

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE  
DEPARTEMENT DE GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



## Mémoire de Fin d'Etude

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME  
D'INGENIEUR D'ETAT EN GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

# ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE D'EXTRAITS VEGETAUX

Présenté par **Benzegane Yanal** et **Teffahi Manel** devant le jury:

Présidente:	Mme Boutekedjiret C.	Professeur	ENP
Examineur :	Mr. Namane A.	Maitre de conférences	ENP
Promotrice :	Mme Boubechiche Z.	Maitre assistante A	ENSSMAL
Co-promotrice :	Mme Hellal A.	Professeur	ENP

**Promotion : juin 2013**



# REMERCIEMENTS

*Nous remercions tout d'abord **ALLAH** qui nous a donné la santé et la volonté pour terminer et réaliser ce travail.*

*Tous nos remerciements chaleureux à notre promotrice **M<sup>me</sup>** **BOUBECHICHE Z.** maitre assistante **A** à **ENSSMAL** et notre co-promotrice **M<sup>me</sup> HELAL A.** Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger qui nous ont guidées à réaliser ce travail par leur Suivi, leur orientation et leur disponibilité.*

*On exprime notre gratitude à la Présidente du jury **Mme BOUTEKEDJIRET C.** Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger pour ces conseils, son aide et son soutien ainsi qu'à **Mr NAMANE A.** Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Polytechnique pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Il nous est agréable aussi de remercier infiniment notre encadreur durant le stage pratique **Mr ZIDOUR M.** qui a contribué au succès de ce projet par ses précieux conseils et encouragements.*

*Et sans oublier bien sûr, on tient à remercier chaleureusement tous nos amis à l'école nationale polytechnique pour leurs prières et soutiens durant la période de préparation de ce projet.*

*Enfin, pour n'oublier personne, nous profitons de l'occasion afin de remercier tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce projet.*

# Dédicace

*On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Les cinq ans d'étude m'ont permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple. Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.*

*Je dédie tout d'abord ce modeste travail de la mémoire à mon **père** et ma grande mère Que **ALLAH** les accueillent dans son vaste paradis.*

*Je le dédie particulièrement à ma très chère **maman** et mon oncle **Mokrane** pour tous leurs sacrifices afin de me permettre de poursuivre mes études dans les meilleures conditions possibles et n'avoir jamais cessé de m'encourager tout au long de mes années d'étude.*

*A mes très chers frères et sœurs et plus particulièrement mon jumeau frère et ami **Abdessabour** et ma charmante sœur **Soulef**.*

*A toute la **famille** grands et petits pour leur soutien et leurs encouragements.*

*A mes meilleurs amies **FARIDA, SAMIRA, SABRINA** que j'aime beaucoup, ainsi que tous mes autres amies sans exception chacune par son nom.*

*A mon binôme **MANEL** qui m'a toujours mis à l'aise par sa présence.*

*A la fin je profite de l'occasion pour dédier ce travail à Tous ceux que j'aime et je respecte.*

*Yanal*

*BENZEÇANE*

*DEDICACE*

*A la mémoire de ma grand-mère « El jouher » que dieu repose son âme en paix*

*A mes parents que dieu protège*

*En témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissant.*

*A mes sœurs*

*Khadija*

*Warda*

*Et A mes frères*

*Omar*

*Zahir*

*Riadhi*

*A Hamid mon fiancé qui m'a toujours encouragé*

*Sans oublié mon binôme Yanal avec qui j'ai passé de très bon moment.*

*A tous mes amis que j'aime beaucoup Ichrèk, Amine, Camilia et Salwa.*

*TAFFAHI Manel*

## Liste des figures

Figure 1 : Ail, ampoule et section transversale d'ampoule.....	2
Figure 2 : Origine et expansion de l'ail.....	4
Figure 3 : Structure du composé de l'Alliine.....	5
Figure 4 : structure du composé Allicine.....	6
Figure 5 : structure des composés de diméthyl disulfure et d'allylmethyl sulfure.....	6
Figure 6: structure des composés diallylsulfure et diallyl disulfure.....	7
Figure 7 : Schéma résumant les étapes du protocole expérimental.....	14
Figure 8 : Dispositif de l'extracteur Soxhlet.....	16
Figure 9 : Dispositif du Rotavapor.....	17
Figure 10 : Dispositif d'extraction en mode Bacth.....	18
Figure 11: Réaction du radical DPPH* avec un antioxydant AH .....	19
Figure 12 :Diffusion radial dans une boite de pétri d'un puits creusé dans la gélose et rempli d'extrait.....	21
Figure 13 : Rendements totaux des extraits avec différents solvants(Extraction en mode batch).....	23
Figure 14 : Rendements totaux des extraits avec différents solvants(Extraction par Soxhlet).....	24
Figure 15 : Comparaison des rendements totaux des extraits des différents solvants par les deux méthodes d'extraction.....	25
Figure 16 : Activité de piégeage du radicale DPPH des extraits éthanoliques et méthanoliques (extraction Soxhlet et macération).....	28
Figure 17: Aspect des cultures et des zones d'inhibitions en présence des extraits d'ail (solvant diethyl-éther).....	29
Figure 18 : Aspect des cultures et des zones d'inhibitions en présence antimicrobienne des extraits d'ail (solvant méthanol).....	29
Figure 19 : Le test de CMI pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
Figure 20: Le test de CMB pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	33
Figure 21 : Activité antifongique des différents extraits d'ail.....	33

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les avantages et les inconvénients des deux procédés d'extraction : Soxhlet et en mode batch.....	13
Tableau 2 : Les caractéristiques physiques des quatre solvants utilisés.....	15
Tableau 3: Les concentrations des composés polyphénoliques pour les deux Méthodes d'extraction.....	26
Tableau 4 : Activité antimicrobienne des extraits d'ail obtenu par les deux procédés d'extraction.....	31

## Liste des abréviations

**M** : Méthanol

**E** : Ethanol

**H** : Hexane

**Di** : Di-éthyle éther

**SM** : Soxhlet-Méthanol

**MM** : Macération-Méthanol

**SE** :Soxhlet-Ethanol

**ME** :Macération-Ethanol

**SH**: Soxhlet-Hexane

**MH**: Macération-Hexane

**SDi** :Soxhlet-Di-éthyle éther

**MDi** :Macération-Di-éthyle éther

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**Mf** : Masse fraîche

**Ms** : Masse sèche

**Teau** : Teneur en eau

**mg/ml** : milligrammes par millilitres

**PCA**:Plat Count Agar

**YMA**:Yeast Malt Agar

**BN** :Bouillon Nutritif

**DPPH** :DiPhenylPicrylHydrazyl

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## **Chapitre I : Partie Bibliographique**

I. Ail ( <i>Allium sativum</i> L.).....	2
I.1. Systématique.....	2
I.2. Dénominations vernaculaires.....	3
I.3. Description .....	3
I.4. Biogéographie et répartition .....	4
I.5. Composition chimique.....	5
I.6. Propriétés et emplois.....	7
II. Les techniques extractives.....	8
II.1. Extraction à froid.....	8
II.2. Extraction à la vapeur d'eau.....	9
II.2. 1. Hydrodistillation.....	9
II.2. 2. Entraînement à la vapeur d'eau.....	9
II.2. 3. Hydrodistillation par micro-onde sous vide.....	10
II.2. 4. Extraction à l'eau surchauffée.....	10
II.2. 5. Extraction-Distillation Simultanée.....	10
II.3. Extraction par le CO <sub>2</sub> à l'état supercritique.....	10
II.4. Extraction au moyen de solvants.....	11
II.4.1. Extraction par solvant volatil.....	11
II.4.1.1. Macération.....	11
II.4.1.2. Extraction par Soxhlet .....	11



## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

II.1. Matériel végétal.....	14
II.2. Méthodes.....	14
II.2.1. Détermination de la teneur en eau (Taux d'humidité).....	14
II.2.2. Techniques d'extraction.....	15
II.2. 2.1. Extraction Soxhlet.....	15
II.2.2.2. Extraction en mode batch (macération).....	17
II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	18
II.2.3.1. Les polyphénols totaux.....	18
II.2.3.2. Méthode de piégeage du radical DPPH.....	19
II.2.3.3. Activité antimicrobienne et antifongique.....	20
II.2.3.3.1. Micro-organismes étudiées.....	20
II.2.3.3.2. Méthodes.....	20
▪ Technique de puits.....	20
▪ La concentration minimale inhibitrice CMI.....	22
▪ Détermination de la CMB.....	22

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

III. Résultats et discussion.....	23
III.1. Teneur en eau.....	23
III.2. Extraction et rendement de la concrète.....	23
III.3. L'activité antioxydante.....	25
III.3.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux.....	25
III.3.2. Activité antioxydante.....	27

III.4. L'activité antimicrobienne.....	29
III.4.1. Détermination des CMI et CMB.....	32
III.4.2. Activité antifongique.....	33
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>35</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>36</b>

# *Introduction*

La décomposition des denrées alimentaires est un problème sérieux en termes de sécurité sanitaire, de valeur nutritive et de perte économique pour l'industrie agroalimentaire. Depuis l'antiquité, les aliments ont toujours été préservés par chauffage, séchage, refroidissement ou fermentation.

Depuis quelques années, les conservateurs alimentaires synthétiques sont devenus largement utilisés et des techniques ont été développées pour augmenter la durée de vie des produits.

Cependant des conservateurs chimiques synthétiques, comme le benzoate, les nitrites et les sulfites posent des problèmes en termes de sécurité et de santé humaine.

La recherche de nouveaux agents antibactériens et antioxydants d'origine naturelle s'oriente alors de plus en plus vers les huiles essentielles ou bien les extraits végétaux.

Les plantes restent la source la plus connue d'agents antimicrobiens. Leur utilisation comme remèdes traditionnels est la plus populaire pour 80 % de la population mondiale. En Asie, Amérique Latine et Afrique, plus de 35000 espèces de plantes sont utilisées à des fins médicinales. [01]

Ces dernières années, les laboratoires pharmaceutiques ont beaucoup investi dans le développement d'extraits de produits naturels à base de plantes pour contrecarrer la résistance des microorganismes pathogènes vis-à-vis d'agents antimicrobiens classiques

A cet effet, nous nous sommes intéressés à étudier une plante connue par sa grande utilisation dans notre société Algérienne, l'ail. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante de cette plante.

Ce travail est composé de deux volets ; le premier sera consacré à l'extraction des extraits par deux procédés en mode batch (macération) et l'extraction par Soxhlet avec différents solvants. Le deuxième volet fera l'objet de l'étude de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits.

