation to predict the toxicity of herbicides on rats. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 154*, 7–15.

Jansen, H., Muller, B., & Knobloch, K. (1989). Characterization of an alliin lyase preparation from garlic (Allium sativum). *Planta Medica, 55*, 434–439.

Keeratipibul, S., Phewpan, A., & Lursinsap, C. (2011). Prediction of coliforms and Escherichia coli on tomato fruits and lettuce leaves after sanitizing by using artificial neural networks. *LWT - Food Science and Technology, 44*, 130–138.

Kumar, A., & Sharma, V. D. (1982). Inhibitory effect of garlic (Allium sativum Linn.) on enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Indian Journal of Medical Research, 76*, 66–70.

Lagunas, M. L. L., & Castaigne, F. (2008). Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. *Food Chemistry, 111*, 56–60.

Laoun, B., Naceur, M. W., Khellaf, A., & Kannan, A. M. (2016). Global sensitivity analysis of proton exchange membrane fuel cell model. *International Journal of Hydrogen Energy, 41*, 9521–9528.

Leroy, F., Degeest, B., & Vuyst, L. D. (2002). A novel area of predictive modelling: Describing the functionality, of beneficial microorganisms in foods. *International Journal of Food Microbiology, 73*, 251–259.

Lou, W., & Nakai, S. (2000). Application of artificial neural networks for predicting the thermal inactivation of bacteria: A combined effect of temperature, pH and water activity. *Food Research International, 34*, 573–579.

Luccarini, L., Bragadin, G. L., Colombini, G., Mancini, M., Mello, P., Montali, M., et al. (2010). Formal verification of wastewater treatment processes using events detected from continuous signals by means of artificial neural networks, case study: SBR plant. *Environ. Environmental Modelling & Software, 25*(5), 648–660.

Marchese, A., Barbieri, R., Sanches-Silva, A., Daglia, M., Nabavi, S. F., Jafari, N. J., et al. (2016). Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. *Trends In Food Science & Technology, 52*, 49–56.

Marzouk, M., & Elkadi, M. (2016). Estimating water treatment plants costs using factor analysis and artificial neural networks. *Journal of Cleaner Production, 112*, 4540–4549.

Panagou, E. Z., & Kodogiannis, V. S. (2009). Application of neural networks as a non-linear modelling technique in food mycology. *Expert Systems with Applications, 36*, 121–131.

Rafei, M., Sorkhabi, S. E., & Mosavi, M. R. (2014). Multi-objective optimization by means of multi-dimensional MLP neural networks. *Neural Network World, 24*(1), 31–56.

Rodriguez-Fernandez, M., Banga, J. R., & Doyle, F. J. (2012). Novel global sensitivity analysis methodology accounting for the crucial role of the distribution of input parameters: Application to systems biology models. *International Journal of Robust and Nonlinear Control, 22*, 1022–1102.

Ross, T., & McMeekin, T. A. (2003). Modeling microbial growth within food safety risk assessment. *Risk Analysis, 23*, 179–197.

Rybak, M. E., Calvey, E. M., & Harnly, J. M. (2004). Quantitative determination of allicin in garlic: Supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*, 682–687.

Sagdic, O., Ozturk, I., & Kisi, O. (2012). Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. *Expert Systems with Applications, 39*, 6792–6798.

Teke, A., Yıldırım, H. B., & Çelik, Ö. (2015). Evaluation and performance comparison of different models for the estimation of solar radiation. *Renewable & Sustainable Energy Reviews, 50*, 1097–1107.

Wang, J., Zhang, W., Wang, J., Han, T., & Kong, L. (2014). A novel hybrid approach for wind speed prediction. *Information Sciences, 27*(3), 304–318.

Whitemore, B. B., & Naidu, A. S. (2000). Thiosulfinates. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 265–380). Boca Raton (FL): CRC Press.

Yamamura, S., Kawada, K., Takehira, R., Nishizawa, K., Katayama, S., Hirano, M., et al. (2008). Prediction of aminoglycoside response against methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in burn patients by artificial neural network modeling. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 62*, 53–58.

Yang, J. M., Yang, J. Y., Liu, S., & Hoogenboom, G. (2014). An evaluation of the statistical methods for testing the performance of crop models with observed data. *Agricultural Systems, 127*, 81–89.

Yi, X., Zou, R., & Guo, H. (2016). Global sensitivity analysis of a three-dimensional nutrients-algaedynamic model for a large shallow lake. *Ecological Modelling, 327*, 74–84.

Yolmeh, M., Najafi, M. B. H., Farhoosh, R., & Salehi, F. (2014). Modeling of antibacterial activity of annatto dye on *Escherichia coli* in mayonnaise. *Food Bioscience, 8*, 8–13.

