



N° Ref :.....

Centre Universitaire

Abdel Hafid Boussouf Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

En : - Filière: Sciences Biologiques

- Spécialité : Biologie Appliquée et Environnement: biotechnologie végétale et amélioration des plantes

Thème

Etude comparative entre les activités antibactériennes des huiles essentielles de quatre variétés appartenant à l'espèce *Allium Sativum L.*

Préparé par : Guebli Saida
Laib Yassamina

Soutenu devant le jury :

Président : M^{eme} Ben makhlouf. Z

Grade : Maitre-assistant A

Examineur : M^{elle} Bouassaba.K

Grade : Maitre-assistant A

Promoteur : M^{eme} Boukaria. S

Grade : Maitre-assistant A

Année universitaire : 2014/2015



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سنة ١٤٣٥



Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah, le clément et le miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

*Nous remercions notre encadreur de son grand aide durant la réalisation de notre travail, elle est orientée nous vers le succès avec ses connaissances et partageants des idées et aussi l'encouragement tout le long de notre épreuve, comme elle a été présentée à tout moment qu'on a besoin de lui : **M^{me} Boukeria Sabah.***

*Nous voudrions exprimer nos vifs remerciements à **M^{lle} Rabhi Nourelhoda** pour ses conseils éclairés.*

*Nous voudrions ensuite exprimer toute notre gratitude et nos vifs remerciements à l'équipe de laboratoire de centre universitaire de Mila en particulièrement **M^{me} Warda** pour leur soutien, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.*

*Nous adressons aussi nos sincères remerciements à l'ensemble des **enseignants** de Centre université de Mila qui ont contribué à notre formation.*

*Nous remercions l'ensemble des membres du **jury** pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail, et plus particulièrement, **M^{me} Ben makhlof. Z** qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire .nous sommes très reconnaissant envers **M^{elle} Buassaba .K.**d'avoir accepté de participer d'examiner ce travail.*

En définitive, nous remercions toute personne qui a participé de près ou de loin, de façon directe ou indirecte, à la réussite de ce travail pour lequel nous avons tant consacré en y mettant aussi tout notre cœur.

Merci à toutes et à tous les mains qui m'ont été tendues...

Yassamina et Saida



Dédicaces

*A l'aide de **dieu** tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,
j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de
ma vie ma **mère** qui ma apporté son appui durant toutes mes années
d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance,
courage et sécurité.*

*A mon cher **père** qui ma appris le sens de la persévérance tout au
long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses
encouragements.*

A mes Sœur et mes Frères

A Mes chers oncles, tantes, cousines.

A toute ma famille, proche ou éloignée

A toute mes Amis et mes collègues

A tous ceux qu'ont crus en mes succès.

A toute la promotion de master 2015

Saida



Dédicaces

Mes très chers Parents,

Vous qui avez toujours cru en moi et su me redonner confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous. Acceptez ce travail comme le témoignage de mon profond amour et mon attachement indéfectible.

A mes chères sœurs Samia, Souad, Hassiba et Widad

Et mes frères Abdelhakim, Bilal, Abdelmalk, Abdelhalim, Fars et Nadjib

A mes nièces Lyne, Nada et Lamais

A tous mes Amis (es) Kaltouma, Razika et Rida

A tout mes enseignants et mes collègues

A tous les miens.