# *Chapitre I*

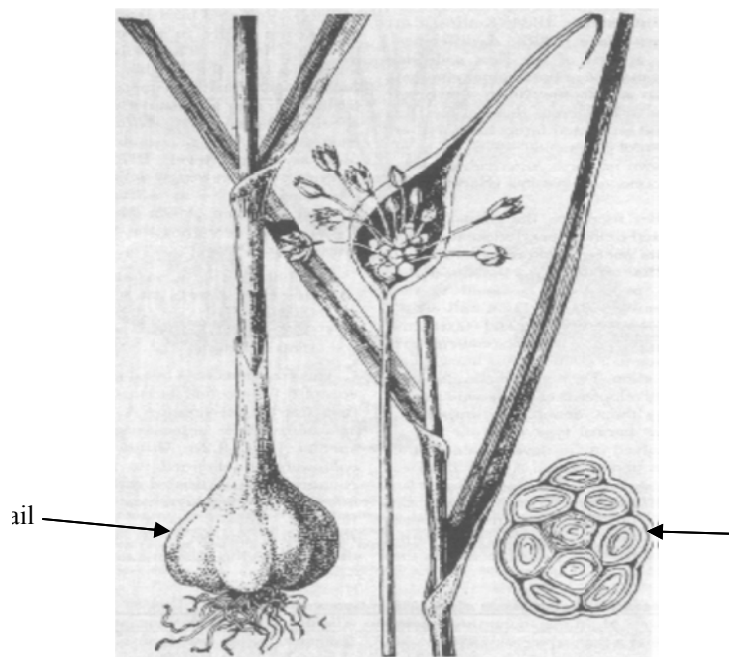
## *Partie bibliographique*

# I. Ail (*Allium sativum* L.)

## I.1.Systématique

Selon Cronquist (1981),[02] la classification de l'ail est la suivante :

Règne	plantea
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Sous-classe	liliidae
Ordre	Liliales
Famille	Liliaceae
Genre	Allium
Espèce	<i>Allium sativum</i> L., 1753



**Figure1 : Ail, ampoule et section transversale d'ampoule [01]**

D'après La **classification APG III** (2009), ou classification phylogénétique, la troisième version de classification botanique des angiospermes établie par l'*Angiosperms Phylogeny Group* (Angiosperm Phology Group III, 2009)[03], Le genre *Allium* appartient à la famille

des Alliaceae ou à celle des Amarylidaceae ,l'ordre est Asparagales et la sous-famille Allioideae.

## **I.2. Dénominations vernaculaires**

- français : ail commun, ail cultivé, thériaque des pauvres ;
- Anglais : garlic, common garlic.
- Arabe : الثوم

## **I.3. Description**

L'Ail, ail commun ou ail cultivé (*Allium sativum*) est une plante herbacée pouvant atteindre 25 à 90 cm de haut et dont la tige est contournée avant la floraison ; elle est vivace par son bulbe formé d'un assemblage de petits bulbes ou caïeux ; ces caïeux sont pressés les uns contre les autres, l'ensemble étant enveloppé dans une mince tunique membraneuse, de couleur variable (blanche, verdâtre, rosée, pourpre, ou violette) [04].

Les feuilles gris-vert à gris bleuté ont un limbe plat, linéaire, étroit et atténué en pointe, renversé et pendant, pourvu d'une nervure médiane bien marquée ; leurs gaines de plus en plus longues et emboîtées les unes dans les autres entourent la tige jusqu'au milieu [04].

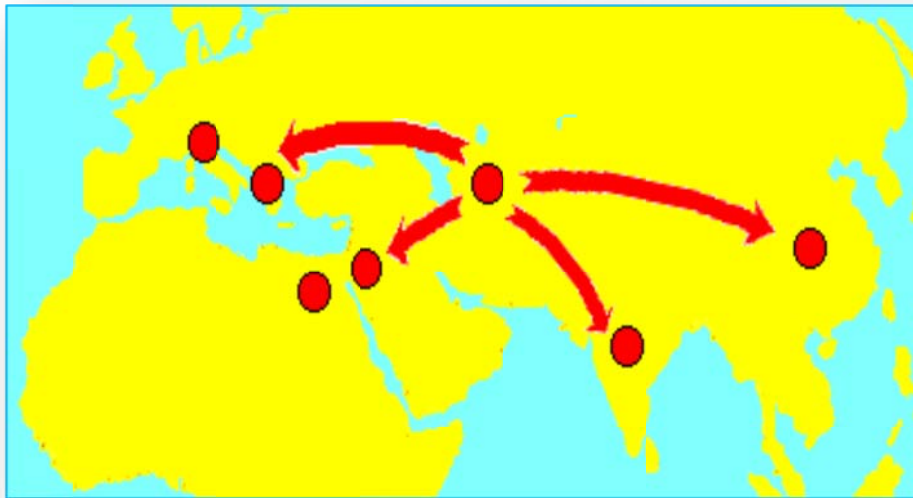
La hampe florale est cylindrique, pleine, accompagnée d'une paire de feuilles jusqu'à mi-hauteur et d'une bractée membraneuse (spathe), bivalve et terminée en pointe, qui protège l'inflorescence. Celle-ci est une ombelle arrondie, de 4 à 5 cm de diamètre, portée par un très long pédoncule et composée de quelques fleurs et de nombreuses bulbilles arrondies, d'environ 1 cm [04].

Les fleurs sont formées de 6 sépales pétaloïdes, blanc rosé ou verdâtres, et de 6 étamines disposées sur 3 cercles et plus courtes que l'involucre ; les anthères sont fixées dorsalement et les filets élargis à la base possèdent 3 pointes égales [04].

#### I.4. Biogéographie et répartition

L'ail provient à l'origine d'Asie centrale. Il y a environ 10 000 ans, il s'est répandu progressivement en Extrême-Orient, en Arabie, en Égypte et dans le Bassin méditerranéen, transporté par les marchands au gré des routes commerciales [05] (**Figure 2**).

L'ail a poussé en colonies dans les steppes sauvages en Afghanistan, en Iran, en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. À la suite d'une récolte commerciale intensive, il est devenu de plus en plus rare. Mais pour tous ses bienfaits, il a été cultivé dans l'ensemble du monde depuis plus de 5000ans.



**Figure 2 : Origine et expansion de l'ail [03].**

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 [04].

L'ail préfère les sols argileux, profonds, riches en humus et en nutriments, situés dans des endroits ensoleillés. Il s'agit d'une plante supportant les hivers rudes ; il existe d'ailleurs des variétés d'hiver (ail blanc et ail violet) permettant une récolte abondante et des variétés de printemps (ail rose et ail rouge) moins productifs.



Les principales régions de culture : la Chine, l'Inde, la Thaïlande, la Corée du Sud, l'Égypte, la Turquie, l'Espagne, l'ex-Yougoslavie, l'Italie, la France et les États-Unis.

Les principaux pays importateurs : l'Italie, l'Espagne, la Hongrie, la Tchéquie, les Balkans et l'Égypte ; pour les produits déshydratés, principalement la Chine.

## I.5. Composition chimique

L'ail (*Allium sativum*) est un aliment complet via sa composition. Il contient de nombreuses substances minérales et oligo éléments (calcium, cuivre, brome, magnésium, phosphore, potassium, soufre, zinc, fer...), quasiment l'ensemble des vitamines et provitamines (A, B1, B2, B3, B6, C, E), de nombreux antibiotiques naturels (allicine) et il renferme également les glucides comme le fructose.

Selon Teuscher et al [03], Les principaux constituants de l'ail sont :

- Alliines (sulfoxyde de S-alc(ène)yl-cystéine) : 0.5 à 1.3 % dans les bulbes frais, en teneur plus réduite dans les feuilles (Figure 3).

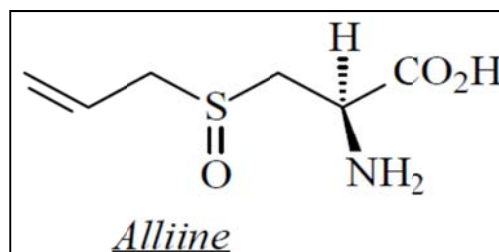
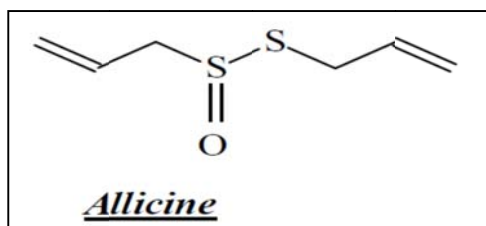


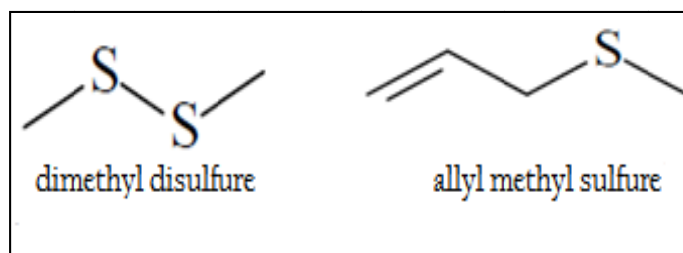
Figure 3 : Structure du composé de l'Alliine

- Composés soufrés : après lésion tissulaire, l'alliine non volatile entre en contact avec une enzyme, l'alliinase, pour former des acides alc(ène)ylsulféniques volatils ; ces derniers, instables, se transforment aussitôt en composés responsables de l'odeur alliacée typique correspondant à des alcényl- alcanes ou alcène thiosulfonates (Figure 4)



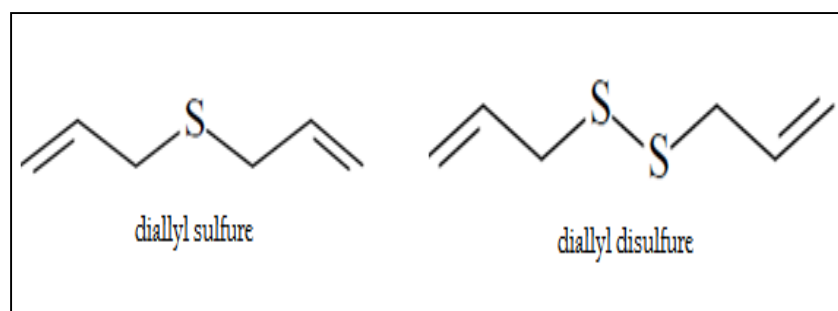
**Figure 4 : structure du composé Allicine**

- Des produits de dégradation des thiosulfonates apparaissent lors de la distillation à la vapeur d'eau ainsi qu'au cours de la cuisson des caïeux. Il s'agit des dialcyloligosulfides comme les diallyl-, méthylallyl- et diméthyl-sulfides et des oligosulfides, ils sont accompagnés de dérivés non soufrés comme le prop-1-ène et l'acétaldéhyde qui se volatilisent rapidement. Après entraînement à la vapeur d'eau, une série de dérivés hydrophiles peuvent être isolés dans la phase aqueuse, tels le 3,5-diméthyl-1,2,4-trithiolane, le prop-2-ène-1-ol et le 2,4-diméthylfurane (Figure 5).



