

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

LASSAL Fatima

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Biotechnologie et Valorisation des plantes

THÈME

**Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de
l'ail (*Allium sativum*. L)**

Soutenue publiquement le /09/2020

DEVANT LE JURY

Président	M. NEBBACHE.S	Grade MCB	U. Mostaganem
Encadreur	Mr. BEKADA.A	Grade Professeur	C.U. Tissemsilt
Examineur	M. TAHRI.M	Grade MCB	U. Mostaganem

2019/2020

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le bon Dieu le tout Puissant de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail, également je remercie infiniment mes parents, qui m'ont encouragé et aidé à arriver à ce stade.

Un grand merci pour mon encadreur Pr.BEKADA Ahmed, pour son temps, ses efforts, ses encouragements et ses corrections dès le début de ce travail. Il m'a laissé la liberté de faire mes propres choix.

Merci à toute l'équipe pédagogique et administrative du département de biologie de l'Université d'Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem sous la direction de notre chef de département DrkADEM Habib.

Et un remerciement spécial à tous nos enseignants qui nous ont accompagnés, orientés et guidés au long de notre parcours universitaire.

Et à la fin je veux dire merci aux membres du jury de m'avoir honoré d'accepter à jeter un coup d'œil sur mon travail afin de l'examiner et l'évaluer je suis très reconnaissante.

Sans oublier tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail de près ou de loin.

Dédicace

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans le soutien de celle qui a tout sacrifié pour que je termine mes études et me voir réussir ; la seule personne qui mérite toute ma gratitude, Ma mère que Dieu te préserve et te procure la santé et une longue vie.

A ma source de force et mes efforts à ceux qui sont toujours présents pour moi inconditionnellement ma sœur Hanene et mes frères Mohamed, Abed Elkader, fathi et Ayoub bien que cette dédicace ne puisse jamais exprimer ma gratitude.

À tous mes enseignants, mes amis, mes collègues et à ceux qui m'ont aidé de près ou de loin

Résumé

Aujourd'hui, il existe un intérêt croissant pour les productions biologiques et écoresponsables ainsi que les techniques alternatives aux produits chimiques. L'ail (*Allium sativum* L.) est de plus en plus mis en avant pour ses propriétés antimicrobiennes notamment grâce à la présence d'allicine. Ainsi, cette étude a pour objectif de déterminer l'effet inhibiteur des huiles essentielles d'ail obtenu par hydro-distillation sur la croissance de 03 souches bactérienne d'origine clinique appartenant à l'espèce de *Pseudomonas aeruginosa*. Les tests microbiologiques ont été réalisés in vitro sur des boîtes de pétri. Les résultats montrent que les huiles essentielles obtenues par hydro-distillation aux concentrations testées (la plus élevée 1500 µg/ml) ont exercé un effet antibactérien moyen avec des diamètres de zones d'inhibition qui varient de 09 à 11 mm à l'encontre des souches testées de *P. aeruginosa*.

MOTS CLES: allicine, *Allium sativum* L., antimicrobien, hydro-distillation, macération

Abstract

Nowaday, it exists an increasing interest in biological and eco-friendly products as well as alternatives to chemical product. Garlic (*Allium sativum* L.) is more and more valued for its antimicrobial properties thanks to allicine. Thus, a study was conducted to determine the garlic extracts' inhibiting effect, obtained from different extraction method, on the microorganisms' growth. These extracts were tested on microorganisms such as bacteria (*Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Listeria innocua*), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and moist. The extraction's methods were steam distilation, hot maceration (1h at boiling temperature) and cold maceration (24h at room temperature). The microbiological tests were conducted in vitro in petri dish. Results showed that only the cold maceration allowed to obtain a product with antimicrobial effects. Products obtained with steam distilation and hot maceration showed no significant results.

KEY WORDS: allicin, *Allium sativum* L., antimicrobiobial, steam distillation, maceration

ملخص

اليوم، هناك اهتمام متزايد بالإنتاج العضوي والمسؤول عن البيئة وكذلك التقنيات البديلة للمواد الكيميائية. يتم تسليط الضوء بشكل متزايد على الثوم (الأليومساتيفوم L.) لخصائصه المضادة للميكروبات، خاصة بفضل وجود الأليسين. وهكذا تم إجراء دراسة بهدف تحديد التأثير المثبط لمستخلص الثوم المتحصل عليه من عدة طرق استخلاص على نمو الكائنات الحية الدقيقة. تم اختبار هذه المستخلصات على البكتيريا (*Escherichiacoli* ، *huringiensis Bacillust* ، *Listeriainnocua*)، الخمائر (*saccharomycescerevisiae*) والقوالب.

الطرق المستخدمة للحصول على مستخلصات الثوم هي التقطير المائي، النقع الساخن (ساعة عند نقطة الغليان) والنقع البارد (24 ساعة عند درجة الحرارة صباحا). أجريت الاختبارات الميكروبيولوجية في المختبر على أطباق بتري. أظهرت النتائج أن النقع البارد فقط هو الذي يجعل من الممكن الحصول على منتج له تأثيرات مضادة للميكروبات، ولا تظهر أي نتائج معنوية للمنتجات التي يتم الحصول عليها عن طريق التقطير المائي والنقع الساخن.

الكلمات المفتاحية:

الليسين، أليومساتيفوم L، مضاد للميكروبات، التقطير المائي، النقع.

SOMMAIRE

Liste des tableaux

Liste des figures

Abréviation

Introduction.....1

Bibliographique

1. Généralités sur les hiles essentielles

1. Définition.....2

1.2. Classification.....2

1.3. Caractéristiques des huiles essentielles.....2

1.4. Biosynthèse.....3

1.5. Localisation et lieu de synthèse.....7

1.6. Rôle physiologique.....8

1.7. Facteur de variabilité.....8

1.8. Méthode d'extraction.....8

1.8.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....9

1.8.1.1. Hydrodistillation simple.....9

1.8.1.2. Entraînement à la vapeur sèche.....9

1.8.1.3. Hydrodiffusion.....10

1.8.2. Extraction par expression.....10

1.9. Activités biologique et mode d'action.....	11
1.9.1. Activité antimicrobienne.....	11
1.9.2. Activité antioxydante.....	11
1.9.3. Activité diverses.....	12

2. Allium sativum

2. Allium sativum.....	13
2.1. Description d'alliumsativum.....	13
2.2. Etymologie (nom et traductions).....	14
2.3. Classification	14
2.4. Culture.....	14
2.5. Production mondiale.....	15
2.6. Usage traditionnelle.....	16
2.7. Etudes antérieures sur A.sativum.....	17
2.8. Composition biochimique d'A.sativum.....	18

Matériel et méthodes

1. Matériel.....	20
1.1. Matériel biologique.....	20
1.1.1. Bulbes d'Allium sativum.....	20
1.1.2. Souches bactériennes.....	20
2. Méthodes.....	20
2.1. Analyse chimique	20

2.1.1. Extraction.....	20
2.1.1.1. Préparation du matériel végétal.....	20
2.1.1.2. Hydrodistillation.....	21
2.1.1.3. Séparation des deux phases.....	21
2.1.2. Calcul du rendement.....	21
2.2. Analyse microbiologiques.....	22
2.2.1. Provenance des souches.....	22
2.2.2. Vérification de la pureté des souches	22
2.2.2.1. Etude microscopique.....	22
2.2.2.1.2. Examen après coloration de Gram.....	22
2.2.2.2. Etude des caractères cultureux.....	22
2.2.3. Identification biochimiques des souches.....	22
2.2.3.1. Recherche de l'enzyme respiratoire (Oxydase).....	22
2.2.3.1.1. Principe.....	22
2.2.3.1.2. Mode opératoire.....	23
2.2.3.2. Mise en évidence de la production des pigments spécifiques.....	23
2.2.3.2.1. Principe.....	23
2.2.3.2.2. Mode opératoire.....	23
2.2.4. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.....	24
2.2.4.1. Méthode de diffusion en disque : l'aromatogramme.....	24
2.2.4.1.1. Principe.....	24
2.2.4.1.2. Mode opératoire.....	24

2.2.4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution.....	25
2.2.4.2.1. Principe.....	25
2.2.4.2.2. Mode opératoire.....	25
2.2.4.2.2.1. Méthode de dilution en milieu liquide.....	25
2.2.4.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	25
Résultats.....	28
Discussion.....	33
Conclusion.....	35
Références bibliographiques	

Liste des abréviations

ADH : Arginine déshydrogénase

ATB: Antibiotique

ATP: Adénosine triphosphate

CHU: Centre hospitalo-universitaire

CMB: Concentration minimale bactéricide

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CoA: Coenzyme A

DO: Densité optique

FPP: Farnesyl diphosphate

GLU: Glucose

GPP: Geranyl diphosphate

IPP: Diphosphate d'isoprène

NCCLS: National committee for clinical laboratory standards

Subsp: Sous espèce

UFC: Nombre de colonies formant des unités

URE: Urée

UV: Ultra-violet

V/V: volume par volume

Liste des tableaux

Tableau 01: Classification d'Allium sativum

Tableau 02: Production d'ail en tonnes durant les années 2012 et 2013 (**FAOSTAT**).

Tableau 03 : Composition de l'ail frais

Tableau 04: Situation géographique de la récolte

Tableau 05: Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielle d'Allium sativum

Tableau 06: Valeurs des CMI de l'huile essentielle (en $\mu\text{g/ml}$)

Liste des figures

Figure 01: Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle(IPP).