Je dédie ce travail

Sommaire

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : les plantes médicinales

I.1.Historique.....	03
I.2.Définition de la Phytothérapie.....	04
I.3.Définition de la plante médicinale.....	04
I.4.La famille de liliacée.....	04
I.5.L'espèce <i>Allium sativum</i> L.....	05
I.5.1. Classification.....	05
I.5.2.Description.....	05
I.5.3.Origine.....	06
I.5.4.Situation économique.....	06
I.5.5.Les sous espèces de l'ail.....	07
I.5.6.Mode de culture.....	08
I.5.7.Composition chimique.....	08
I.5.8.Propriétés pharmacologiques et emplois.....	10
I.5.9.Récolte.....	12
I.5.10.Conservation.....	12

Chapitre II : Les huiles essentielles

II.1.Définition.....	13
II.2.Origine des huiles essentielles.....	13
II.3. Répartition,localisation.....	14
II.4.Rôle physiologique.....	14
II.5.Propriétés physico-chimiques.....	14
II.6. Composition chimique.....	15
II.6.1. Les terpénoïdes.....	15
II.6.2. Les monoterpènes.....	15

II.6.3 .Sesquiterpènes.....	15
II.6.4. Les composés aromatiques.....	15
II.6.5. Les composés d'origines diverses.....	15
II.7.Méthodes d'extraction.....	18
II.7.1. La distillation.....	18
II.7.2. Extraction par micro-ondes.....	19
II.7.3.Expression à froid.....	20
II.7.4. Extraction par solvants organiques.....	20
II.7.5.Extraction par fluide à l'état supercritique.....	21
II.8.Toxicité des huiles essentielles.....	22
II.9. Domaines d'utilisation.....	22
II.9.1. phytothérapie.....	22
II.9.2. Utilisation en aéro-ionisation.....	23
II.9.3. Parfumerie et cosmétologie.....	23
II.9.4.Industrie alimentaire.....	23
II.10.Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des HES	23
II.10.1. Facteurs intrinsèques.....	24
II.10.2 Facteurs extrinsèques.....	24
II.11. Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles.....	25
II.11.1 .Chromatographie en phase gazeuse(CPG).....	25
II.11.2.Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM).....	25
II.12. Production mondiale.....	26
II.13.La conservation des huiles essentielles.....	27
<i>Chapitre III : Activité antibactérienne</i>	
III.1.Définition de l'activité antibactérienne.....	28
III.2.Quelques types des bactéries.....	28
III.3.Les activités antibactériennes des huiles essentielles.....	29
III.4.Mode d'action antibactérien des huiles essentielles.....	30
III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des HE.....	31
III.5.1. Méthode de l'aromatogramme.....	31
III.5.2. Méthode de microatmosphères.....	32
III.5.3. Méthode de dilution.....	33

Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes

1. Matériel.....	34
1.1. Matériel végétal.....	34
1.2. Matériels du test de l'activité antibactérienne.....	35
1.2.1. Souches bactériennes.....	35
1.2.2. Les antibiotiques.....	36
1.2.3. Milieux de culture.....	36
2. Méthodes.....	36
2.1. Extraction.....	36
2.1.1. Préparation du matériel végétal.....	36
2.1.2. Hydrodistillation.....	36
2.1.3. Calcul de rendement.....	38
2.2. Activité antibactérienne.....	38
2.2.1. Méthode de diffusion par disque (l'aromatogramme).....	38

Résultat et Discussion

1. Résultats de l'extraction de l'huile essentielle.....	42
2. Résultats de l'activité antibactérien.....	44
2.1. Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques.....	44
2.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de l'huile essentielle et leurs dilutions de quatre variétés de l'ail.....	47