**Figure 5 : structure des composés de diméthyl disulfure et d'allyl methyl sulfure**

Lorsque les caïeux sont fragmentés dans des solvants apolaires, par exemple lors d'une macération huileuse, il se forme des thiosulfonates porteurs de groupements tels les vinyldithiines et l'ajoène ; ils sont accompagnés de dialkyldi- et dialkyltri-sulfides. Une extraction éthanolique permet de récupérer notamment les diallyl- trisulfides ainsi que le méthyl-allyl-trisulfide et l'ajoène (Figure 6).



**Figure 6: structure des composés diallylsulfure et diallyl disulfure**

- $\gamma$ -glutamylpeptides : présents uniquement dans les bulbes (1.6%).
- Allithiamine : produit d'addition entre une thiamine et l'allicine, et présentant une activité de type vitaminique B1.
- Adénosine : ~0.05% [10].
- Polysaccharides, oligosaccharides et monosaccharides : notamment des fructanes (~50%, de type néokestose), saccharose, scorodose, glucose et fructose .
- Saponosides stéroïdiques et triterpéniques : sativosides B1, R1 et R2, protoéruboside B et gitonine F.
- Flavonoïdes : à l'état de traces, hétérosides de la quercétine et du kaempférol .
- Eléments minéraux : sélénium et tellure.

## I.6. Propriétés et emplois

L'ail est une plante médicinale qui est souvent sous-estimé. Aujourd'hui, après plusieurs études scientifiques, il redevient le célèbre via ces effets liés à l'activité antioxydante et antimicrobienne.

Les composés soufrés volatils spécialement: allicine, diallyl disulfure, diallyl trisulfure, ajoènes, vinyldithiines, sont généralement considérés responsables de la plupart des activités pharmacologiques [04-10] :

- Diminuent le taux plasmatiques des lipides ;
- Agissent comme drogue anti-athérosclérotiques ;
- augmentent l'activité fibrinolytique ;
- Freinent l'agrégation plaquettaire ;

- Préviennent la formation des tumeurs

En outre l'ail possède des propriétés antimicrobiennes, anthelminthiques, insecticides et immunostimulantes.

## **II. Les techniques extractives**

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilité des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique.

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur ; des techniques dites *conventionnelles* (utilisées depuis longtemps) et *nouvelles* (développées plus récemment) [11].

Parmi les techniques conventionnelles, on trouve l'entraînement à la vapeur, l'hydrodistillation, l'extraction par Soxhlet [12], l'extraction en mode batch [13,14] .

Dans la catégorie « techniques nouvelles » on peut citer l'extraction assistée par microondes (Microwave Assisted Extraction), l'extraction accélérée par solvants (Accelerated Solvent Extraction) [12,17], l'extraction avec des fluides supercritiques et l'extraction assistée par sonication [15,16].

### **II.1. Extraction à froid**

Cette technique est utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes de la famille des Rutacées (citron, orange, mandarine, ainsi que la bergamote qui est issue d'un greffon de citronnier et de bigaradier). C'est une méthode assez simple qui consiste à briser mécaniquement (abrasion, compression, incision, perforation, ...) les poches à essence (souvent au niveau de l'écorce ou péricarpe du fruit) pour recueillir un mélange d'essences odorantes et d'eau [19,30]. Dans le cas des agrumes, on parle d'essence et non d'huiles essentielles car aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur n'a eu lieu (contrairement à l'hydrodistillation ou l'extraction par solvants volatils).

## **II.2. Extraction à la vapeur d'eau**

### **II.2. 1. Hydrodistillation**

L'hydrodistillation est sans aucun doute le procédé chimique le plus ancien. En effet, il fut importé en Europe par les Arabes entre le VIII<sup>ème</sup> et le X<sup>ème</sup> siècle mais le principe était déjà connu et utilisé par les Egyptiens dès le IV<sup>ème</sup> siècle. Il est aussi le plus utilisé, le plus rentable et convenant le mieux à l'extraction des molécules en vue d'une utilisation thérapeutique [31]. Le principe de cette méthode consiste à immerger la matière végétale à traiter dans un ballon avec de l'eau et quelques morceaux de pierre ponce pour assurer le brassage de la solution. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques, passant dans un réfrigérant, l'eau se condense. Elle est ensuite récupérée dans une ampoule à décanter où il est possible de distinguer deux phases: l'huile essentielle et l'hydrolat chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et ayant une densité plus élevée [32].

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, et peut atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'huile [33].

### **II.2. 2. Entraînement à la vapeur d'eau**

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les composants, Cette méthode est similaire à la précédente sauf que la matière végétale ne macère pas directement dans l'eau. Elle consiste à introduire la masse végétale dans une colonne d'extraction à travers laquelle passe la vapeur. Cette dernière endommage la structure des cellules libère les particules d'huiles essentielles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant où elles seront condensées. Les phénomènes intervenant lors de l'entraînement à la vapeur seraient des phénomènes d'osmose et de diffusion libre. Cette méthode est supposée apporter une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques car la matière végétale ne baigne pas dans l'eau bouillante [33,34].

### **II.2. 3. Hydrodistillation par micro-onde sous vide**

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées [34].

#### **II.2. 4.Extraction à l'eau surchauffée**

Ce mode d'extraction utilise l'eau surchauffée sous pression entre 125°C et 175°C. Il utilise l'eau désoxygénée qui traverse une cellule où se trouve la matière végétale. Cette cellule est maintenue à une pression d'environ 20 bars et à température constante dans une étuve. Ce procédé appliqué au romarin donne un rendement plus élevé en composés oxygénés que lors de l'entraînement à la vapeur [35].

#### **II.2. 5.Extraction-Distillation Simultanée**

C'est une extraction liquide-liquide qui est menée dans un appareil dit de « Likens et Nickerson ». Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau sont extraits par des vapeurs de solvant que l'on condense ensuite dans un réfrigérant. Le solvant est recyclé en continu [36].

#### **II.3.Extraction par le CO<sub>2</sub> à l'état supercritique**

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO<sub>2</sub> supercritique qui possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui en plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO<sub>2</sub> supercritique

sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO<sub>2</sub> s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle [35]. Cette méthode est très prometteuse car le produit obtenu est proche du naturel et sans trace de solvant. De plus le CO<sub>2</sub> est non toxique, incolore, inodore et ininflammable, ce qui permet des conditions de sécurité supérieures.

## **II.4. Extraction au moyen de solvants**

Certains organes de végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation. C'est le cas des fleurs de jasmin, d'oeillet, de tubéreuse, ...etc. Il faut donc, pour ces végétaux, recourir à d'autres méthodes d'extraction des composés odorants volatils. Ces méthodes sont l'extraction par les solvants fixes c'est-à-dire une extraction par les corps gras (enfleurage) et l'extraction par les solvants volatils (extraction par l'hexane) [37].

### **II.4.1. Extraction par solvants volatils**

#### **II.4.1.1. Macération**

Elle est utilisée pour les plantes fragiles qui sont plongées dans une préparation chimique provoquant la dissolution des substances aromatiques. Après séparation du solvant par distillation, on obtient un produit cireux qui doit être dissout dans l'alcool. Ce dernier est ensuite éliminé par évaporation. L'huile essentielle ainsi obtenue est dite « absolue » [38]. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire [39].

#### **II.4.1.2. Extraction par Soxhlet :**

L'extracteur de Soxhlet est une pièce de verrerie permettant d'effectuer une extraction solide-liquide avec une grande efficacité.

L'appareil porte le nom de son inventeur : Franz von Soxhlet. L'extraction par l'appareil Soxhlet est une méthode simple permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première.

Dans nos études d'extraction, nous avons utilisé deux techniques conventionnelles – l'extraction en mode batch et l'extraction Soxhlet, choisies pour leur simplicité de mise en oeuvre et leur efficacité. Le tableau 1 résume les avantages et les inconvénients des méthodes précédentes.



**Tableau 1 : Les avantages et les inconvénients des deux procédés d'extraction : Soxhlet et en mode batch [27]**

<b>Mode d'extraction</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>le Soxhlet</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Extraction à plusieurs étage.</li> <li>- Le Soxhlet est indépendant de la matrice végétale.</li> <li>- Méthode ne nécessite pas de filtration après extraction.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Le risque de thermodestruction de certains composés (Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue)</li> <li>-La grande quantité de solvant consommée, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental</li> <li>-la durée importante d'extraction</li> </ul>
<b>Le mode batch</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilité de travailler facilement avec des mélanges de solvants (par exemple diverses proportions alcool-eau)</li> <li>-Extraction à un seul étage.</li> <li>-Contrôle de la température d'extraction, en évitant le risque de destruction des composés thermolabiles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Saturation du solvant.</li> <li>-La grande quantité du solvant consommée, ce qui conduit à des pertes économiques.</li> </ul>

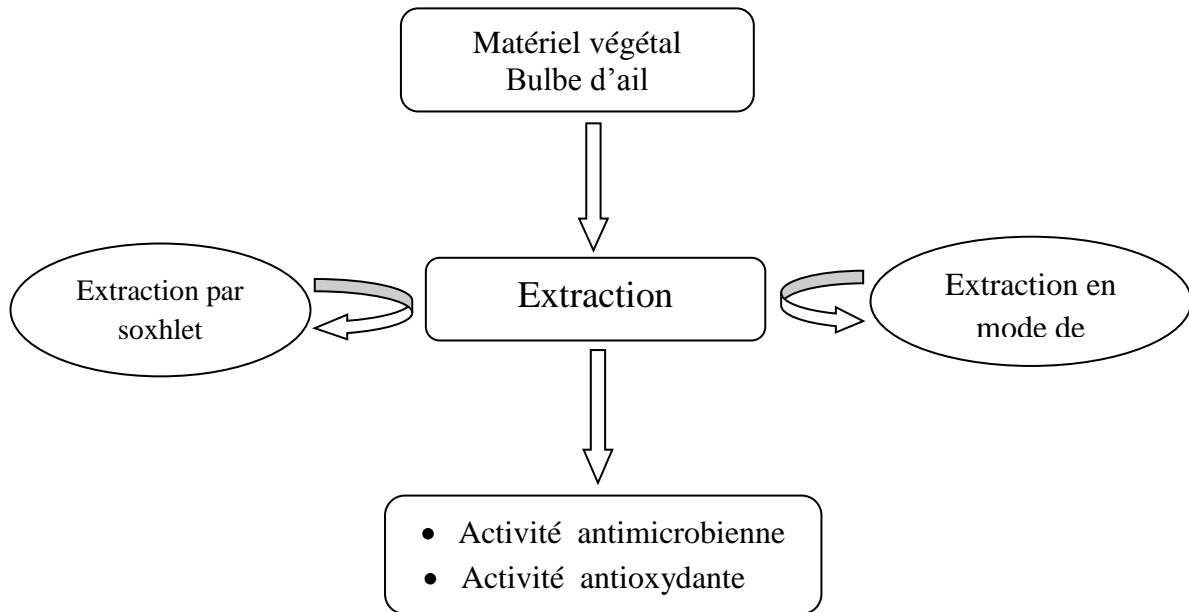
# *Chapitre II*

## *Matériels et méthodes*

## II. Matériels et méthodes

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à mettre en évidence l'activité antioxydante et étudier l'activité antimicrobienne des différents extraits d'ail.