Figure 02: Biosynthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes.

Figure 03: Glande simple entièrement chargée d'huile essentielle.

Figure 04: Poiles épidermiques sur le calice d'une fleur d'un origan.

Figure 05: Montage à hydrodistillation simple.

Figure 06: L'*Allium sativum*.

Figure 07: Les différentes variétés de l'*A. sativum* classer selon la couleur. (a Blanc, b violet, c Rouge, d Rose)

Figure 08: Préparation de matériel végétal.

Figure 09: Transformation de l'alliine en allicine.

Figure 10: Aspect microscopique de *P.aeruginosa* après coloration de Gram.

Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies de *P.aeruginosa* sur gélose nutritive.

Figure 12: Aspect macroscopique des colonies de *P.aeruginosa* sur gélose au cétrimide.

Figure 13: Pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle d'*Allium sativum* vis-à-vis des souches de *P.aeruginosa*

Introduction

La mauvaise utilisation des produits chimiques de synthèse en agriculture, en particulier les fongicides, ont conduit au développement de résistances par les pathogènes des plantes à ces derniers, les rendant inefficaces (**Osman et Al-Rehaiyani, 2003**). Le besoin en système de protection des cultures permettant de réduire la dépendance aux pesticides synthétiques peut alors prendre de l'importance. Parallèlement, il existe aujourd'hui un intérêt croissant pour les productions biologiques et éco-responsables ainsi que les techniques alternatives aux fongicides synthétiques traditionnels (**Sealyet al., 2007**). Ainsi, les extraits de plantes comme fongicides naturels commencent à être utilisés en agriculture. Parmi eux se trouve l'ail, ou *Allium sativum* L., qui est un aliment produit et consommé dans la plupart des régions du monde. La production mondiale s'élève à 23 milliards de tonnes dont 18 millions en France (représente 0,1 % de la production mondiale contre 80 % en Chine). Ce légume a fait le sujet d'une littérature abondante concernant ses propriétés anti-microbiennes tant pour l'Homme que pour les plantes. Il a été démontré que l'extrait d'ail était efficace pour inhiber le développement de champignons (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, ...) ainsi que des bactéries pathogènes pour l'Homme (*Enterobacter faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*) et pour les plantes (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*).

De plus, aujourd'hui deux critères de qualité sont mis en avant au niveau de la distribution : le calibre et l'aspect. En effet, aujourd'hui les consommateurs privilégient l'aspect visuel lors de leur acte d'achat. Pour l'ail, la couleur est très importante et est l'un des premiers critères de sélection, il faut une couleur "neige" sans tâches. Or c'est loin d'être toujours le cas (l'ail blanc français est reconnu pour être irrégulier, aléatoire et variable) et cela peut entraîner un taux de rebuts important (**Cavardet Vernin, 2016**). Cet ail voué à être perdu pourrait être recyclé et servir de bio-pesticide naturel.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet inhibiteur de croissance d'extraits d'ail obtenues par différentes méthodes d'extraction (Hydro-distillation, macération à chaud et macération à froid) avec de l'eau déminéralisée sur des souches de bactéries Gram-négatives (*Escherichia coli*) et Gram-positives (*Bacillus thuringiensis*, *Listeria innocua*), sur des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ainsi que des moisissures.

1. Généralités sur les huiles essentielles

1.1. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverse partie des végétaux. Elles sont concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur.

Actuellement, leurs utilisations en parfumerie et en alimentation est considérables c'est pour cette raison que l'organisme de normalisation AFNOR NF et 150 ont donné une définition plus précise des huiles essentielles ; ces dernières sont des produits obtenus à partir d'une hydro distillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (AFNOR.,1992).

1.2. Classification

Selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens et grâce à l'indice aromatique obtenu par des aromatogramme, les huiles essentielles sont classées en groupes.

- Les huiles majeures.
- Les huiles médiums.
- Les huiles terrains.

1.3. Caractéristiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles aident à traiter les petites indispositions de la vie de tous les jours. Outre leur action curative, elles opèrent de manière préventive en stimulant le système immunitaire afin que votre organisme lutte plus efficacement contre les infections bactériennes et virales.

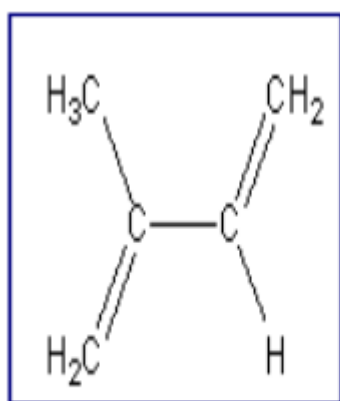
Parmi les propriétés les plus connues, on citera la propriété antiseptique. A l'heure où les germes microbiens deviennent de plus en plus résistants, ce qui implique pour l'industrie pharmaceutique de trouver des antibiotiques de plus en plus puissants (mais aussi de plus en plus destructeurs de la flore saprophyte responsable de notre immunité), les huiles essentielles offrent une véritable alternative (Botton., 1999)

1.4. Biosynthèse

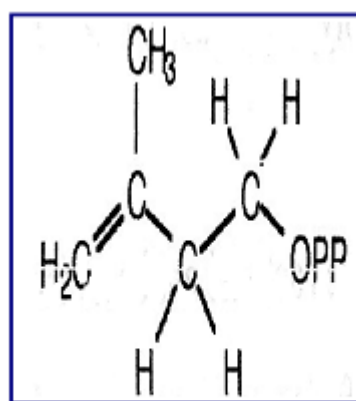
Etant donné que les terpènes sont les constituants caractéristiques et importants de la plupart des huiles essentielles, pour cette raison nous allons nous limiter à l'étude de la biosynthèse de ce groupe chimique (**Francois, 2002**).

Les terpènes constituent une famille de composé largement répandus dans le règne végétale, dans le cas des huiles essentielles seront rencontrés seuls les terpènes les plus volatils c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée tels que les monoterpènes et les sesquiterpènes qui peuvent exister soit sous forme d'hydrocarbures de formule brute $(C_5H_8)_n$ soit sous forme de dérivés oxygénés de ces hydrocarbures appelés: les terpénoïdes incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des cétones, des phénols et des oxydes(**Bruneton, 1999**).

La structure chimique des terpènes représente une particularité importante qui est la présence par Wllah dès 1887 (**Wallach, 1887**). Cet isoprène est à la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée en 1953 par Ruzicka(**Ruzicka, 1953**) et complétée par Lynen et al.,(**1958**), cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif comme le véritable précurseur de la molécule terpénique d'où le nom d'isoprénoïde sous lequel il peut également désigner.



Isoprène



Diphosphate d'isopentényle (IPP)

La première étape de la synthèse de la molécule d'IPP consiste en la condensation de deux molécules d'acétyle CoA pour former de l'acétoacétylCoA, cette réaction est d'abord catalysée par une acétoacétylCoA thiolase couplée à une Fe(2)quinone, puis l'HMG CoA synthase catalyse la fixation d'une troisième molécule d'acétyle CoA qui donne le B-

hydroxy-B-méthylglutaconyl coenzyme A (HMG CoA)puis, la réduction de la fonction acide(engagée dans une liaison thioester) en alcool est catalysée par l'HMG CoA réductase et donne l'acide mévalonique.

Un groupement diphosphate va ensuite être fixé sur la fonction alcool primaire de l'acide mévalonique, le mévalonte 5-diphosphate ainsi formé va réagir avec une troisième molécule d'ATP; cette réaction fournit un composé instable qui se décompose spontanément en perdant la fonction alcool tertiaire et le groupement carbonyle libre conduisant à la formation de l'IPP qui est la forme biologiquement active de la molécule isoprénique(**Lamarti et al., 1994; Rahal, 2004**).

La figure 01 montre les principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (IPP).

La biosynthèse des terpènes implique l'addition de l'unité isoprène (IPP) avec son isomère pour former le geranyldiphosphat (GPP: C10) qui est le précurseur de tous les monoterpènes, le GPP vas se condenser avec une autre unité IPP pour former le disphosphate de farnesyl (EPP: C15) qui est à l'origine des sesquiterpènes (**Dubey et al.,2003**).

La figure 02 montre la biosynthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes.