Younes, A., Delay, F., Fajraoui, N., Fahs, M., & Mara, T. A. (2016). Global sensitivity analysis and Bayesian parameter inference for solute transport in porous media colonized by biofilms. *Journal of Contaminant Hydrology, 191*, 1–18.

Zhang, X., Li, Y., Li, B., Mao, Y., Wu, X., Zou, X., et al. (2016). Three supplementary methods for analyzing cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Microbiological Methods, 120*, 34–40.

Zhou, W., Wu, S., Dai, Z., Chen, Y., Xiang, Y., Chen, J., et al. (2015). Nonlinear QSAR models with high-dimensional descriptor selection and SVR improve toxicity prediction and evaluation of phenols on Photobacterium phosphoreum. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 145*, 30–38.

Zilouchian, A., & Jafar, M. (2001). Automation and process control of reverse osmosis plants Using soft computing methodologies. *Desalination, 135*, 51–59.

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 a commencé à être percé. C'est dans ce cadre de recherches que se situe l'objectif de notre travail.

A cet effet, après optimisation des meilleurs solvants d'extraction, notre intérêt s'est porté sur les composés soufrés et phénoliques de l'ail, les constituants majeurs de l'extrait et les plus doués d'effets thérapeutiques. Une fois l'étude de la stabilité thermique des composés bioactifs de l'ail, l'allicine, les polyphénols et les flavonoïdes finalisée, notre intérêt s'est porté sur l'activité antioxydante déterminées par les trois méthodes de dosages antioxydants DPPH, ABTS et RP.

On a entamé par la suite successivement l'étude des propriétés hépatoprotectrice, hypoglycémiante et antibactérienne. Les résultats auxquels on a abouti sont encourageants à plus d'un titre et notamment celui relatif aux études des corrélations entre ces effets thérapeutiques et l'activité antioxydante des composés de l'ail.

A la fin de ce travail nous avons établi un modèle neuronal qui pourrait être appliqué à la détermination de la C.M.I sans recourir à des expériences. Ce travail, au regard des résultats obtenus, nous offre des perspectives de recherche nombreuses et intéressantes.

Mots clés : l'extrait d'ail, polyphénols, Flavonoïdes, antioxydants, hepatoprotectrice, hypoglycémiant, antibactérienne

ملخص :

الخصائص العلاجية للثوم آثيرة 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 إيجاد المذيبات المثلى لعملية الاستخلاص كان اهتمامنا على المركبات الكبريتية و الفينولية من الثوم، العناصر الرئيسية في مستخلص الثوم و الأكثر اثر علاجي. وبمجرد الانتهاء من دراسة الثبات الحراري للمركبات النشطة بيولوجيا من الثوم الأليسين، البوليفينول وفلافونويدات، ركزنا عملنا على النشاط المضاد للأكسدة التي تحددها الطرق الثلاث لجرعة مضادة الأكسدةABTS، DPPH وRP . بدأنا بعد ذلك على التوالي دراسة الخصائص كواقي للكبد، خافض لسكر الدم، و مضاد للبكتيريا. النتائج التي تم التوصل إليها مشجعة في كثير من النواحي، بما في ذلك ما يتصل منه بدراسات الترابط بين هذه التأثيرات العلاجية والنشاط المضاد للأكسدة لمركبات الثوم.

في نهاية هذا العمل أنشأنا نموذج العصبي الاصطناعي التي يمكن تطبيقها على تحديد C.M.I دون اللجوء إلى التجارب

المفاتيح : مستخلص الثوم، البوليفينول، الفلافونويد، مضادات الأكسدة، واقي الكبد، خافض سكر الدم، مضاد للبكتيريا.

Abstract:

The therapeutic virtues of the garlic are numerous and ancestral. With the development of the physico-chemical, biological and microbiological investigation techniques, the secret of these virtues began to be pierced. Within this framework of research that is situated the objective of our work.

For this purpose, after optimization of the best solvents of extraction, our interest concerned the sulfur and phenolic compounds of the garlic, the major constituents of the extract and the most endowed of the therapeutic effects. Once the study of the thermal stability of the bioactive compounds of the garlic, allicin, finalized polyphenols and flavonoids, our interest focused on the antioxidant activity described by three methods of antioxidant dosages namely: DPPH, ABTS and RP.

Afterward, we began successively the study of the hepatoprotective, the hypoglycemic and the antibacterial properties. The obtained results are promising in particular that relating to the studies of the correlations between the therapeutic effects and the antioxidant activity of the garlic compounds.

At the end of this work, we established a neuronal model that could be applied to the determination of the C.M.I without resorting to experiments. This work, with regard to the obtained results, offers us numerous and interesting perspectives research.

Key words: garlic extract, Polyphenols, Flavonoids, Antioxidants, Hepatoprotective, Hypoglycemic, Antibacterial