Le schéma ci-dessous figure 7 résumant les étapes du protocole expérimental réalisées lors de cette étude.



**Figure 7 : Schéma résumant les étapes du protocole expérimental**

### II.1. Matériel végétal

Les bulbes d'ail utilisés dans cette étude ont été récoltés en juin 2012 de la région centre d'Algérie (Ain-Defla). Le matériel végétal était conservé dans des conditions ambiantes (endroits aérés et à l'abri de la lumière).

### II.2. Méthodes

#### II.2.1. Détermination de la teneur en eau (Taux d'humidité)

Afin de déterminer la teneur en eau du matériel végétal étudié, un échantillon de 10 g a été séché dans une étuve isotherme de type Memmert à une température de  $103^{\circ}\pm 2^{\circ}$  pendant 24 heures (jusqu'à un poids constant).

La masse de l'ail séché ( $M_s$ ) a été déterminée à l'aide d'une balance de précision et la teneur en eau est exprimée par la formule ci-dessous :

$$\text{Teau} = \frac{M_f - M_s}{M_s} \times 100$$

Soit :

**Teau** : la teneur en eau(%).

**Mf** : la masse fraîche(g).

**Ms** : la masse sèche(g).

## II.2.2. Techniques d'extraction

Cette partie a été réalisée au sein du laboratoire militaire central (LCI). Deux techniques d'extraction ont fait l'objet de notre travail: l'extraction par Soxhlet et l'extraction par macération en mode de batch.

Afin d'obtenir un meilleur rendement, quatre solvants de polarités différentes ont été choisis. Le tableau 2 : regroupe les caractéristiques des différents solvants utilisés dans cette étude.

**Tableau 2 : Les caractéristiques physiques des quatre solvants utilisés.**

Solvants	Densité	pureté	Masse molaire	T° d'ébullition
Ethanol	0.79	99.9 %	46.07 g/mol	78°C
Méthanol	0.791-0.792	99.8 %	32.04 g/mol	65°C
Hexane	0.659	>95 %	86 g/mol	69°C
Di-éthyle-éther	0.71	99 %	74.12 g/mol	35°C

Le matériel végétal utilisé est finement broyé en utilisant un ultra-turax. L'expérience pour chaque solvant a été répétée quatre fois.

### II.2. 2.1. Extraction par Soxhlet

L'extracteur de Soxhlet est une pièce de verrerie permettant d'effectuer une extraction solide-liquide avec une grande efficacité.

L'appareil porte le nom de son inventeur : Franz von Soxhlet. L'extraction par l'appareil Soxhlet est une méthode simple permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première [11].

L'appareil Soxhlet (Figure 8) utilisé dans notre travail est composé de quatre postes. Chaque poste est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche d'extraction en cellulose, d'un tube siphon et d'un tube de distillation.

Le dispositif est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Au dessus de la cartouche contenant le solide à extraire est placé un réfrigérant servant à condenser les vapeurs du solvant.



**Figure 8 : Dispositif de l'extracteur Soxhlet**

La matière à extraire (30g) est mise dans la cartouche du Soxhlet. Un volume de 300ml du solvant est introduit dans le ballon puis chauffé à une température correspond à la température d'ébullition du solvant. L'extraction est arrêtée au bout de 7heures.

La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide de l'appareil appelé Rotavapor (Figure 9)



**Figure 9 : Dispositif du Rotavapor**

Après évaporation du solvant, le poids du ballon est pesé et le rendement est calculé selon la formule ci-dessous :

$$R = \frac{Me}{M} \times 100$$

Soit :

**Me:** Masse extraite(g).

**M :** Masse de l'échantillon(g).

La concrète est par la suite récupérée en ajoutant 2 ml du même solvant utilisé, placée dans des vials hermétiquement fermés, bien emballés en papier aluminium et conservés au frais (4°C).

#### **II.2.2.2. Extraction en mode batch (macération)**

Il s'agit d'un dispositif simple composé des erlenmeyers de 500 ml (où l'on dispose la matière première (30g) et le solvant (300ml) et d'un agitateur secoueur (Figure 10).



**Figure 10 : Dispositif d'extraction en mode Batch**

La durée de macération a été fixée à trois heures à une température ambiante. Après cette durée, le mélange est filtré sur un papier filtre et le solvant est évaporé à l'aide d'un Rotavapor.

Le calcul du rendement et la récupération de la concrète ont été fait comme ci- indiqué dans la partie précédente (extraction par Soxhlet).

### **II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante**

Cette activité n'a été réalisée que sur les extraits éthanoliques et méthanoliques des deux procédés d'extraction (Soxhlet et macération).

Les quantités des extraits obtenues en utilisant le di-éthyle éther et l'hexane comme solvants d'extraction n'étaient pas suffisantes pour réaliser le test de l'activité antioxydante.

#### **II.2.3.1. Les polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux a été fait par le réactif de Folin-Ciocalteu .Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques

oxydés. La mesure de cette dernière se fait au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm.

### II.2.3.2. Méthode de piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydante in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH. Le radical DPPH\* de couleur violette, fixe un radical H qu'il arrache à l'antioxydant AH et se réduit en DPPH-H (2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) de couleur jaune dont l'intensité est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Figure 11) [18].

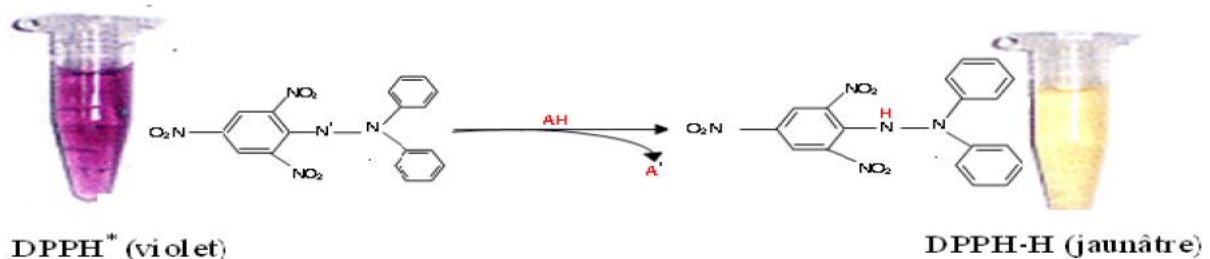


Figure 11: Réaction du radical DPPH\* avec un antioxydant AH [29]

Pour réaliser ce test, des solutions à différentes concentrations ont été mélangées avec la solution éthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30 minutes à la température ambiante, l'absorbance est lue à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible.

Le blanc a été préparé par un mélange de la solution éthanolique avec du DPPH. Les essais ont été réalisés deux fois.

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée selon la formule suivante :

$$I\% = \frac{(A \text{ blanc} - A \text{ échantillon})}{A \text{ blanc}} \times 100$$

A : Absorbance du blanc(nm).

A<sub>échantillon</sub> : Absorbance de l'échantillon(nm).



### II.2.3.3. Activité antimicrobienne et antifongique

#### II.2.3.3.1. Micro-organismes étudiées

Les souches microbiennes (ci- dessous) ont été testées pour leurs pathogénicité et l'implication fréquente de certaines dans l'altération des denrées alimentaires.

Les micro-organismes utilisés dans cette étude ont été obtenus du laboratoire du CHU, Bab El Oued(Alger).

- **Bactéries:**

**bacteries Gram + :** *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (1&2), *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis*.

**bacteries Gram – :** *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas*, *Serratia sp*, *Acinetobacter*).

- **Moisissures :** *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*.

- **Levures :** *Saccharomyces cerevisiae*.

L'ensemble des souches a été conservé dans des milieux de conservation en tubes inclinés et à une température de 4°C. L'étude de l'activité antibactérienne a été faite sur le bouillon nutritif et le milieu gélosé PCA (Plant Count Agar) et l'activité antifongique a été réalisée sur le bouillon et le milieu gélosé YMA (Yeast Malt Agar).

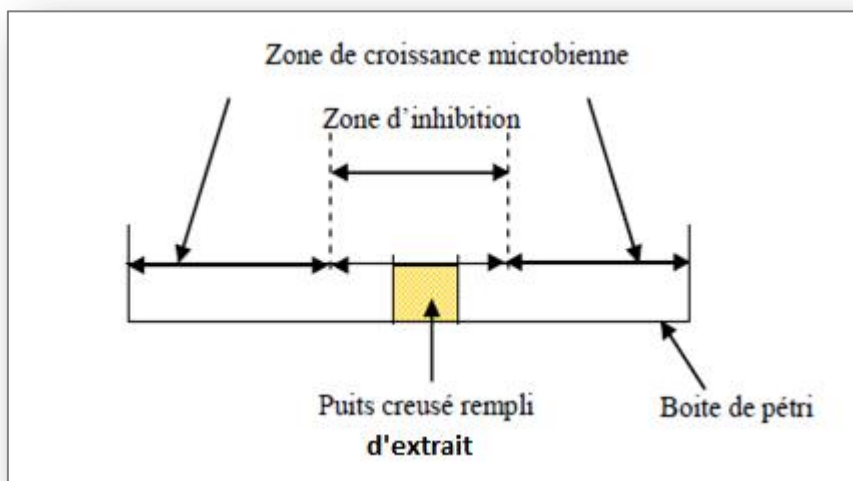
#### II.2.3.3.2. Méthodes

L'activité antimicrobienne a été testée sur les souches étudiées par la technique de puits.

- **Technique de puits**

Elle consiste à créer des puits de 6 mm de diamètre sur une gélose préalablementensemencée avec un inoculum de 0.2ml de la suspension bactérienne. Ce dernier a été étalé à l'aide d'un râteau de

manière à avoir une répartition uniforme. Par la suite, les puits sont remplis avec un volume de 25ul de la solution des différents extraits. Les extraits, diffusant radialement, créent une zone d'inhibition circulaire autour de chaque puits (Figure 12).



**Figure 12 :Diffusion radial dans une boîte de pétri d'un puits creusé dans la gélose et rempli d'extrait [18]**

Un control négatif a été réalisé également en remplissant des puits avec les différents solvants (méthanol, éthanol, di-éthyl-éther, hexane). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 à 48h.

L'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur une échelle de mesure qui classe le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en quatre classes [20] :

- Fortement inhibitrice :  $D > 28$  mm.
- Modérément inhibitrice :  $16 > D > 28$  mm.
- Légèrement inhibitrice :  $10 > D > 16$  mm.
- Non inhibitrice :  $D < 10$  mm

L'activité antimicrobienne a été évaluée par deux paramètres; la concentration minimale inhibitrice(CMI) et la concentration minimal bactéricide(CMB).

### ▪ **La concentration minimale inhibitrice CMI**

La concentration minimale inhibitrice CMI est la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée. Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue.

La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure Immédiate [21].

### ▪ **Détermination de la CMB**

La CMB est définie par la concentration ne laissant persister que 0,1 % de survivant au plus. Elle a été déterminée à partir des tubes négatifs suite au test de CMI [22].