<i>Conclusion</i>	57
--------------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Figure 01: L'ail avec la spathe membraneuse spécifique, terminée en pointe.....	06
Figure 02: Allyl 2-propenethiosulfinate (allicine).....	09
Figure 03 : S-allylcysteinesulfoxide (alliine).....	09
Figure 04 : Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (Bakkali et <i>al.</i> , 2008).....	17
Figure 05 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile (Hernandez Ochoa, 2005).....	18
Figure 06 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.....	19
Figure 07 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes (Lagunez-Rivera, 2006).....	20
Figure 08 : Système d'extraction par les fluides supercritiques (Douglas et <i>al.</i> , 2003).....	21
Figure 09: Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles (Burt, 2004).....	31
Figure 10: Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (ZAIKA, 1988).....	32
Figure 11 : Les bulbes d' <i>Allium Sativum</i>	34
Figure 12 : Localisation géographique de station expérimentale ITCMI .OEB.....	35
Figure 13: Préparation du matériel végétal.....	36
Figure 14 : Les étapes de l'extraction les HE de l'ail par la méthode d'hydrodistillation ..	37
Figure 15 : Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne.....	41
Figure 16 : Pourcentages des HEs de quatre variétés de l'ail obtenus par l'hydrodistillation	43
Figure 17 : Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées.....	45
Figure 18 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition(en mm) des deux antibiotiques sur les différentes souches testées.....	47
Figure 19 : Effet de l'HE de la variété Rouge Locale sur les bactéries étudiées.....	49
Figure 20 : Effet de l'HE de la variété Messidrom sur les bactéries étudiées.....	51
Figure 21 : Effet de l'HE de Mocpta Bulgar sur les bactéries étudiées.....	53
Figure 22 : Effet de l'HE de la variété Germidour sur les bactéries étudiées.....	54
Figure 23: Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition(en mm) de l'extrait brute de quatre variétés de l'ail testés avec différentes bactéries	56

Tableau 01 : Production mondiale de l'ail en tonne de 2003 et 2004.....	07
Tableau 02 : Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux pays producteurs dans le monde en 2008 (Perfumer et Flavorist., 2009).....	26
Tableau 03 : Liste des souches bactériennes étudiées.....	35
Tableau 04 : Evaluation de l'effet antibactérien selon le diamètre d'inhibition.....	40
Tableau 05 : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer la CMI.....	40
Tableau 06 : Les pourcentages des rendements en huile essentielle des variétés étudiées.....	42
Tableau 07 : Propriétés organoleptiques des différentes huiles essentielles d' <i>Allium sativum</i> ..	44
Tableau 08 : Diamètre de zone d'inhibition en mm en présence de deux antibiotiques.....	45
Tableau 09 : Diamètres de zones d'inhibitions en (mm) de l'extrait brut de l'huile essentielle de quatre variétés d' <i>Allium sativum</i>	47
Tableau 10 : Valeurs des CMIs de l'huile essentielle de l'ail RL.....	48
Tableau 11 : Les valeurs des CMIs de l'huile essentielle de Messidrom.....	50
Tableau 12 : Valeurs des CMIs de l'huile essentielle de Mocpta Bulgar.....	52
Tableau 13 : Valeurs des CMIs de l'huile essentielle de Germidou.....	54

Liste des abréviations

AFNOR :	Association française de normalisation
ATCC :	American type culture collection
BN :	Bouillon nutritive
°C :	Degré celsius
CHU:	Centre hôpital universitaire
CMB :	Concentration minimale bactéricide.
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CN₁₀ :	Gentamicine
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
DADS :	Diallyl disulfure
DATS :	Diallyl trisulfure
DMSO :	Dimethylsulfoxyde
DL :	Dose Létale
DO:	Densité optique.
ERV :	Entérocoques résistants à la vancomycine
g :	Gramme (unité de mesure de poids)
Gd :	Germidour
ha :	hectare (unité de surface agricole)
HD :	Hydrodistillation
HE :	Huile essentielle
HR :	Humidité relative.
ITCMI:	Institut technique des cultures maraichères et industrielles
K.p :	Klebsiella pneumoniae
MB:	Mocpta bulgar
Md:	Messidrom
mg :	Milligramme (sous-unité du gramme = 10 ⁻³ g)
MH:	Gélose mueller-hinton
Mm :	Millimètre (sous-unité du mètre = 10 ⁻³ m)
MS :	Matière sèche.
MTT :	Methyl thiazoldiphenyl tetrazolium
OEB :	Oum el bouaghi
RL :	Rouge locale
SARM :	Staphylocoques résistants méthicilline
SM :	Spectrométrie de masse