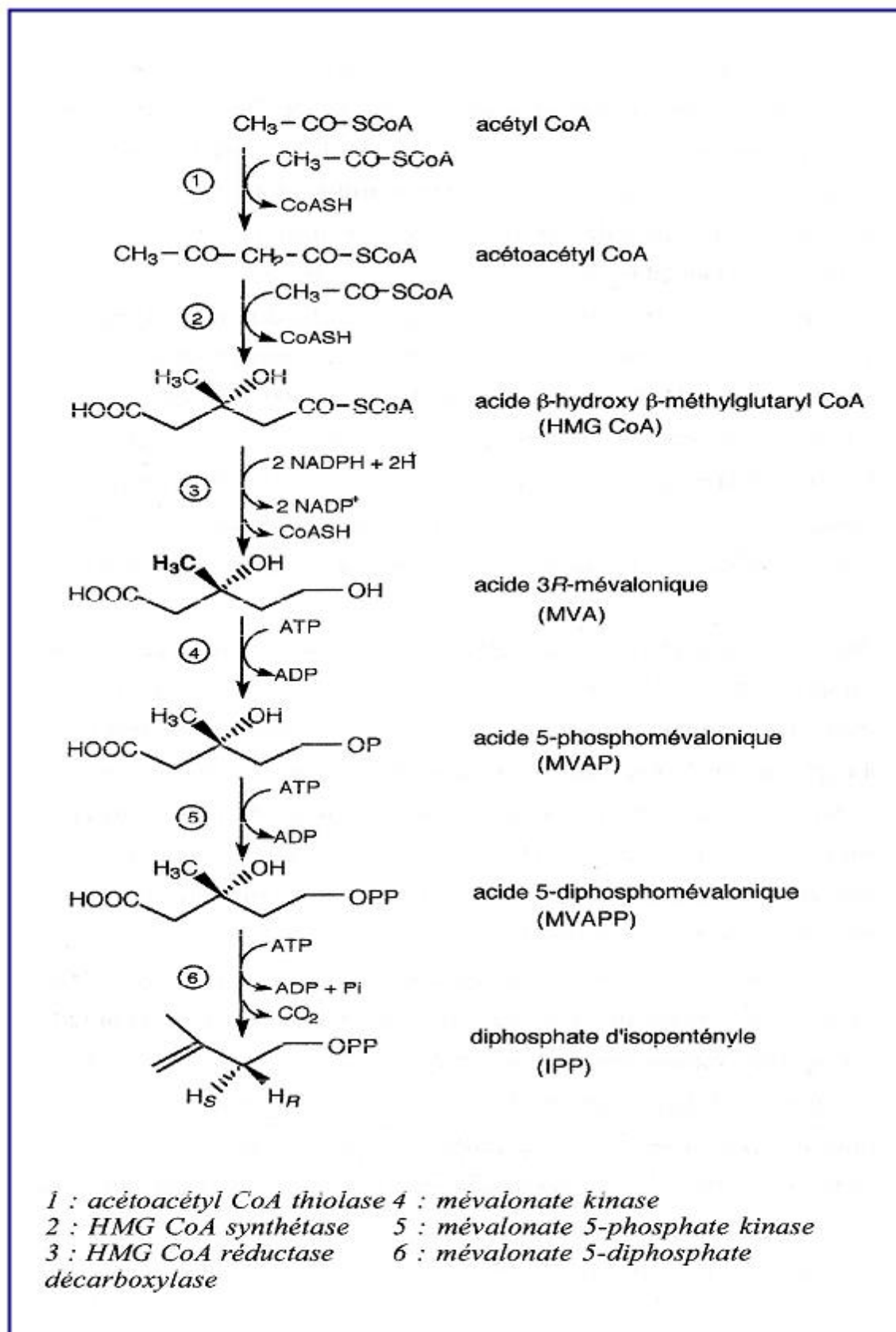


Figure 01: Principales étapes de la biosynthèse du diphosphate d'isopentényle (IPP).

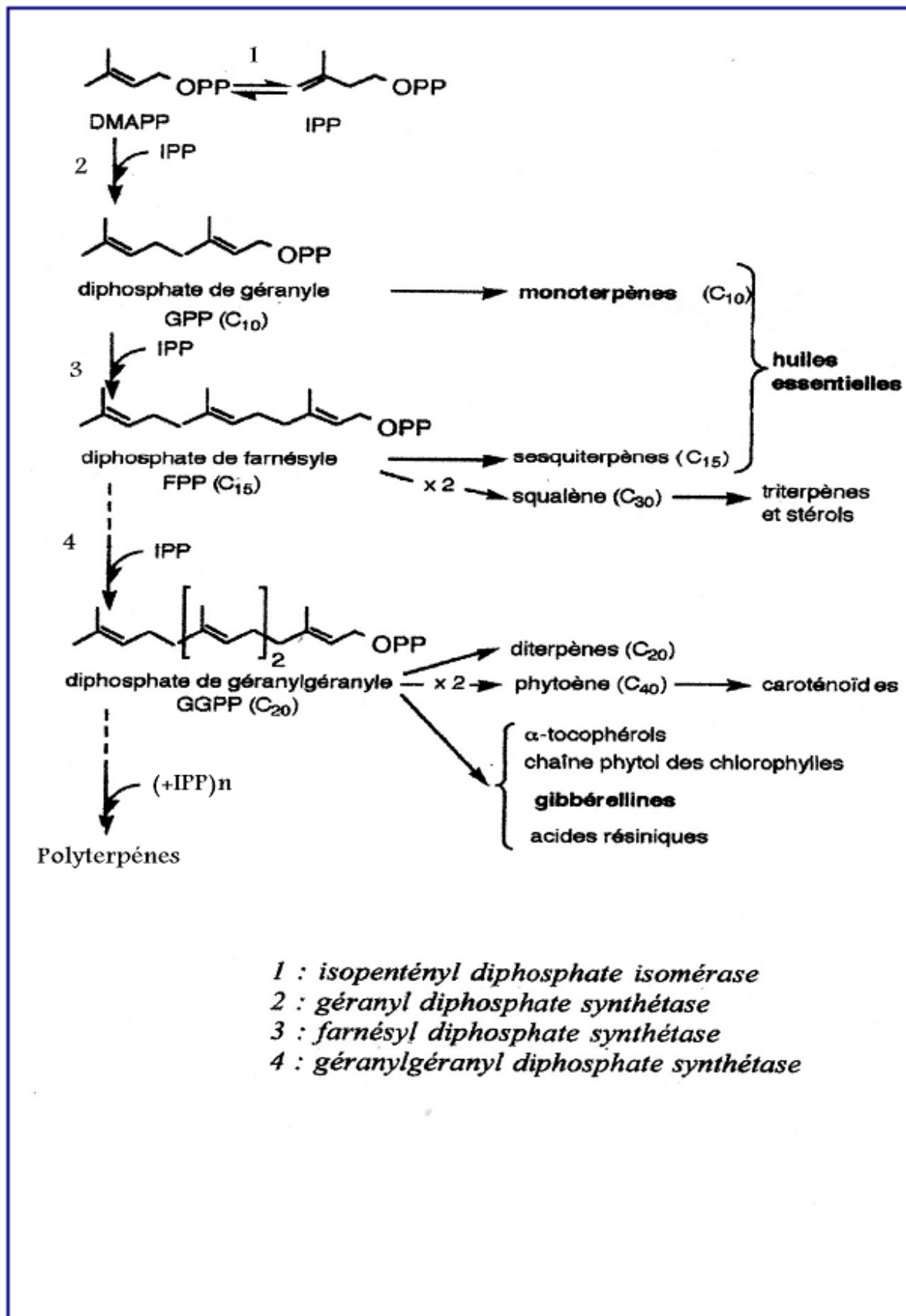


Figure 02: Biosynthèse de différentes classes terpéniques chez les plantes

1.5. Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs dont tous les organes végétaux des plantes aromatiques peuvent les contenir:

- Les fleurs: l'oranger, le rose et la lavande.
- Les feuilles très souvent: l'eucalyptus, la menthe et le thym.
- Les organes souterrains: les racines (vétiver) et les rhizomes (gingembre, acore).
- Les fruits: le fenouil, l'anis et l'épicarpe des citrus.
- Les graines: la noix de muscade.
- Le bois et les écorces: la cannelle, le santal et le bois de rose (**Hurtel, 2006**).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologiques spécialisées appelées: les glandes des huiles essentielles qui sont souvent localisées sur ou à proximité de la plante(**Sharma et al.,2003**). Les figures 03 et 04 représentent des glandes sécrétrices des huiles essentielles. Il existe trois types de structure sécrétrice dans la plante:

- Les poils sécréteurs des Lamiaceae.
- Les poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae.
- Les canaux sécréteurs des Apiaceae ou des astéraceae(**Bruneton,1999;Hurtel, 2006**).

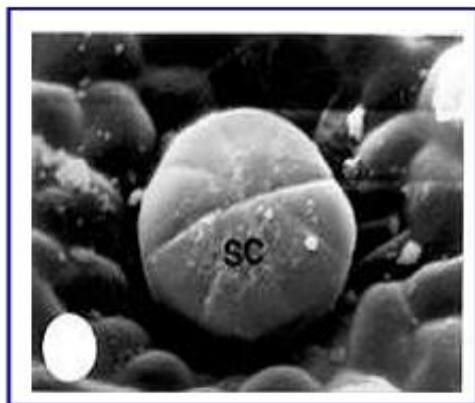


Figure 3:Glande simple entièrement chargée d'huile essentielle
(SelonSharma et al., 2003)



Figure 4:Poiles épidermique sur le calice d'une fleur d'un organ

1.6. Rôle physiologique

Beaucoup de plante produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (**Rai et al., 2003**).

Il y a beaucoup de spéculation au sujet du rôle des huiles essentielles certainement plusieurs effets utiles ont été décrits tels que:

- La réduction de la compétition des autres espèces des plantes (Allélopathie) par l'inhibition chimique de la germination des graines.
- La protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par le goût et effet défavorables sur le système nerveux.
- Certains auteurs pensent que la plante utilise les huiles essentielles pour repousser ou attirer les insectes dans ce dernier cas pour favoriser la pollinisation (**Porter, 2001; Hurter, 2006**).

1.7. Facteurs de variabilité

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions tels que: l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage et la contamination par des parasites, des virus et des mauvaises herbes. C'est ainsi que l'action des huiles essentielles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (**Smallfield, 2003; Svoboda et Hampson, 1999**).