### ▪ **Rapport CMI/CMB**

Le rapport **CMI/CMB** peut être utilisé pour distinguer l'effet antibactérien de l'extrait : extrait bactéricides ( $CMB/CMI < 2$ ), extrait bactériostatiques (CMB très éloignée de la CMI). Il définit la tolérance d'une souche quand ce rapport est supérieur ou égale à 32 [22].

# *Chapitre III*

## *Résultats et discussion*

### III. Résultats et discussion

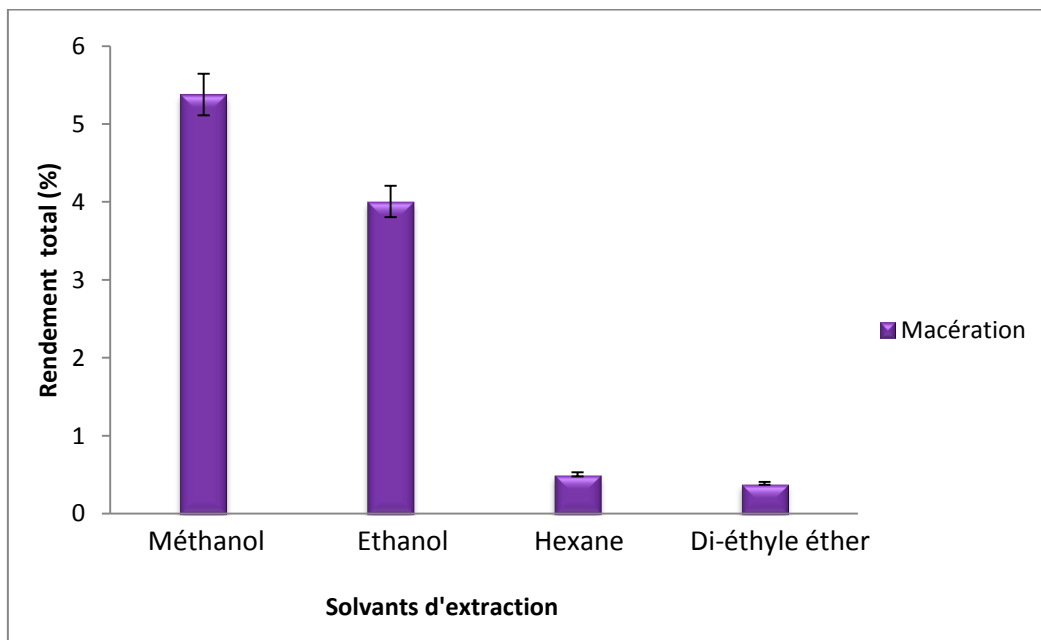
#### III.1. Teneur en eau

La teneur en eau des bulbes d'ail utilisés dans cette étude est de 68.53%. Cette valeur explique que notre échantillon présente un taux d'humidité élevé. Ce résultat est très proche de celui trouvé par Haydar et al (66,32%) [23] lors de son étude sur les propriétés technologiques et nutritionnelle de l'ail. Cependant la variation de la composition chimique d'ail est en fonction de plusieurs facteurs parmi le climat de leur habitat et le stade de développement des plantes lors de la collecte.

#### III.2. Extraction et rendement de la concrète

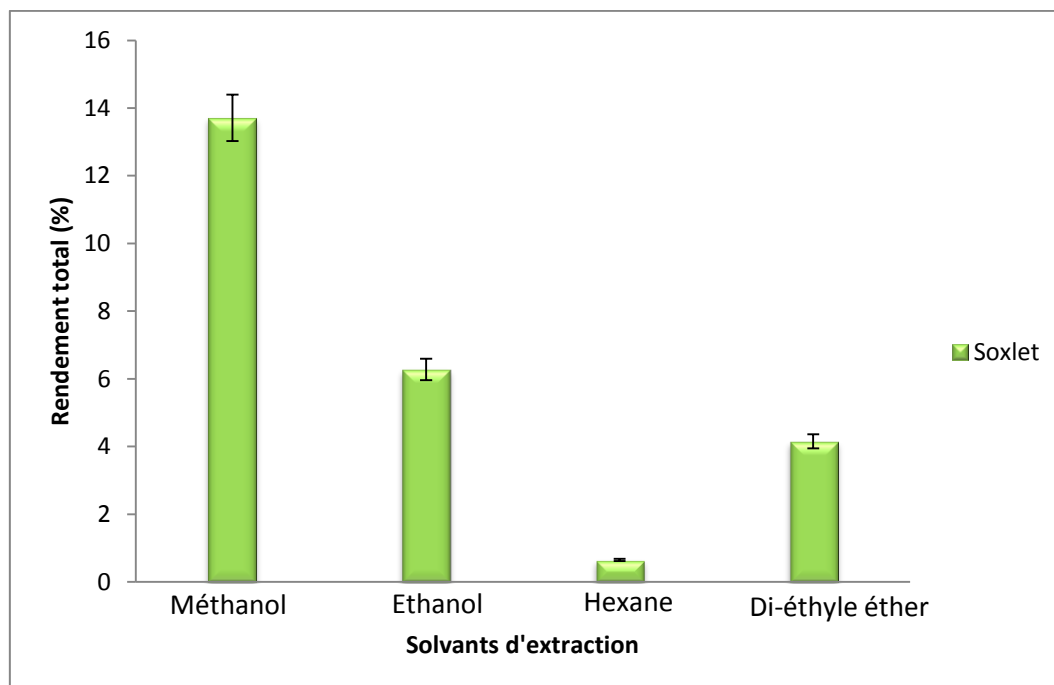
Afin de choisir le meilleur solvant qui nous donne le meilleur, nous avons procédé à deux méthodes d'extraction : l'extraction en batch ou macération et l'extraction par Soxhlet, avec quatre solvants (Ethanol, Méthanol, Hexane, et le Di-éthyle-éther).

L'analyse des figures (13 et 14) montre que les rendements obtenus pour les quatre solvants (éthanol, méthanol, hexane et di-éthyl ether) sont respectivement ( $13.71 \pm 0.21\%$ ,  $6.28 \pm 0.12\%$ ,  $0.65 \pm 0.01\%$ ,  $4,15 \pm 0.02\%$ ) pour le Soxhlet et ( $5.38 \pm 0.11\%$ ,  $4.00 \pm 0.10\%$ ,  $0.50 \pm 0.01\%$ ,  $0.39 \pm 0.009\%$ ) pour la macération.



**Figure 13 : Rendements totaux des extraits avec différents solvants (Extraction en mode batch).**

Les valeurs les plus élevées sont constatées pour les solvants polaires l'éthanol et le méthanol ce qui laisse supposer que les bulbes d'ail sont riches en constituants polaires.



**Figure 14 : Rendements totaux des extraits avec différents solvants (Extraction par Soxhlet)**

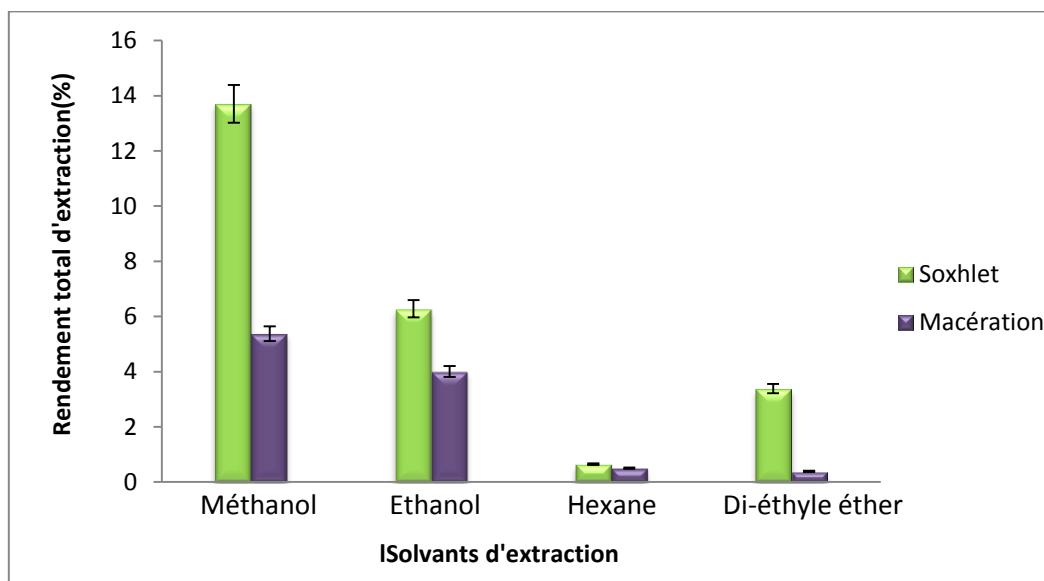
On voit bien que le méthanol avec un rendement de 13,71% est de loin le plus efficace parmi ces quatre solvants et produit un extrait nettement plus important.

Une étude faite par Hanen Najjaa et al [24] sur les parties aériennes de *Allium roseum* a montré qu'un rendement élevé de 29.65% est obtenu par le méthanol ceci est du probablement à une affinité des composants de la concrète à ce solvant.

Les meilleurs rendements obtenus, du point de vu quantitatif, par l'extraction - Soxhlet et par méthanol ne reflètent pas obligatoirement un rendement de meilleure qualité.

D'après la figure 15, La comparaison des rendements d'extraction de la concrète par les différents solvants organiques utilisés dans cette étude par les deux procédés d'extraction a montré que des rendements nettement élevés sont observés pour l'extraction Soxhlet. Ceci

s'explique par le fait que l'extraction par Soxhlet est une méthode qui permet de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première contrairement au mode batch (macération) d'où la saturation du solvant .



**Figure 15 : Comparaison des rendements totaux des extraits des différents solvants par les deux méthodes d'extraction.**

### **III.3. L'activité antioxydante**

#### **III.3.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux**

La plupart des activités anti oxydantes sont dérivées des composés de type phénolique, la détermination de ces composés était faite en utilisant le réactif de folin-ciocalteu [25] pour les concrètes extraites par le méthanol et l'éthanol pour les deux méthodes d'extraction.

La quantité des composés phénoliques totaux a été calculée en tant qu'équivalents d'acide gallique en milligrammes par milligramme d'extrait (voir la courbe étalon, annexe 2), les résultats sont représentés dans le Tableau 3.

**Tableau 3: Les concentrations des composés polyphénoliques pour les deux méthodes d'extraction.**

Extraits	Polyphénols totaux (mg GAE/g)
<b>Soxhlet – Méthanol (SM)</b>	0,0669±0.004
<b>Soxhlet-Ethanol (SE)</b>	0,0310±0.002
<b>Macération-Méthanol (MM)</b>	0,0073±0.001
<b>Macération-Ethanol (ME)</b>	0,0062±0.001

D'après le tableau 3, nous constatons que les concentrations en composés polyphénoliques totaux pour les deux procédés d'extraction varient de 0.0062±0.0009 mg GAE/g à 0.0669±0.004 mg GAE/g respectivement pour l'extraction Macération-Ethanol (ME) et Soxhlet-Méthanol (SM).