Liste des abréviations

Subsp :	Sous espèce
Sxt₂₅ :	Cotrimoxazol
T :	Température (en °C)
UFC:	Nombre de colonie formant des unités
V/V :	Volume par volume
% :	Pourcentage
µm :	Micromètre
µl :	Microlitre
µg :	Microgramme (sous-unité du gramme = 10 ⁻⁶ g)

Introduction

Générale

Introduction Générale

Depuis longtemps, les plantes médicinales ont été employées en phytothérapie comme remèdes aux maladies humaines vue leur richesse en centaines, voire en milliers de composants de valeur thérapeutique, à travers les siècles les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation de ces plantes dont leur savoir a été transmis de génération en génération (Larousse , 2001).

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés en médecine. En effet, durant les 20 dernières années, il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminué. Les bactéries en sont devenues de plus en plus résistantes (Matyar et al ., 2008).

Face aux limites thérapeutiques, des antibiotiques classiques ont poussé les scientifiques à orienter les recherches vers des nouvelles voies et surtout l'utilisation des principes actifs des plantes (composés phénoliques, alcaloïdes, huiles essentielles...) comme agents antibactériens.

Les huiles essentielles comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes aromatiques, elles possèdent des propriétés plus ou moins connues dont leur vertu anti infectieuse est de loin celle qui est la mieux établie, cependant l'évaluation des propriétés Phytothérapeutiques des huiles essentielles notamment leur activité antibactérienne demeure une tâche très intéressante et utile en particulier pour les plantes médicinales les plus connues et les plus utilisées en médecine traditionnelle, l'activité thérapeutique des huiles essentielles dépend principalement de leur composition chimique (Bruneton et al., 1999).

L'ail (*Allium sativum*) est l'une des plus anciennes plantes qui a été utilisée depuis plus de 400 années comme condiment ou aliment ou en médecine. Ses propriétés antibactériennes, antimicrobiennes et antiseptiques datent bien avant le début de l'histoire humaine (Choi et al., 2005). Plusieurs auteurs (environ 7000 travaux publiés) se sont intéressés à l'étude des substances bioactives de cette plante et leur mode d'emploi (Moore and Atkins., 1977 ; Essman, 1984). Toutes les activités biologiques de l'ail, sont liées à la présence des composés organosulfurés et phénoliques.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties. La première partie propose une mise au point bibliographique. Elle est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'étude des plantes médicinales. Le second chapitre traite les huiles essentielles , le troisième chapitre est consacré à l'étude de l'activité antibactérienne.

Introduction Générale

Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel végétal, puis l'extraction des huiles essentielles et enfin, l'étude de son activité antibactérienne.

Partie

bibliographique

Chapitre I

Les

Plantes

Médicinales



I.1.Historique :

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (Nostro et *al.*.,2000) et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires et bien sûr cout élevé de médecine conventionnelle (Schnaubelt,1998).

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Cependant l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 ans av .J.C.).L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade (Fouché et *al.*, 2000).

Dans les civilisations chinoise, indienne (médecine ayurvédique) ou aztèque, on trouve la trace d'utilisations médicinales très anciennes. Le premier livre de matière médicales, le Shen Nung Ben Cao jing (Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung), fut rédigé vers 2900 avant J.-C. 4000 ans avant.J.-C., les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner : 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les Egyptiens (Fouché et *al.*, 2000). Le soin de la peau a commencé 3.000 ans avant naissance du Christ, quand les Egyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures de mur de temple (Dweck, 2002).

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5^e siècle av.J.-C.), utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou des émétique (vomitifs).Théophraste (370-285av.J.-C.) Classe les plantes dans son ouvrage *Historia plantarum* (Fouché et *al.*, 2000).