1.8. Méthode d'extraction (Sousa et al., 2002; Padma, 2004; Willem, 2004; Semen et Hiziroglu, 2005)

Parmi les divers procédés d'extraction des huiles essentielles deux seulement sont admis par la pharmacopée française ainsi que par l'A.F.N.O.R et l'I.S.O:

- L'extraction par entraînement à la vapeur
- L'extraction par expression (pressage)

1.8.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation et entraînement à la vapeur d'eau, trois variantes sont possibles selon la texture et fragilité de la matière première à traiter.

1.8.1.1. Hydrodistillation simple

C'est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles. La plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles se séparent de l'eau par différence de densité.

La figure 05 montre le montage à hydrodistillation simple.

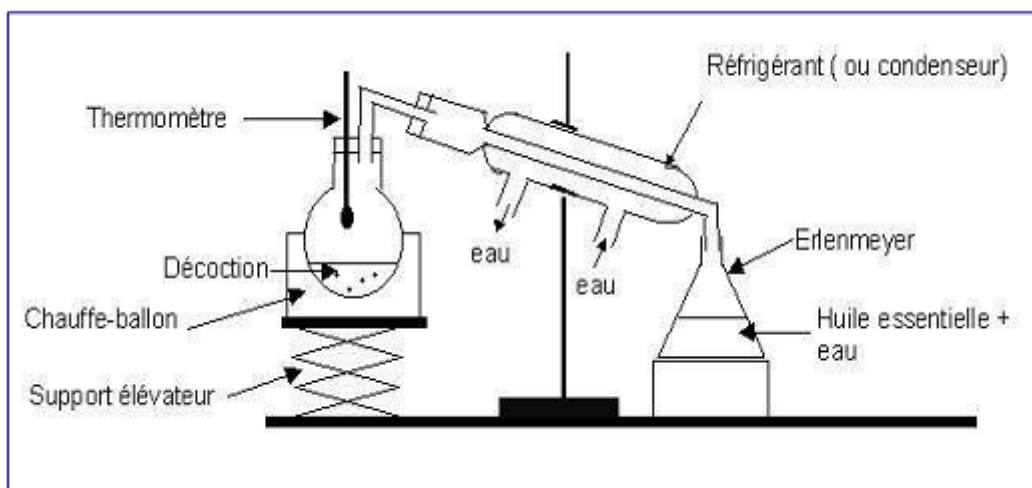


Figure 05: Montage à hydrodistillation simple

1.8.1.2. Entraînement à la vapeur sèche

Pour éviter les phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur sèche a été mis au point. La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur sèche d'eau est pulsée, les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent, les composés d'huile volatils entraînés par la vapeur d'eau vont pouvoir être séparés par décantation du distillat refroidi.

1.8.1.3. Hydrodiffusion

Elle consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétal. La composition des produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes.

1.8.2. Extraction par expression

C'est une technique simple où le matériel végétal est pressé mécaniquement à froid pour extraire son huile essentielle, cette méthode est essentiellement utilisée pour recueillir les huiles essentielles des épicarpes de citrus (citrons, orange, mandarines et pamplemousses).

Autres procédés

D'autres procédés sont utilisés le plus souvent pour les plantes délicates qui ne supportent pas la chaleur:

- **Enfleurage**

Cette méthode consiste à mettre le matériel végétal en contact à la température ambiante avec un corps gras (saintoux) qui se sature en essence au bout de quelques jours. La pommade obtenue est épuisée par l'alcool absolu (dans lequel les corps gras sont très peu solubles), l'alcool est ensuite évaporé sous vide.

- **Extraction par solvants volatils**

Cette méthode consiste à dissoudre l'huile essentielle dans un solvant non miscible avec l'eau où se trouve le matériel végétal et à séparer la phase organique contenant l'huile recherchée de la phase aqueuse. Le solvant est ensuite évaporé.

- **Extraction au CO₂ supercritique**

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé, il s'agit du CO₂ en phase supercritique, à l'état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide ni gazeux et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction modulable à volonté en jouant sur la température et la pression de mise en œuvre. Les avantages de ce procédé c'est qu'à la fin de l'extraction l'abaissement de la pression provoque le passage du gaz carbonique à l'état gazeux et le CO₂ s'élimine tout seul de l'extrait.

Ces trois dernières techniques permettent d'obtenir des extraits de plantes qui théoriquement ne s'appellent plus huiles essentielles bien que très proches du point de vue chimique; ce sont les essences concrètes, les résinoïdes et absolues, ces dernières sont des produits d'extraction des concrètes et des résinoïdes par l'alcool éthylique, la solution éthanolique est filtrée puis distillée, le résidu c'est l'absolu (**Hurtel, 2006**).

1.9. Activités biologique et mode d'action

Les différents composants des huiles essentielles couvrent un spectre d'action extrêmement large.

1.9.1. Activité antimicrobienne

La majorité des huiles essentielles ont un spectre d'action très large dont leurs terpènes ou terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires.

Les huiles essentielles exercent son pouvoir antimicrobien par:

- Leur interférence avec la bicouche lipidique de la membrane de la cellule grâce à leur propriété hydrophobe ce qui entraîne une perturbation de la cellule (**Brut, 2004; Cowan, 1999**).

En plus cette réaction varie en fonction de la bicouche lipidique ce qui explique la résistance des bactéries à la Gram négatif (**Mahmoud et al., 2004**).

- Destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux (**Cowan, 1999; Mahmoud et al., 2004**).
- Inactivation et destruction du matériel génétique du micro-organisme (**Liolioset al., 2009; Mahmoud et al., 2004**).

1.9.2. Activité antioxydante

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques, ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu phénol (**Biljana et al., 2008**).

1.9.3. Activité diverses

Les huiles essentielles agissent par le biais de leur fraction lipophile en réagissant avec les lipides de la membrane cellulaires et en conséquence de modifier l'activité des canaux ioniques de calcium. À certain niveau de concentration, les huiles essentielles saturent les membranes et montre des effets similaires à ceux des anesthésiques locaux. Elles peuvent interagir aussi avec les membranes cellulaires par le biais de leurs propriétés physicochimique et leurs formes moléculaires en influençant l'activité des: enzymes, transporteurs, canaux ioniques et des récepteurs conduisant à un très large éventail des activités biologiques tels que: activité anti-spasmodiques, sédatrice, anti-inflammatoire, myorelaxant, immunomodulateur, antidépresseur, stimulant le système nerveux centrale et hypothermique (Smallfield, 2003).

2. Allium sativum

Allium sativum(A. sativum) est la plante sélectionnée pour cette étude «Etude comparative de la cinétique du séchage de l'ail par micro-onde et par étuve» (figure 05).

C'est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses vertus médicinales. Elle est communément appelée ail localement appelée toum ou bien teskart(**Beloued,2001**).

2.1. Description d'Allium sativum

Allium sativum est une espèce de plante potagère, vivace et monocotylédone. Les bulbes ont une odeur et un goût fort (**GergesGeaga, 2015**), ils forment des caëux, qui ne dépassent 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 vertes vives sont longues, toutes droites, effilées et rondes, comme celle de la ciboulette (**Callery, 1998**).

L'ail s'adapte à tous les climats, mais, il donne les meilleures récoltes dans les pays tempérés (**Cavagnaro et al, 2007**).



Figure 6: Allium sativum. L(**Callery, 1998**)

2.2. Etymologie (Nom et traductions)

Ail (*Allium sativum* L.) du celtique all qui veut dire: chaud, brulant. Garlic de l'Anglo-saxon «gar-leac» ou «spear plant» qui veut dire plante en forme de lance pointue (**Harris et al., 2001**).

Latin botanique: *Allium sativum* L.; Français: Ail, la rose des plantes... et dans d'autres langues: Galic, Ajo, aglio, alho....

2.3. Classification

La classification taxonomique d'*A. sativum* comme suite (tableau I) (**Anonyme**)

Tableau 01: La classification d'*Allium sativum*

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta
Sous-embranchement	Angiosperm
Classe	Liliopsida
Ordre	Liliales
Famille	Alliaceae
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>Allium sativum</i>

2.4. Culture

La culture de l'ail est pratiquée dans les régions tempérées et subtropicales du monde entier. Sa multiplication se fait à partir des caïeux. Ces derniers doivent être à peine recouverts de terre, environ 3 centimètres, lors de la plantation (**Arvy et Gallouin, 2003**).

La classification traditionnelle de l'ail est distinguée par les cultivars selon des critères morpho-physiologique en fonction de leurs périodes de végétation et de la couleur de la tunique du bulbe et des bulbilles (**touiletal., 2015**).

L'*A. sativum* est subdivisée en deux groupes, selon la capacité ou non de développer une hampe florale, et en plusieurs variétés qui diffèrent par la taille et la forme du bulbe ainsi que par la couleur de leurs enveloppes (**Arvy et Gallouin, 2003**).

L'ail violet (figure 7.b) et l'ail blanc (figure 7.a) doivent être plantés avant décembre (pour les variétés d'hivers). L'ail rose (figure 7.d) et l'ail rouge (figure 7.c) sont de préférence plantés au printemps (variétés de printemps).

Cette plante préfère un sol assez ferme en profondeur, mais bien ameubli en surface, frais et drainé, riche en limon, en argile et en calcium, le sol ne doit pas comporter du fumier frais ou du compost insuffisamment décomposé; le **ph** favorable est au voisinage de 6,5(Arvy et Gallouin, 2003).