Cependant des valeurs élevées ont été obtenues pour le méthanol (6.67%) et l'éthanol (3.10%) pour l'extraction par Soxhlet.

L'analyse des résultats présentés dans le tableau 3 a permis également d'observer qu'une teneur de 7.4mg GAE/g est obtenue pour la macération par le méthanol.

Ce résultat est en accord avec la teneur de (7.05 ± 0.05 mg GAE/g, trouvée par Biljana et al [26] qui a mené une étude sur les extraits méthanoliques de bulbes d'ail frais et stocké. cet auteur a pu observer une diminution des composés polyphénoliques totaux par rapport à l'ail frais. Cette diminution est due à l'oxydation des phénols en quinones [26].



### III.3.2. Activité antioxydante

Le potentiel oxydant dans cette étude a été calculé par la méthode de piégeage des radicaux libres de DPPH dans des solutions éthanoliques à différentes concentrations.

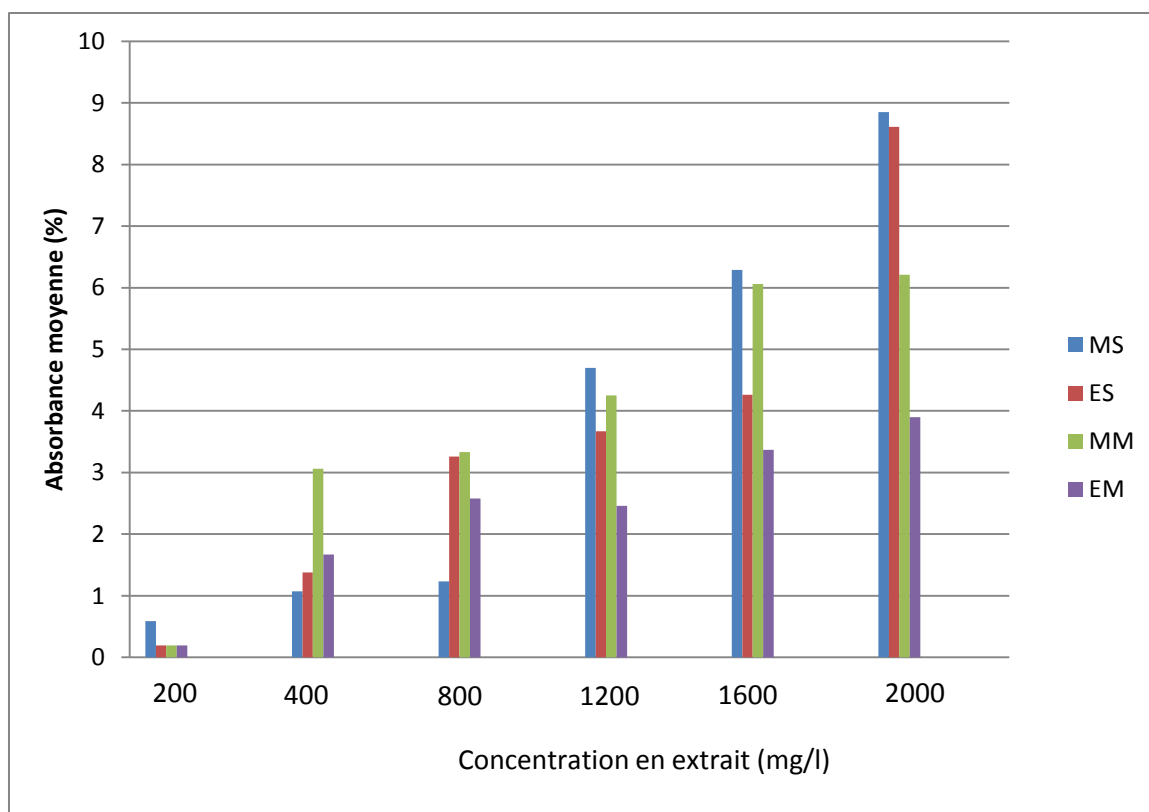
Les résultats obtenus exprimés en termes de pourcentage d'inhibition sont consignés dans le Tableau 4 et représentés sur la Figure (16).

**Tableau 4 : Activité de piégeage du radical DPPH\* des extraits éthanoliques et méthanoliques (Extraction Soxhlet et Macération)**

Extraits	Concentrations (mg/l)					
	200	400	800	1200	1600	2000
SM	0.59±0.06	1.07±0.02	1.23±0.03	4.70±0.20	6.29±0.26	8.85±1.02
MM	0.19±0.07	3.06±0.02	3.33±0.03	4.25±0.15	6.06±0.20	6.21±0.25
SE	0.19±0.07	1.38±0.01	3.26±0.02	3.67±0.06	4.26±0.12	8.61±0.01
ME	0.19±0.07	1.67±0.02	2.58±0.02	2.46±0.01	3.37±0.03	3.9±0.09

Les résultats montrent que le pouvoir de piégeage du radical DPPH\* par les extraits éthanoliques et méthanoliques est faible et il est proportionnel aux différentes concentrations.

D'après la figure 16, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Pour une concentration de 2000 mg/l, l'extrait méthanolique obtenu par Soxhlet a révélé un pourcentage d'inhibition élevé de 8.85±1.02% comparant aux autres extraits.



**Figure 16 : Activité de piégeage du radical DPPH des extraits éthanoliques et méthanoliques (extraction par Soxhlet et macération)**

**MS : Méthanol Soxhlet .**

**MM : Méthanol Macération.**

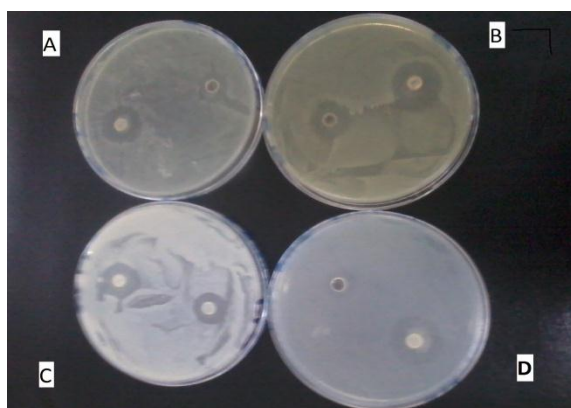
**ES : Ethanol Soxhlet .**

**EM : Ethanol Macération.**

Malgré les faibles teneurs d'activité antioxydante obtenues durant notre étude, nos résultats semblent logiques et concluants vu que le produit végétal utilisé a été récolté en juin 2012 et analysé neuf mois plus tard. Ces observations ont été confirmées par la littérature telle que les travaux de Yara et al [26] et Biljana et al [25]. Ça était intéressant si une étude de la composition des concrètes a été faite pour expliquer d'avantage cette diminution de l'activité antioxydante.

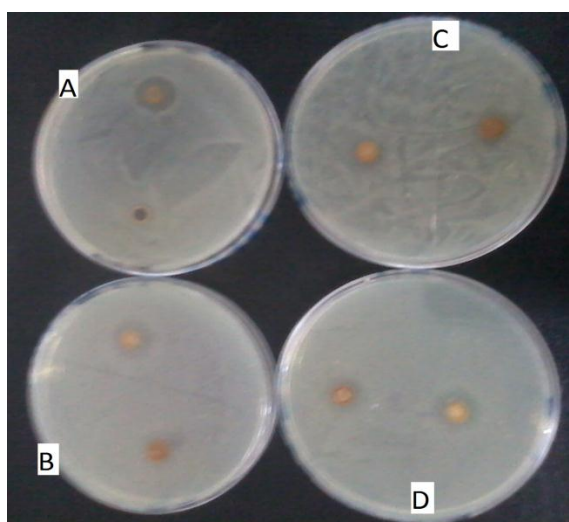
### III.4. L'activité antimicrobienne

L'étude de la sensibilité des souches bactériennes testés vis-à-vis la concrète d'ail extraite par les deux méthodes d'extraction a montré une sensibilité remarquable de toutes les souches bactériennes pour les extraits obtenus par l'hexane et le di-éthyle-éther (Figure 17) comparant à celle obtenue par le méthanol et l'éthanol (Figure 18).



**Figure 17: Aspect des cultures et des zones d'inhibitions en présence des extraits d'ail (solvant diethyl-éther).**

(A : *K.pneumonea*, B : *Enterococcus luteus*, C : *E.coli*, D : *Proteus mirabilis*.)



**Figure 18 : Aspect des cultures et des zones d'inhibitions en présence antimicrobienne des extraits d'ail (solvant méthanol)**

(A : *Micrococcus luteus*, B : *Proteus mirabilis*, C : *Salmonella typhimurium*, D : *Listeria monocytogenes*)

Les mesures des diamètres des zones d'inhibition regroupées dans le tableau (5) montrent qu'à l'exception d' *Escherichia.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* , les souches Gram (-) sont moins sensibles que les bactéries Gram (+).

Cette sensibilité est probablement due à la composition chimique de leurs parois. Cependant les bactéries Gram (+) présentent une couche externe de nature lipopolysaccharides (LPS) qui empêche la pénétration des composants hydrophiles. La même observation a été faite par Benzeggouta [27] lors de son étude antimicrobienne sur des plantes médicinales connues comme Aliments (l'oignon, l'ail, la cannelle et les clous de girofle).