A l'apogée de l'empire arabe (dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne), tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 7^e et 9^e siècle).Les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecins et en pharmacie : Abu Bakr al-Rasi ou Rhazés (865-925), fut l'un des grand médecins de son

temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne (980-1037) qui écrivit le « Canon de la médecine ». Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650. Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le très complet Somme des Simples : ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs (Fouché et *al.*, 2000).

I.2. Définition de la Phytothérapie :

La phytothérapie, du grec phyton = végétal et therapein = soigner, est étymologiquement l'art de soigner par les plantes. Autrement dit, contrairement à l'allopathie qui utilise majoritairement des principes actifs de synthèse, la phytothérapie emploie les plantes, donc des principes actifs végétaux (Olivier, 2014).

Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, la phytothérapie fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces (Zeghad, 2009).

I.3. Définition de la plante médicinale :

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth *et al.*, 1986). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj et *al.*, 2007).

Aujourd'hui, la thérapeutique continue de recourir aux plantes de deux façons :

- L'extraction industrielle de substances naturelles pures.
- Les médications familiales simples (utilisant directement une partie de plante) ou plus innovantes (poudre, extraits) dans les pathologies mineures ou en thérapeutique d'appoint (Dutertre, 2011).

I.4. La famille de liliacée :

Les liliacées (liliaceae) sont des monocotylédones cosmopolites, comprenant plusieurs milliers d'espèces. Vivaces le plus souvent caractérisées par un rhizome ou par un bulbe, surtout dans les pays tempérés (ex : tulipe, jacinthe, muguet, oignon, ail, scille), elles sont parfois un port d'arbre ou de liane dans les pays chauds (ex : aloès, yucca, dragonnier).

Le genre *Allium* comprend plusieurs centaines d'espèces (ex : poireau, oignon, ciboule) originaire de l'hémisphère Nord (Callery et Emma ., 1998).

Sous le nom de liliacées, donné par Tournefort à l'une de ses classes, il comprenait beaucoup des plantes qui forment aujourd'hui des familles particulières, telles que les narcissoides, les iridées, les colchicacées, etc. toutes ces plantes ont en effet, entre elles de très grands rapports, et leur ensemble forme le groupe le plus brillant de tout le règne végétal-Noblesse, élégance et pureté des formes, éclat et variété des couleurs, délices du parfum, la nature, d'une main prodigue, s'est plus à répandre tous ses dons sur cette belle famille (Huitleme, 1818).

I.5. L'espèce *Allium sativum* L:

I.5.1. Classification: (Burdock ,1995).

Royaume :	Plante
Sous royaume :	Trachéophyte = plantes vasculaires
Embranchement :	Spermatophytes ou Phanérogames = plantes à graines
Sous embranchement :	Angiospermes = plantes à fleurs
Classe :	Monocotyledonae
Sous classe :	Liliidae
Ordre :	Liliales
Famille :	Liliaceae ou Liliacées
Genre :	<i>Allium</i>
Espèce :	<i>Allium sativum</i> L.
Nom commun :	Ail
Nom en anglais :	Garlic

I.5.2. Description :

L'ail (*Allium sativum*) est une plante bulbeuse riche en composés soufrés; il est cultivé depuis plusieurs centaines d'années, et est utilisé comme condiment et parfois comme agent thérapeutique.

La qualité de l'ail est évaluée par ses caractéristiques sensorielles, principalement la couleur et l'intensité de la saveur (Mendez Lagunas ,2007) .

L'ail (*Allium sativum*) a des feuilles plates, longues et étroites, la tête d'ail est un bulbe constitué par des caïeux, fixés sur un plateau d'où partent les racines. L'ensemble des caïeux est enveloppé dans une fine pellicule blanche ou rose. Le nombre de caïeux par bulbe varie de 5 à 16 (Medjoudj, 2007).

D'une tige sortant du bulbe et se terminant en ombelle globuleuse, elle peut atteindre 1.2 m de haut. Avec des fleurs blanches ou rougeâtres entourées, avant la floraison, d'une longue spathe membraneuse caduque, terminée en pointe.