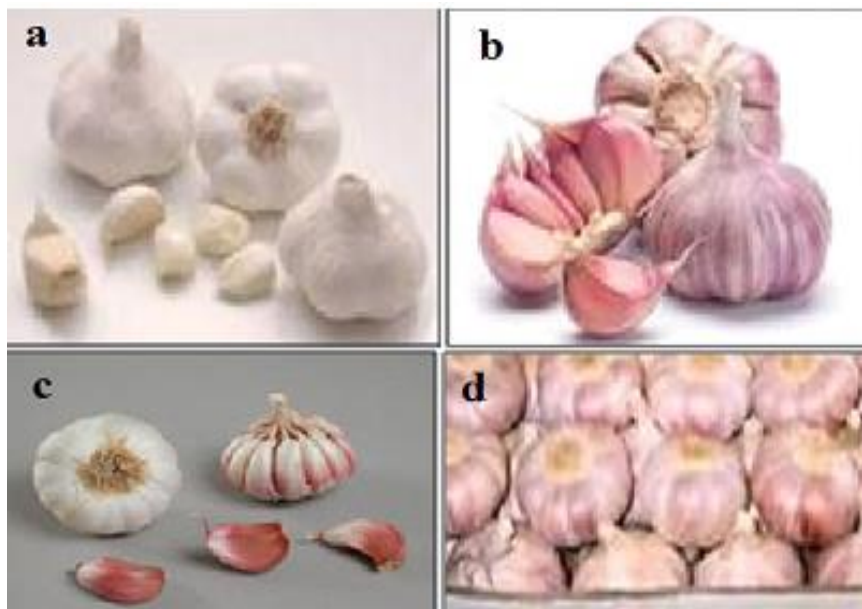


Figure 7: Les différentes variétés de l'A. sativum classées selon la couleur. (a) Blanc, (b) violet, (c) Rouge, (d) Rose)

2.5. Production mondiale

La production d'ail dans le monde est représentée dans le tableau suivant:

Tableau 02: Production d'ail en tonnes durant les années 2012 et 2013 (FAOSTAT).

Production en tonnes chiffres 2012-2013				
Donnée de FAOSTAT (FAO)				
	2012		2013	
Chine	18 429 500	79%	19 168 800	79%
Inde	1 228 000	5%	1 259 000	5%
Corée du sud	339 113	1%	412 250	2%
Égypte	309 155	1%	234 164	1%
Russie	239 312	1%	232 843	1%
Bangladesh	233 609	1%	224 000	1%
Birmanie	213 000	1%	212 000	1%
Ethiopie	222 548	1%	170 000	1%
Etat unis	195 910	1%	175 445	1%
Ukraine	171 400	1%	185 600	1%
Autres pays	1 848 314	8%	1 981 200	8%
Le monde	23 429 862	100%	24 255 303	100%

2.6. Usage traditionnelle

L'A. Sativum est largement utilisé en cuisine, cette plante est placé dans la même catégorie que les oignons, les poireaux et les échalotes. L'ail est utilisé comme épice ou condiment, il est commercialisé sous différentes formes tel que la formes poudre, jus, ou bien sous forme d'huile (Teuscheret al., 2005).

L'origine de l'ail se perd dans les méandres de l'histoire, il est lié à la mythologie, la religion l'histoire de nombreux pays. On suppose qu'il est natif de l'Asie centrale ou d'Inde du nord, il est connu chez eux depuis des siècles pour ces vertus médicinales. Les sumériens l'ont cultivé depuis plus de 5000 ans. En Amérique centrale, les Mayas l'utilisent contre les parasite intestinaux, par application de cataplasme sur le ventre (Harris et al., 2001). En Egypte ancienne, ils l'ont utilisé comme fortifiant pour prévenir certaines infections (Teuscher et al., 2005).

On la retrouvé aussi, dans la tombe de Toutankhamon (**Song et al.,2007**) et dans les mythologies gréco-romaines (Légende et Toison d'or, l'Odyssée, chant X...). Ces derniers lui ont attribué un pouvoir fortifiant et l'ont donné à manger pour leurs soldats en compagnie. Cette plante est consommée en grandes quantités chez les athlètes grecs pour ces propriétés de vasodilatation et de broncho-dilatation, qui a un intérêt évident d'améliorer les performances sportives(**Harris et al.,2001**).

Selon Pline l'ancien « il neutralise tous les venins, guérit la lèpre, l'asthme, la toux »,donc il a été utilisé contre la peste, le choléra, le typhus, la fièvre typhoïde, les gripes et autre épidémies avec l'efficacité que l'on devine, aussi il a été prescrit comme stimulant de l'appétit et de la digestion et aussi comme diurétique. D'ailleurs, l'huile essentielle de caïeux est réputée pour lutter contre l'infection pulmonaire. Pour l'usage externe, cette huile permet de désinfecter les plaies et de favoriser leurs cicatrisations (**Arvy et Gallouin, 2003**). L'A. sativum a été considérée comme la «thérapie du pauvre», capable de soigner tous les maux, à bien peu de frais (**Teuscher et al., 2005**). Cette plante miraculeuse a apparié même dans le saint coran pour ses vertus médicinales (**Younos et bellakhdar, 1993**).

En usage externe, il était utilisé comme rubéfiant et antiseptique. Actuellement, il est considéré dans les thérapeutiques douces comme antiseptique local, bactéricide et vermifuge...et des extraits de bulbes de l'ail (élusanes) sont commercialisés sous forme de gélules.

2.7. Etudes antérieures sur A.sativum

Dans but de valider l'utilisation traditionnelle d'A.sativum, quelques études ont été conduites sur cette plante. Bozin et ses collaborateurs (2008) ont montré les propriétés anti-oxydantes des polyphénols extraient d'A.sativum en utilisant des tests in vitro tel que le DPPH (α , α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)et la peroxydation lipidique. Ces résultats ont été confirmé par l'étude de Metwally,(2009), cette dernière, a montré que l'utilisation de l'ail sous la forme naturelle , poudre ou huile permet d'augmenter le taux de croissance, diminue le taux de mortalité et augmente l'activité anti-oxydante chez les poissons. Par ailleurs, les travaux de **Sheela et Augusti (1992)** ont montré que l'ail a diminué significativement les lipides et le glucose dans le sang et l'activité de plusieurs enzymes tel que la phosphatase alcaline, le lactate déshydrogénase et la glucose-6- phosphatase. Cette étude a aussi révélée que l'ail Augmente l'activité de HMG CoA réductase dans le foie et les intestins et les hexokinase du

foie. Ce qui leurs avaient permis de suggérer que cette plante possède un effet antidiabétique. En outre, l'activité anti-bactérienne et anti-fongique des extraits d'*A. sativum* a été évaluée par l'étude de Benkeblia, (2004) et les résultats ont révélé que ses huiles essentielles ont fortement inhibé l'activité des souches bactériennes et fongiques.

Une autre recherche de Wargovich, (1986) a montré que le diallylsulfide, un composé aromatique de *A. sativum*, inhibe le diméthylhydrazine qui induit le cancer du côlon ; ce résultat lui a permis de suggérer que l'ail peut prévenir le cancer.

En outre, il a été aussi rapporté que l'ail peut prévenir le cancer, il est un antibiotique, antimicrobienne, anti-hypertensive, hypoglycémiant et diminue le taux du cholestérol (Cantwell, 2000).

2.8. Composition biochimique d'*A. sativum*

Les activités biologiques de cette plante sont essentiellement dues à leur composition en métabolites secondaires. Quelques études se sont intéressées à la séparation et l'identification des composés actifs présents dans l'ail. Le principal composé organosulfuré de l'ail est l'alliine, ce dernier se transforme en allicine sous l'influence de l'alliinase, une enzyme libérée lors de la rupture des cellules quand les caïeux sont hachés ou coupés.

L'allicine est un composé volatile responsable à la fois des propriétés aromatiques et biotiques de l'ail (Arvy et Gallouin, 2003), principalement, ses vertus antiseptiques, grâce à son efficacité contre différentes bactéries.

La composition chimique de l'*A. sativum* frais est présentée dans le tableau suivant
(tableau 03)

Tableau 03 : Composition de l'ail frais (Mandez Lagunas, 2007).

Composés	Mg/g m.h
Eau	620-680
Carbuhidrates	260-300
Fructosanes	220-250
Fibres	15
Protéines	15-21
Acides aminés	10-15
Composants organosulfurés	11-35
B-Sitostérol	0,015
Adénosine	0,1
Saponine	0,4-1,1
Vitamines	0,15
Minéraux	7
Sulfure	2,3-3,7
Azote	6-13
Lipides	1-2
Acide phénoliques	0,8
m.h / matière humide	

En se basant sur la littérature, l'A. sativum peut être considéré comme une source de phytochimique, car elle est largement utilisée en médecine traditionnelle et ses activités Biologiques ont été confirmées par plusieurs études antérieures.

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Bulbes d'*Allium sativum*

L'étude a porté sur les bulbes d'*Allium sativum* récoltés dans la région Achacha (wilaya de Mostaganem).

1.1.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes à tester sont représentées par:

- 03 souches de *P. aeruginosa* d'origine clinique.
- 01 souche de référence de *P. aeruginosa* ATCC 27853 fournie par l'institut Pasteur d'Alger.