L'étude de l'activité antibactérienne a permis également de classer les souches testées ,selon leur sensibilités en quatre groupes :

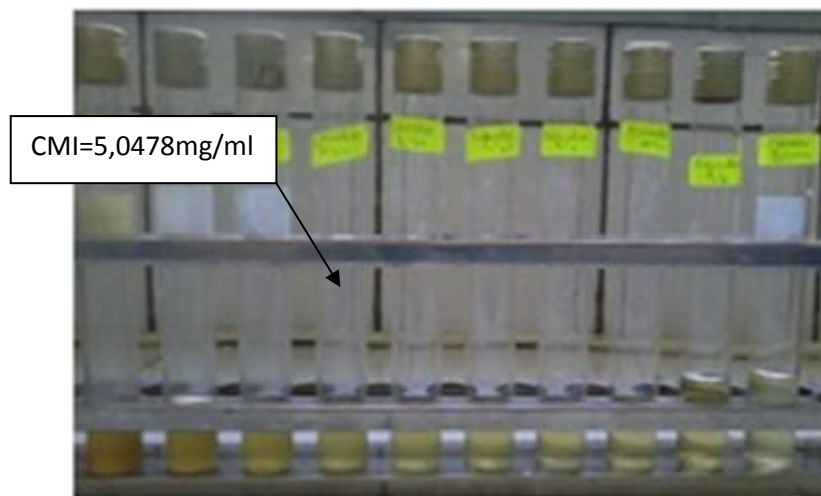
- Fortement inhibitrice : *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*,  
*Staphylococcus aureus*<sup>2</sup>,*Strepto D ala* et *Escherichia coli*
- Modérément inhibitrice : *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*
- Légèrement inhibitrice : *Saccharomyces cerevisiae*
- Non inhibitrice : *Hydrophi Alanine*

**Tableau 5 : Activité antimicrobienne des extraits d'ail obtenu par les deux procédés d'extraction**

les souches bactériennes	Les diamètres moyens d'inhibition (mm) (macération)							
	Méthanol		Ethanol		Hexane		Diethyl-ether	
	Soxhlet	Mode batch	Soxhlet	Mode batch	Soxhlet	Mode batch	Soxhlet	Mode batch
<i>Listeria monocytogenes</i>	07.67±0.70	08.33±0.3	07.67±0.70	11.33±0.3	18.33±0.90	20.67±0.6	29.33±0.6	25.00±0.6
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	08.67±0.23	10.67±0.3	11.00±0.40	13.67±0.3	23.33±0.70	12.00±0.6	26.67±0.6	32.33±0.6
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	09.67±0.40	09.33±0.4	06.67±0.30	8.33±0.4	39.67±0.90	16.00±0.7	29.67±0.8	13.67±0.7
<i>Micrococcus luteus</i>	08.00±0.60	11.33±0.3	12.67±0.70	15.33±0.4	18.00±0.90	15.33±0.6	11.67±0.7	17.00±0.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	06.33±0.13	06.00±0.4	09.33±0.08	17.33±0.3	17.33±0.70	11.33±0.5	10.67±0.6	20.00±0.7
<i>Streptococcus D Ala</i>	10.00±0.00	08.33±0.4	11.67±0.40	9.67±0.4	20.33±1.23	12.33±0.7	34.00±0.8	29.33±0.7
<i>Escherichia coli</i>	07.00±0.70	06.00±0.4	07.67±0.70	13.00±0.4	17.67±0.80	10.00±0.8	13.33±0.8	19.00±0.9
<i>Proteus mirabilis</i>	06.00±0.00	06.33±0.3	10.33±0.32	8.00±0.3	16.00±0.90	10.67±0.9	16.67±0.8	14.00±0.6
<i>Salmonella typhimurium</i>	06.33±0.36	06.67±0.3	09.67±0.60	19.67±0.3	10.67±0.70	21.33±0.7	9.67±0.60	34.00±0.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	09.67±0.41	06.00±0.4	17.33±0.10	07.67±0.4	32.33±0.80	08.33±0.8	16.67±0.91	17.00±0.6

### III.4.1. Détermination des CMI et CMB

Le test de CMI a été réalisé sur cinq souches ( *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus D ala* et *Escherichia coli* ) qui ont présentés une sensibilité importante aux différents extraits étudiés .A l'égard des souches testées, *Pseudomonas aeruginosa* a présenté une concentration minimale d'inhibition de 5,0478 mg/ml vis-à-vis l'extrait d'ail obtenu par Soxhlet-éthanol (Figure 19).



**Figure 19 : Le test de CMI pour *Pseudomonas aeruginosa***

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) a été évaluée également pour la même souche à partir des tubes clairs qui n'ont pas présentés une croissance bactérienne lors de la mesure de la CMI.

La CMB illustrée dans la (Figure 20) pour *Pseudomonas aeruginosa* montre que l'extrait d'ail obtenu par Soxhlet-éthanol possède une concentration minimale bactéricide de 10,0956mg/ml.

Le calcul du rapport CMB/CMI indique que l'extrait d'ail obtenu par l'extraction Soxhlet-éthanol a un effet bactéricide envers *Pseudomonas aeruginos* avec une valeur de 2.

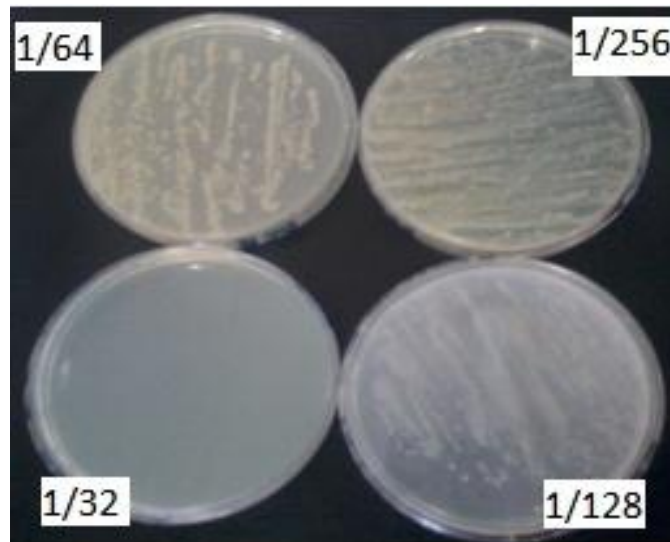


Figure 20: Le test de CMB pour *Pseudomonas aeruginosa*

### III.4.4. Activité antifongique

L'activité antifongique des extraits d'ail a été également réalisée par la méthode de puits pour les deux moisissures (*Aspergillus niger* et *Rizhopus Stolonifier*) et une espèce de levure (*Saccharomyces cerevisiae*).

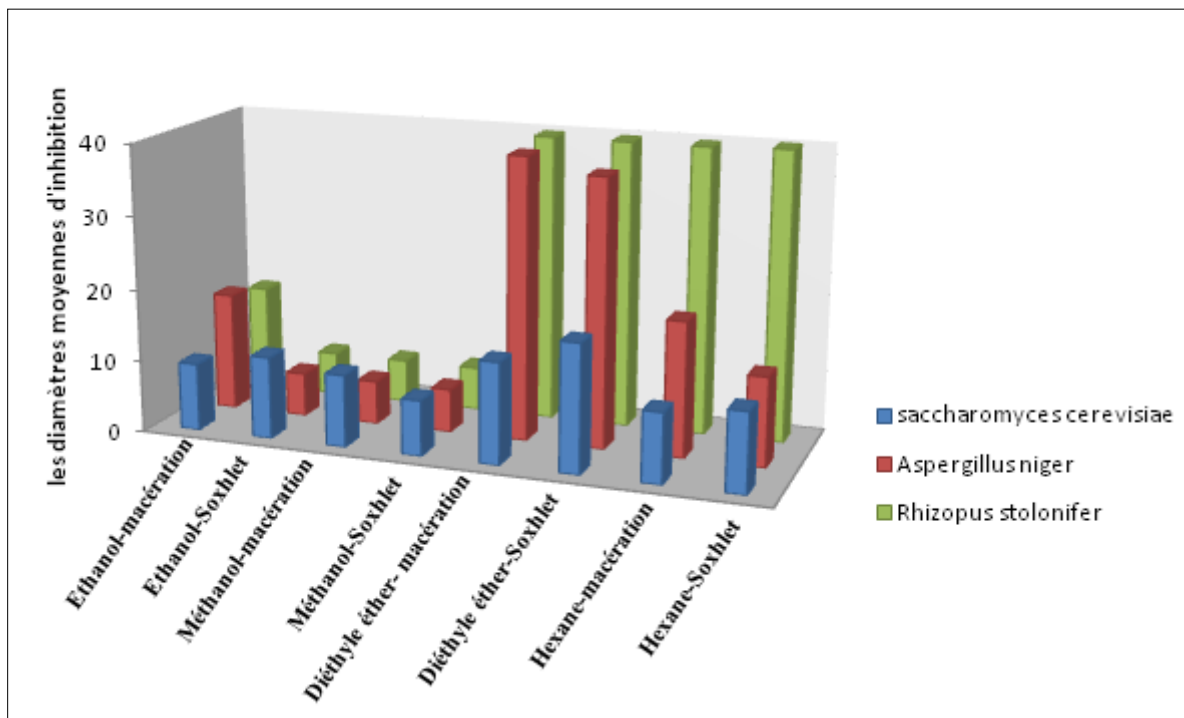


Figure 21 : Activité antifongique des différents extraits d'ail

L'analyse de la (figure 21) montre que l'espèce *Rizhopus Stolonifier* présente une sensibilité élevée aux extraits d'ail obtenus par les deux procédés d'extraction pour les solvants hexane et diethyl-ether.

Tandis que la levure *Saccharomyces cerevisiae* présente une légère sensibilité avec des diamètres d'inhibition qui varient entre 11mm pour le Soxhelet-hexane (SH) et 17.67 mm pour le Soxhlet-diethyl-ether(SD) (Figure 21).

Une étude faite par Benkeblia [28] sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de l'oignon et l'ail a montré la sensibilité modérée des mêmes souches testées vis-à-vis différentes concentrations des huiles essentielles.

L'étude de l'activité antimicrobienne a permis de constater l'efficacité de ces extrait vis-à-vis les souches étudiées ce qui explique que ces extraits contiennent des composant connus comme antimicrobiens comme l'allicine, l'ajoene et d'autres dérivés hydrophiles. Malgré que la composition de ces extraits n'a pas été faite mais plusieurs travaux[] ont confirmés cette efficacité.



# *Conclusion*

**L**a recherche de nouvelles substances antimicrobiennes et antioxydantes purement naturelles est la préoccupation capitale de la plupart des gens et des chercheurs, actuellement.

Pour cela, l'objectif principal de notre étude est d'étudier les activités antimicrobiennes et antioxydantes d'une plante médicinale connue comme alicament à travers deux procédés d'extraction : extraction par Soxhlet et extraction par macération en mode de batch.

Les résultats obtenus ont montré des rendements nettement élevés du point de vue quantitatif dans le cas de l'extraction par Soxhlet avec un meilleur rendement (13,71%) pour le méthanol.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes ; le dosage des composés polyphénoliques totaux et le piégeage du radical libre DPPH.

L'ail est connu par son activité antioxydante importante liée à ses constituants soufrés. Mais, dans la présente étude, des teneurs faibles en composés polyphénoliques totaux et un faible pouvoir antioxydant ont été trouvés, ce qui s'expliquerait par le fait que le matériel végétal étudié n'est pas frais (conservation pendant neuf mois).

De même l'ail est connu par ces activités antimicrobiennes qui sont dues aux composants majoritaires tels que l'allicine et d'autres dérivés hydrophiles.

Les bioessais ont montré que les extraits étudiés sont plus efficaces contre les bactéries Gram + et les champignons confirmant les recherches publiées sur cette plante.

Comme perspectives, il serait intéressant d'étudier la composition chimique des extraits de l'ail frais et par conséquent d'évaluer ces activités biologiques et antioxydantes afin de mieux apprécier les bienfaits de ses constituants.

*Références*  
*bibliographiques*

[01] El Kalamouni.C.,2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat, université de Toulouse 375p.

[02]A Cronquist., 1982. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Classification de Cronquist des angiospermes.

[03]Angiosperms Phylogeny Group III., 2009.La classification APG III (2009). Classification phylogénétique, des angiospermes.

[04] Teuscher.E., Anton.R., Lobstein.A.,2005, Plantes aromatiques, Edition médicales internationales; Allemagne;522 p.

[05] Amagase Haydar, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S and Itakura Y. 2001 Intake of garlic and its bioactive components. Journal of Nutrition. 131, 955s-962s.

[06] Leung Albert Y 1980 Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics. Wiley-Interscience Publication New York.

[07] O'gara EA, Hill DJ and Maslin DJ 2000 Activities of garlic oil, garlic powder and their diallyl constituents against Helicobacter pylori. Applied and Environmental Microbiology. 66,2269-2273.

[08] Ross ZM, O'gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV and Maslin DJ 2001 Antimicrobial Properties of garlic oil against Human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. Applied and Environmental Microbiology. 67, 475-480.

[09] Tsao SM and Yin MC 2001 In-vitro antimicrobial activity of diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. J. Med. Microbiol. 50(7) 646-649.

[10] Weber ND, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD and Hughes BG.1992 In vitro virucidal effects of Allium sativum (garlic) extract and compounds. Planta Medica. 58, 417-423.

[11] Petko Ivanov PENCHEV., 2010. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat, université de Toulouse 229p.

[12] T. S. Reighard and S. V. Olesik, 2006, Bridging the Gap Between Supercritical Fluid Extraction and Liquid Extraction Techniques: Alternative Approaches of the Extraction of Solid and Liquid Environmental Matrices, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 26 (2&3) ,1-39.

[13] R. N. Carvalho Jr., L. S. Moura, P. T.V. Rosa, M. A. A. Meireles, 2005, Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity, *J. of Supercritical Fluids* 35 ,197–204.

[14] Ai-Hua Liu, L. Li, M. Xu, Y.-H. Lin, H.-Z. Guo and D.-A. Guo, 2006 , Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC-DAD method, *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 48 – 56.

[15] A. Caniova and E. Brandsteterova, 2001 ,HPLC Analysis of Phenolic Acids in *Melissa Officinalis*, *J. Liq. Chrom. & Rel Technol.*, 24 (17) ,2647 – 2659.

[16] M. T. Tena and M. Valcarcel, Supercritical Fluid Extraction of Natural Antioxidants from Rosemary: Comparison with Liquid Solvent Sonication, *Anal. Chem.*, 69 (1997), 521-526.

[17] A. Ziakova, E. Brandsteterova and E. Blahova, 2003, Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*, *Journal of Chromatography A*, 983 271 – 275.

[18] Sahraoui.N., 2013, mise au point d'un nouveau procédé d'extraction d'huiles essentielles assiste par micro-ondes. Thèse de doctorat,Ecole Nationale Polytechnique, 123p.

[19] Richard H., 1992. *Epices et aromates*. Edition. Tec & Doc-Lavoisier, paris, 339 p.

[20] Block E, Ahmed S, Jain MK, Crecely RW, Apitz-Castro R and Cruz MR 1984 (E,Z)-Ajoene: A potent antithrombotic agent from garlic. *Journal of the American Chemical Society*.106, 8295-8296.

- [21] M.R.Meena et Sethi V. 1994 ,Antimicrobial activity of the essential oils from spices.Journal of Food science and Technology Mysore,31 ,68-70.
- [22] Schroeder.M.P., Messinea.A-M.methods for comparing the antimicrobial activity of essential oils and other aqueous insoluble compounds, Bulletin of the National formulary commitee(17) :213-218.
- [23] Haydar.H., Ozcon.M., Demir.F., Çlisir.S., 2005.Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.), Journal of Food Engineering68 463-469.
- [24] Najjaa.H., Neffati.M., Souari.S., Ammar.E.2007.Essential oil composition and antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum* L., a North African endemic species, Comptes.Rendus.Chimie10 820-826
- [25] Biljana.B., Mimica-Dukic.N., Samojlik.I., Goran.A., Igc.R., 2008.Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), Food Chemistry111 925-929
- [26] Yara S. Queiroz, Emília Y. Ishimoto, Deborah H.M. Bastos, Geni R. Sampaio, Elizabeth A.F.S. 2009 ,Torres,Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products In vitro antioxidant activity. Food Chemistry 115,371–374.
- [27] Benzeggouta.N., 2012 Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments, thèse de magister,université de Constantine 123p.
- [28] Benkabilia.N., 2004, Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*), lebensm-Wiss.u.-Technol.37.263-268.
- [29] Balaji.M.,Ramgopal.M.,T.MuraliKrishna., 2012, Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*,Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 391-395.
- [30] Werner M., 2002. Les huiles essentielles: réveil du corps et de l'esprit. Ed. Vigot, Collection Santé Bien-être, 95 p.
- [31] Willem J.P., 2002. Les huiles essentielles : médecine d'avenir. Ed. Dauphin, Paris, 311 p.
- [32] Bachelot C., Blaise A., Corbel T., Le Guernic A., 2006. Les huiles essentielles. Licence de Biologie, Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, France, 26 p.
- [33] Lucchesi E.M., 2005. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes: Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat, Université de la

Réunion. 143 p.

[34] Forkmann G., Martens S., 2001. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 12, 155 – 160.

[35] Basil A., Jimenez-Carmona M.M., Clifford A.A., 1998. Extraction of rosemary by super heated water. *Food Chemistry*, Vol. 46, 5205 – 5209.

[36] Vermin G., 1982. *Arômes alimentaires et développement récent*. Edition. Apria, 308p.

[37] Garnero J., 1996. *Huiles essentielles*. Ed. Techniques de l'ingénieur, 1 – 45.

[38] Lardy J.M., Haberkorn V., 2007. *Les huiles essentielles : principes d'utilisation*. *Kinesither Review*, N°. 61, 18 – 23.

[39] Bruneton J., 1999. *Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinale*. Tech & doc-Lavoisier, Paris, 585 p.

# *Annexes*



## Annexe 1

### **Bouillon nutritif**

- Peptone .....10 g
- Extrait de levure .....5 g
- Chlorure de sodium .....5g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

Répartition dans des tubes a essais et autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

### **Gélose Plat Count Agar (PCA)**

Pour la préparation d'un litre de gélose Plat Count Agar (PCA) on introduit dans une fiole :

- Peptone.....5.0 g
- Extrait de levure.....2.5 g
- Glucose.....1.0 g
- Agar.....20 g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

Répartition dans des flacons et autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

### **Gélose Yeast Malt Agar (YMA)**

Pour la préparation d'un litre de gélose Yeast Malt Agar (YMA)on introduit dans une fiole :

- Peptone de viande.....5 g
- Extrait de levure .....3 g
- Extrait de malt.....3 g
- Glucose .....10 g
- Agar .....20 g
- Eau distillée.....qsp 1000 ml

Répartition dans des flacons et autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

### **Les solutions de l'activité antioxydante et le dosage des polyphénols**

#### **La solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5%) :**

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> .....7.5g.
- Eau distillée.....qsp 100 ml.

#### **Le réactif de Folin :**

- Folin.....5ml.
- Eau distillée.....qsp 50 ml.

#### **Le DPPH :**

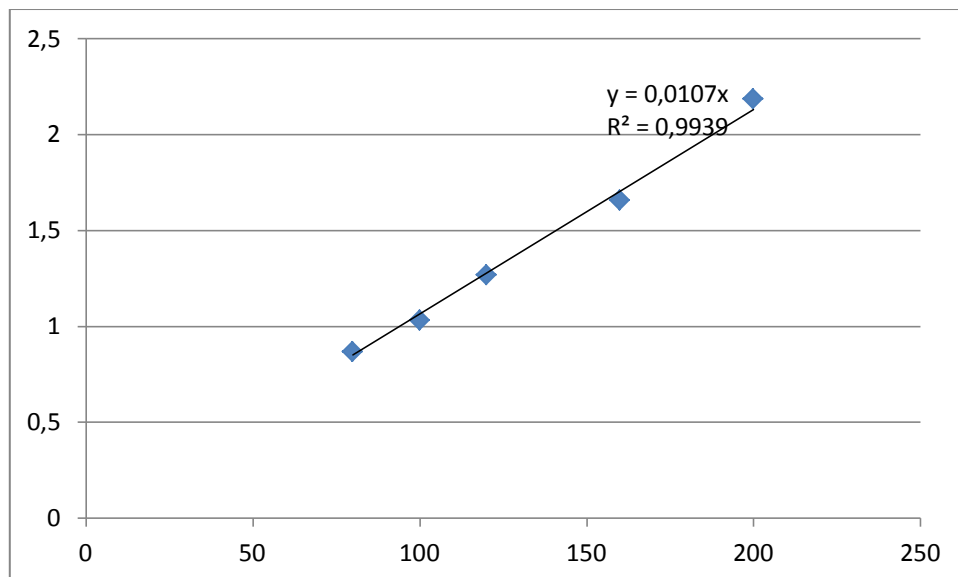
- DPPH.....2.4g.
- Ethanol .....qsp 100ml.



## Annexe 2

- **Courbe d'étalonnage d'acide gallique**

Concentration acide gallique (mg/L)	La densité optique
0	0
80	0,867
100	1,032
120	1,268
160	1,657
200	2,187



**La courbe d'étalonnage d'acide gallique**

## Résumé

Ce travail a été consacré à la détermination des activités antioxydante et antimicrobienne de l'ail. Nous avons extrait les concrètes des bulbes d'ail qui ont subi ensuite des tests afin de déterminer leurs propriétés biocide (pouvoir antimicrobien et antioxydant). La récupération de la concrète a été réalisée par deux procédés : extraction en mode de batch et extraction par soxhlet.

La concrète présente une activité antimicrobienne assez intéressante alors que son activité antioxydante est relativement faible.

**Mots clés :** bulbe d'ail, extraction par soxhlet, extraction en mode de batch, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

## Abstract

This work was devoted to the determination of antioxydant and antimicrobial activities of garlic. We extracted the concrete of the garlic bulbs which were then tested in order to determine their biocide properties (antioxidant and antimicrobial potency). The recovery of concrete was carried out by two processes: extraction in mode of batch and extraction by soxhlet.

The concrete one presents a rather interesting antimicrobial activity whereas its antioxydant activity is relatively weak.

**Key words:** garlic bulb, extraction by soxhlet, extraction in mode of batch, antioxydant activity, antimicrobial activity.

## ملخص.

كرس هذا العمل لدراسة الخصائص المضادة للأكسدة و للنشاط البكتيري لمستخلص نبتة الثوم (فصوص الثوم)

تم استخلاص فصوص الثوم بطريقتين مختلفتين الطريقة الغير المستمرة و (الطريقة المستمرة) (صو كسلى )

مستخلص الثوم المتحصل عليه يتميز بخصائص مضادة للنشاط البكتيري مهمة على عكس خصائصه المضادة للأكسدة التي تعتبر ضعيفة نوعا ما, لكون النبات المستخدم خلال هذا العمل كان من مخزن.

**الكلمات المفتاحية :** فصوص الثوم، الطريقة الغير المستمرة و (الطريقة المستمرة) (صو كسلى) لاستخلاص , للنشاط البكتيري، نشاط الأكسدة