2. Méthodes

2.1. Analyse chimique

2.1.1. Extraction

A partir des bulbes d'*Allium sativum* nous avons extrait l'huile essentielle par la méthode d'hydrodistillation. L'extraction a été effectuée au niveau du Laboratoire de Chimie Analytique au Département de Biologie à l'Université AbdElhamid Ibn Badis Mostaganem.

2.1.1.1. Préparation du matériel végétal

Avant l'hydro-distillation, le matériel végétal a été macéré dans de l'eau distillé (250g de bulbes d'ail ont été coupés en petits morceaux puis homogénéisés dans de l'eau distillée et laissés durant une heure en macération. La décomposition de l'allicine est à l'origine de la naissance des sulfides volatils: les dérivés de 21 propényl (allyl). La macération permet de transformer l'alliine constituant major de l'ail frais en allicine précurseur de l'huile essentielle selon la réaction:

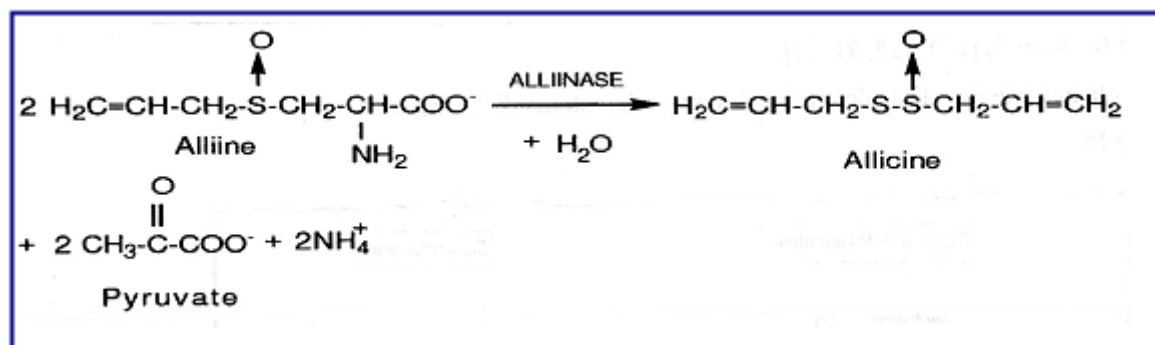


Figure 09: Transformation de l'alliine en allicine.

2.1.1.2. Hydrodistillation

Après la macération, l'homogénat est porté à l'ébullition pendant 2 à 3 heures dans l'hydrodistillateur. Sous l'action de la chaleur, les cellules sécrétrices de l'huile essentielle éclatent et libèrent des composés organiques volatils. La vapeur d'eau formée va entraîner avec elle les composés organiques à l'état gazeux vers le réfrigérant où ils vont se condenser et chutent dans une bécasse. L'eau et l'huile essentielle se séparent par différence de densité en deux phases, une phase organique contenant la majorité des huiles essentielles et une phase aqueuse.

L'huile essentielle est séparée de l'eau aromatique par décantation, puis séchée par le sulfate de magnésium anhydre et conservée à 4°C sous l'abri de la lumière jusqu'à son usage.

2.1.2. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport de la quantité d'huile recueillie après hydrodistillation sur la quantité de la plante utilisée exprimé en pourcentage.

Le rendement est calculé par la formule suivante:

$$R = B / A \cdot 100$$

R:rendement de l'huile essentielle en %

B:quantité de l'huile essentielle en g

A:quantité de la plante en g

2.2. Analyse microbiologiques

2.2.2. Vérification de l'identité des souches

A partir du milieu de conservation, un isolement des souches a été effectué sur gélose au cétrimide dans un but de la vérification de leur pureté, l'incubation a été réalisée à 30°C pendant 18 à 24 h ensuite ont été effectués :

2.2.2.1. Etude microscopique

2.2.2.1.1. Examen après coloration de Gram

Elle est basée sur la différence de perméabilité des bactéries à l'alcool donc sur leur capacité à retenir dans leur cytoplasme le premier colorant qui est le violet de gentiane. La différence de perméabilité liée à la différence de structure chimique des parois cellulaire entre les bactéries à Gram négatif et bactéries à Gram positif; celles qui retiennent le violet de gentiane après l'action de l'alcool sont dites à Gram positif, celles qui sont décolorées et prennent la couleur du deuxième colorant la fuschine sont dites à Gram négatif.

2.2.2.1.2. Etude des caractères cultureux

Les caractères cultureux qui ont été étudiés sur la gélose au cétrimide et sur la gélose nutritive sont:

- Aspect des colonies (la taille, la transparence, la consistance et l'élévation de la colonie).
- Mise en évidence de la pigmentation

2.2.3. Identification biochimique

- Recherche de l'oxydase (enzyme respiratoire)
- Production des pigments caractéristiques des Pseudomonas

2.2.3.1. Recherche de l'oxydase

2.2.3.1.1. Principe

L'oxydase est une enzyme qui intervient dans la chaîne respiratoire des bactéries aérobies.

Le test d'oxydase permet de mettre en évidence la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

2.2.3.1.2. Mode opératoire

- On dépose sur une lame porte objet propre un disque d'oxydase "ox" et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile, puis on prélève une colonie à partir d'une culture jeune à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et on l'étale sur le disque. Une coloration violet foncé puis noire apparaît immédiatement ou en quelques secondes.

Le test est négatif si la couleur n'a pas viré au violet dans les 10 secondes.

2.2.3.2. Production des pigments spécifiques

2.2.3.2.1. Principe

Les milieux King A et B sont utilisés afin de différencier les espèces du genre *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pigments caractéristiques.

- **Recherche du pyoverdine**

Le milieu King B favorise la synthèse du pigment jaune vert fluorescent " la pyoverdine". Cette dernière va colorer le milieu en vert fluorescent. Le sulfate de magnésium sert à activer la production de la pyoverdine.

- **Recherche du pyocyanine** Le milieu King A favorise la production de pyocyanine en présence de certains acides aminés et des ions inorganiques.

La pyoverdine de *P. aeruginosa* peut être produite en faibles quantités sur le milieu King A et le mélange de pyocyanine et pyoverdine conduit à l'obtention d'une couleur verte. L'adjonction de chloroforme dans le milieu permettra alors de révéler spécifiquement la pyocyanine.

2.2.3.2.2. Mode opératoire

- On inocule un tube de milieu King A et un tube de milieu King B en faisant une strie médiane à la surface de la gélose inclinée, puis on remet la capsule de chaque tube sans la revisser et on incube pendant 72 heures à 30°C.

Lecture

- **Le milieu King A**

Les cultures sont colorées en bleu vert, en cas de doute, prélever à la pipette pasteurstérile l'eau de condensation puis verser 0.5 ml de chloroforme sur la culture, laisser pendant 10 à 15 minute en position inclinée.

La pyocyanine est soluble dans le chloroforme.

- **Le milieu King B**

La pyoverdine sur ce milieu se manifeste par une coloration verte-fluorescente visible à l'œil nu. L'examen des tubes sous une lampe émettant une lumière UV à la longueur d'onde de 365nm permet de vérifier la production du pigment fluorescent en comparaison avec un tube témoin non ensemencé.

Les tubes doivent être conservés pendant 2 à 3 semaines avant de pouvoir conclure que la production de pyoverdine est négative.

2.2.4. Test de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

Dans notre travail l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Allium sativum* in à l'encontre des 03 souches de *P.aeruginosa* a été estimée selon deux techniques:

2.2.4.1. Méthode de diffusion en disque : l'aromatogramme

2.2.4.1.1. Principe

L'aromatogramme est une technique permettant de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de papier buvard imprégné d'huile essentielle.

2.2.4.1.2. Mode opératoire

Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture de 18h dans le bouillon nutritif par une première dilution dont son opacité doit être équivalente à 0.5 MacFarland puis une deuxième dilution de 1/100 pour avoir 10^6 cfu/ml.

Préparation de la solution mère de l'huile essentielle

Dans un flacon stérile contenant un volume bien déterminé d'eau distillée stérile nous avons ajouté une quantité mesurée de l'huile essentielle afin d'obtenir une concentration égale à 1500 µg/ml.

Ensemencement

- Le milieu Mueller-Hinton est fondu et refroidi à 45°C, coulé en boîte de pétri sur une épaisseur de 0.4mm.
- Après solidification, la surface de la gélose est ensemencée par écouvillonnage avec l'inoculum.
- Un disque de papier Wathman de 6mm de diamètre stérile imprégné de la solution mère est placé à la surface de la boîte de pétri, un disque imprégné d'eau distillée stérile a été placé pour servir de témoin.
- Incubation à 30° C pendant 18 à 24 h.

Lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition exprimée en mm.

2.2.4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution

2.2.4.2.1. Principe

Le principe de la méthode consiste à diluer l'huile essentielle dans un milieu de culture liquide et à inoculer ce milieu avec les souches bactériennes à tester.

Préparation de la gamme de concentration de l'huile essentielle

Une gamme de concentration de l'huile essentielle a été préparée à partir de la solution mère soit 1500, 1000, 500 et 250 µg/ml.

2.2.4.2.2.1. Méthode de dilution en milieu liquide

Les concentrations finales sont obtenues après addition dans les tubes à essais de 1ml de chaque dilution de l'huile essentielle et de 9ml de l'inoculum à 10^6 UFC /ml. Dans chaque

tube, une quantité de 0.15% d'agar est additionnée. Parallèlement, deux tubes témoins, l'un avec de l'éthanol et l'autre sans éthanol ont été préparés. Les tubes sont ensuite incubés à 30°C pendant 18 à 24h.

Lecture

La CMI est la concentration de l'huile essentielle du premier tube qui ne montre aucune croissance (trouble) visible à l'œil nu.

2.2.4.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'agent antibactérien pouvant détruire 99.9% de l'inoculum bactérien.

Un volume de 0.1 ml de tous les tubes où il y'a absence de turbidité est ensemencé sur milieu gélosé et incubé à 30°C pendant 18h à 24h. La concentration minimale bactéricide est donc la plus petite concentration de l'huile essentielle pour la quelle le dénombrement bactérien est inférieur à 10^2 UFC/ml.

1. Résultats

1.1 Calcul du rendement

L'hydrodistillation des bulbes d'*Allium sativum* provenant de la région d'Achâacha de la wilaya de Mostaganem a donné un rendement en huile essentielle égal à 0.1%. On déduit que les essais portés sur nos échantillons ont présenté un rendement faible en huile essentielle.

1.2. Mesure de la densité

La valeur de la densité mesurée est de l'ordre 1.029. Cela a donc facilité sa séparation par décantation après l'étape d'extraction par hydro-distillation.

1.3. Résultats de l'analyse microbiologique

1.3.1. Étude microscopique

1.3.1.1. Examen après coloration de Gram

Après coloration de Gram l'observation microscopique a révélé la présence de bacilles colorés en rose donc à Gram négatif, isolés et quelquefois associés en diplobacilles (Figure 10).

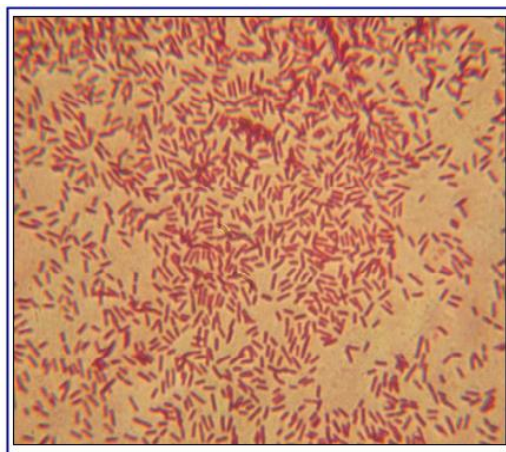


Figure 10 :Aspect microscopique de *P.aeruginosa* après coloration de Gram

2.2. Caractères cultureux

2.2.1. Sur gélose nutritive

Les colonies des souches de *P.aeruginosa* ont présenté une coloration verte et dégagent une odeur caractéristique de la pyocyanine.

Les colonies sont de taille moyenne, rondes, lisses, bombées et à contour régulier.

2.2.2. Sur gélose au cétrimide

Les colonies des souches de *P.aeruginosa* ont présenté une coloration verte fluorescente (Figures 11 et 12).



Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies de *P.aeruginosa* sur gélose nutritive



Figure 12: Aspect macroscopique des colonies de *P.aeruginosa* sur gélose au cétrimide

2.3. Identification biochimique

2.3.1. Recherche de l'oxydase

Le test d'oxydase des souches étudiées a montré l'apparition d'une coloration violet foncé, on conclut ainsi que les souches testées sont oxydase positif.

2.3.2. Mise en évidence de la pigmentation

Le résultat de ce test est caractérisé par l'apparition d'une couleur bleue sur le milieu King A caractéristique de la présence de pyocyanine et une couleur jaune-verte fluorescent sur le milieu King B indiquant la présence de pyoverdine.

2.4 . Résultat de l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

2.4.1. Méthode de diffusion en disque

Les diamètres des zones d'inhibition des 03 souches de *P.aeruginosa* obtenus sous l'effet de la solution mère de l'huile essentielle soit une concentration de l'ordre de 1500 µg/ml sont présentés dans le tableau 05 ci-dessous.

Tableau 05: Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielle d'*Allium sativum* à la concentration de 1500 µg/ml (solution mère)

Souches testées	Zone d'inhibition (mm)		
	Tétracycline	Huile essentielle	Eau distillée stérile
Souche1 <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	16.5	10.2	0
Souche 2<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	17.3	9.1	0
Souche 3<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	18.2	10,3	0

D'après les résultats du tableau, on remarque que l'huile essentielle d'*Allium sativum* a présenté une activité antibactérienne vis-à-vis des 03 souches testées de *P. aeruginosa* avec des diamètres d'inhibition moyens situés entre 9mm et 11mm (figure 13).

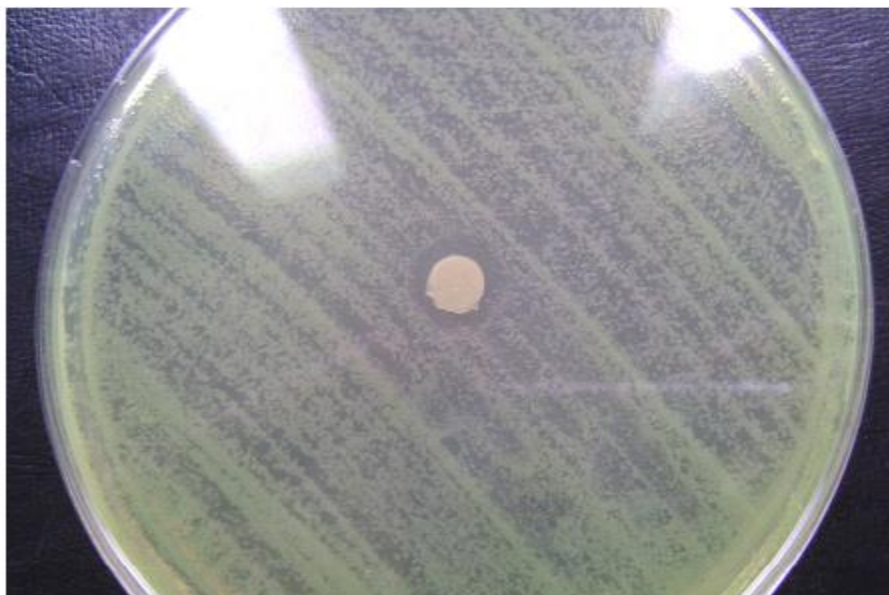


Figure 13: Zone d'inhibition de la souche 01 de *Pseudomonas aeruginosa*

2.4.2. Détermination de la CMI par la méthode de dilution

Les résultats des tests réalisés par la technique de diffusion en disque a permis de confirmer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle vis-à-vis des 03 souches de *P. aeruginosa*.

L'estimation quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile par la détermination de la CMI a été réalisée selon la méthode de dilution en milieu liquide (tableau 06).

Tableau 06: Valeurs des CMI de l'huile essentielle (en µg/ml)

Souches testées	CMI (µg/ml)
Souche 1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500
Souche 2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500
Souche 3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500

Nous pouvons déduire selon les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne par la technique de dilution que notre huile essentielle issue des bulbes d'*Allium sativum* exerce une certaine activité antibactérienne vis-à-vis des 03 souches testées de *P.aeruginosa* avec des CMI relativement moyennes estimés 500µg/ml.

2.4.3. Détermination de la CMB

La comparaison des dénombrements bactériens effectuée après incubation a permis de déterminer un nombre supérieur à 10^2 UFC/ml dans toutes les boîtes ce qui correspond à un nombre supérieur à 0.01% du nombre initial des bactéries ce qui signifie que cette huile possède une action bactériostatique et non bactéricide.

Discussion

La lutte contre les infections bactériennes repose principalement sur l'usage des antibiotiques le plus souvent de manière abusive entraîne la sélection de souches bactériennes multirésistantes d'où l'intérêt de se pencher sur les plantes médicinales considérées comme une source de molécules bioactives à activité antibactérienne pour lutter contre phénomène d'apparition des résistances. L'usage d'extraits de plantes contenant des constituants bio-actifs est devenu une approche très importante dans le traitement des maladies infectieuses. C'est ainsi que de nombreux travaux ont été rapporté sur le potentiel thérapeutique de l'ail (*Allium sativum*) qui est l'une des plantes utilisée dans la médecine pour ses propriétés médicinales. L'huile essentielle d'*Allium sativum* constitue l'extrait le plus connu par son pouvoir antibactérien dû particulièrement aux composés soufrés (**Camille, 1998**).

C'est ainsi dans le cadre de la valorisation de l'ail (*Allium sativum*) que nous avons choisi de tester l'huile essentielle de cette plante afin d'estimer son pouvoir antibactérien vis-à-vis de certaines souches de *P. aeruginosa* réputée pour sa présence dans le milieu hospitalier comme agent potentiel des infections nosocomiales et donc son pouvoir de résister aux traitements d'antibiothérapie prodigués aux patients hospitalisés.

Dans cette étude, l'huile essentielle utilisée a été extraite à partir des bulbes d'*Allium sativum* par la méthode d'hydrodistillation. Le rendement en huile essentielle obtenu de 0.1% est considéré comme assez faible comparé à celui obtenu par Benkeblia, (1998) estimé à 0.2%. La mesure de la densité sur l'huile essentielle obtenue est estimée à 1.029, une valeur qui se rapproche de celle rapportée par **Ross et al., (2001)** avec une valeur de l'ordre de 1.037.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Allium sativum* par la méthode de diffusion en disque a s'est révélée plus ou moins efficace vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa*. Les zones d'inhibition enregistrées n'étant pas trop importants seraient liées aux concentrations des huiles essentielles testées ne dépassant pas la concentration de 1500 µg/ml.

Dans une étude rapportée par **Bouhdid et al., (2006)**, les essais de l'activité de l'huile essentielle de plantes médicinales telles que *Thymus satureioides*, *Thymus Vulgaris* et

Corydothymuscapitatusn'ont montré que peu d'effet sur la croissance des souches de P.aeruginosa.

Dans la présente étude la détermination de la CMI de l'huile essentielle vis-à-vis des 03 souches de P.aeruginosa qui ont montré une zone d'inhibition par la méthode de dilution en milieu liquide a donné des CMI de l'ordre de 500 µg/ml. Ces résultats sont loin de ceux rapportés par **Tsao et Yin, (2001)**, ayant testé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Allium sativum* sur des souches de P.aeruginosa et dont les CMI obtenues étaient de l'ordre de 16µg/ml et 64µg/ml. La valeur de la CMI dépend des conditions opératoires lors des analyses parmi les quelles la quantité de l'émulsifiant utilisée qui peut réduire le contact entre l'huile essentielle et la bactérie à tester.

Par ailleurs tout comme les huiles essentielles de la famille des *Allium*, celles de l'ail peuvent être des conservateurs des aliments comme cela été démontré par **Abdel-Salam et al., (2014)**. La stabilité des huiles essentielles et donc leur activité inhibitrice dans des conditions naturel de stockage est légèrement influencée, c'est la raison pour la quelle, elles sont utilisées comme un conservateur alimentaire naturels et efficaces (**Kim et al., 2003**).

CONCLUSION

L'ail (*Allium sativum* L.) est l'une des plus anciennes plantes cultivées, utilisé à la fois pour des applications alimentaires et médicinales. En fait, cette plante commune est une riche source de plusieurs phytonutriments également utilisés dans le traitement et la prévention de nombreuses maladies.

L'activité antibicrobienne des huiles essentielles de l'ail rapportée dans cette étude a montré que globalement, les souches de *P. aeruginosa* étaient plus ou moins sensibles à l'huile d'ail. Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de l'ail ont été particulièrement attribuées aux sulfures d'alc(en)yl dérivés des sulfoxydes de S-alk(en)yl-L-cystéine.

Grace à leur composition et propriétés physico-chimiques (stabilité, pH, teneur en phénol et en composés soufrés), les HE d'ail peuvent être utilisées comme conservateurs alimentaires et comme antimicrobiens en cas d'infection par des germes microbiens, ainsi que dans la lutte contre certaines maladies cardiovasculaires.

Il est déconseillé de cuire l'ail au préalable afin de ne pas dénaturer l'alliinase qui est essentielle pour obtenir l'allicine. Une autre façon d'obtenir un bio-pesticide serait l'extraction par macération à froid dans l'eau déminéralisée.

Référence Bibliographiques

- AFNOR.** (1992). Recueils des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris.
- Adetumbi M.A., Lau B.H.S.,** (1983). Antifungal effect of *Allium sativum* (garlic). Abs. Ann. Mtg. Am. Soc. Microbiol., 12 : 227-237.
- Ankri S., Mirelman D.,** (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection, 2 : 125-129.
- Arvy, M.P. et Gallouin, F.** (2003). Epices aromates et condiments. Paris: Belin. P: 24-30.
- Beloued A.** (2001). Plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} éd. Alger: Office des publications universitaires. P : 24-25.
- **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.
- **Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S., McAnalley B.** (2003). Etude pilotée ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. Glycoscience and Nutrition; 4(6): P7.
- Bruneton J.** (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – Techniques et documentations, 3^{ème} Edition, Lavoisier.
- **Burt S.** (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in Foods. A review intern. J of Food Microbiology; 94: 223-253.
- Callery, E.** (1998). Le grand livre des herbes : un guide pratique de la culture et des vertus de plus de 50 plantes. France :Konemann. P : 55-56.
- Cantwell, M. I.** (2000). Alliin in garlic. Perishables Handling Q, 102: 5-6.
- **Cavagnaro, P. F., Camargo, A., Galmarini, C. R., & Simon, P. W.** (2007). Effect of cooking on garlic (*Allium sativum* L.) antiplatelet activity and thiosulfinate content. Journal of agricultural and food chemistry, 55(4) : 1280-1288.

Références bibliographiques

- Cavard-Vibert P., Vernin X.**, (2016), Analyse du marché et perception la distribution de l'ail, Etat des lieux de la filière ail française- facteurs de compétitivité et organisation, Les études économiques, Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (CTIFL).
- **Cowan M.M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*; 12(4): 564-582.
- Dubey V.S., Bhalla R., Luthra R.** (2003). An overview of the non-mevalonate Pathway for terpenoid biosynthesis in plants.*J.Biosci*; 28(5): 637-646.
- F.A.O.** (2013). Food and Alimentation Organisation.Site FAO-STAT
<http://faostat3.fao.org/home/F>
- François X.G.** (2002). Le matériel végétal et les huiles essentielles. LASEVE-UQAC.P5-6.
- GergesGeaga, A.** (2015). Les Bienfaits de l'Ail sur la Santé. *HUMAN & HEALTH*.31:46 47.
- Harris, J.C.; Cottrell, S. L. ; Plummer, S. et Lloyd, D.** (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic).*Applied Microbiology and Biotechnology*.57: 282-286.
- **Hurtel J-M.** (2004). L'AIL: *Allium sativum*, Liliaceae. *Plantes et Médecine*.
- Hassan H.T.**, (2004). Ajoene (natural garlic compound) : a new anti-leukaemia agent for AML therapy. *Leuk. Res*, 28 : 67-671.
- Lamarti A., Badoc A., Deffieux J., Carde P.** (1994). Biogenèse des monoterpènes. II-La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*; 133: 79 -99.
- **Liolios C.C., Gortzi O., Lalas S., Tsaknis J., Chinou I.** (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*; 112: 77-83.

Références bibliographiques

- Lynen F., Eggerer H., Henning U., Kessel I.** (1958). Farnesylpyrophosphat und 3-Methyl- Δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene. III. - Angew. Chem; 70, 738-742.
- **Mahmoud B.S.M., Yamasaki K., Miyashita K., Il-Shik S., Dong-suk C., Suzuki T.** (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its Shelf-life extension by essential oil compounds. Food Microbiology; 21: 657-666.
- Mandez Lagunas, L.** (2007). L'effet des conditions variables de séchage sur la cinétique de séchage et la qualité de l'ail. Thèse de Doctorat en science et technologie des aliments pour
- Osman K.A., Al-Rehiyani S.,** (2003). Risk of pesticide to human and the environment. Saudi J. Biol. Sci., 10 : 81-106
- **Padma S Vankar.** (2004). Essential Oils and Fragrances from Natural Sources. P31-34.
- **Porter N.** (2001). Essential oils and their production. Corp AND Food Research. N°39.
- Rahal S.** (2004). Chimie des produits naturels et des êtres vivants. Office des Publications universitaires. P13.
- **Rai M.K., Acharya D., Wadegaonkar L.** (2003). Plant derived- antimycotics: Potential of Asteraceous plants, in: plant-derived antimycotics. Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, London, Oxford. 165-185.
- Ruzicka L.** (1953). The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. Experientia; 9: 357-396.
- Sealy R., Evans M., Rothrock C.,** (2007). The effect of a garlic extract and root substrate on soilborne fungal pathogens. Hort Technology, April-June, vol.17, no.2, 169-173
- **Semen E., Hiziroglu S.** (2005). Production, Yield and Derivatives of Volatile Oils from Eastern Redcedar (*Juniperus Virginiana* L.). American Journal of Environmental Sciences; 1 (2): 133-138.

Références bibliographiques

- **Sharma S., Sangwan N.S., Sangwan R.S.** (2003). Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current science*; 84 (4-25): 544-558.
- **Smallfield B.** (.2003). Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Corp and Food Research*. N°45.P4.
- **Song, S. I., Cheong, J. J., & Choi, Y. D.** (2007). Onion, garlic and related species. In *Transgenic Crops IV* (pp. 415-433). Springer Berlin Heidelberg.
- **Sousa EMBD., Chiavone –Filho O., Moreno MT., Silva DN., Marques M.O.M., Meireles MAA.** (2002). Experimental Results for extraction of essential oil from *Lippiasidoidescham*. Using pressurised carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*; 19(02): 229-241.
- **Stefanovits-Banyai E., Tulok M.H., Hegedus A., Renner C., Varga I.S.** (2003). Antioxydant effect of various rosemary (*Rosmarinusofficinalis L.*) clones. *ActaBiologicaSZegediensis*; 47(1-4): 111-113.
- **Svoboda K.P., Hampson J.B.** (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperature aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK. KA65HW.
- **Teuscher, E. ; Anton, R. et Lobstien, A.** (2005). *Plantes aromatique ; Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed. Paris : Tec & Doc. Page : 522.
- **Touil, A., Litaïem, J., & Zagrouba, F.** (2015). Isothermes de sorption et propriétés thermodynamique de l'*Allium sativum*. *Journal of the Tunisian Chemical Society*, 17: 105-114.
- **Wildman REC.** (2001). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. CRC Press Ed.
- **WILLEM J.P.** (2004). *Les huiles essentielles, médecine d'avenir*. P318.
- **Younos, C. et Bellakhdar, J.** (1993). *Diététique en médecine arabo-persane. Médicament et aliments : l'approche ethno pharmacologique*. pp : 53-57.