L'odeur, faible, se développe forte et soufrée dès que les tissus sont lésés. Parmi les "*Alliums*", l'ail possède la plus puissante et pénétrable odeur, les Grecs l'appelaient "*rose puante*"(Benzeggouta, 2005).



Figure 01: l'ail avec la spathe membraneuse spécifique, terminée en pointe.

I.5.3.Origine :

L'ail provient à l'origine d'Asie centrale. Il y a environ 10 000 ans, il s'est répandu progressivement en Extrême, en Arabie, en Égypte et dans le Bassin méditerranéen, transporté par les marchands au gré des routes commerciales. Ce bulbe est sans doute l'un des légumes les plus anciennement cultivés par l'homme qui l'utilisait autant pour son alimentation que pour sa santé. (Callery et Emma., 1998).

I.5.4.Situation économique :

Dans le monde, l'ail est cultivé sur environ 380000 ha, dans les deux hémisphères. Il occupe le 14ème rang parmi les 15 espèces légumières les plus cultivées dans le monde, avec une production assez stable de 2,7 millions de tonnes. L'essentiel de la production mondiale 80% sont très dispersées mais se limitent aux zones bénéficiant d'un climat méditerranéen (Chaux et Foury .,1994).

La production mondiale en tonnes de 2003 et 2004 est présentée dans le tableau n°1.

Tableau 1 : Production mondiale de l'ail en tonne de 2003 et 2004.

Pays	2003		2004	
	Quantité	Pourcentage	Quantité	Pourcentage
Chine	10 080 049	74%	10578000	75%
Inde	500 000	3,6%	500000	4%
Corée du sud	391 182	2,9%	378846	3%
Etats unis	283 090	2%	283090	2%
Russie	218 830	1,6%	220000	2%
Egypte	216 000	1,6%	216000	2%
Espagne	188 900	1,4%	157600	1%
Autres pays	1 818 260	13,2%	1612011	11%
Total	13 696 311	100%	14045047	100%

Source : Données FAOSTAT, année 2004. (Microsoft ® Encarta ® 2007. © 1993-2006 Microsoft Corporation).

La production au niveau de la wilaya de Mila est de 4655 quintaux en 2003-2004 pour une surface de 202 ha et de 4142,5 quintaux en 2004-2005 pour une surface de 287 ha (Direction de l'agriculture de la wilaya de Mila).

I.5.5. Les sous espèces de l'ail :

On distingue deux sous espèces, qui se plantent à des époques différentes de l'année : Subsp.ophioscorodon, plantée en automne, et subsp.sativum, plantée au printemps. Les deux sous espèces sont respectivement appelée « ail d'automne » et « ail de printemps ». Indépendamment de la couleur réel du bulbe, l'ail dit blanc est généralement l'ail d'automne, l'ail rose est l'ail de printemps. Le premier est planté d'octobre à décembre selon le climat .l'autre est mis en terre entre novembre et janvier. Dans les deux cas, la récolte a lieu en juin-juillet.

Chacune d'elles comporte ses propres cultivars, en grande partie cultivées dans les régions d'Europe méridionale, dont les plus connues en France sont :

- Subsp.Ophioscorodon
 - ✓ Messidor
 - ✓ Thermidrome
 - ✓ Germidour

- Subsp.Sativum

- ✓ Fructidor

- ✓ Printanor

(Jean, 1999)

I.5.6.Mode de culture :

La plante aime les sols légers, profonds, riches en éléments nutritifs et bien drainés, 3 à 5 cm de profondeur en rangs espacés de 25 cm. Distancer les plants de 10 en 10 cm. les bulbes d'ail pourrissent dans les sols lourds et glaiseux. Il ne faut pas cultiver dans les sols organiques ni utiliser des fumiers frais, cela les fait pourrir.

L'ail préfère les engrais granulaires minéraux. Ne jamais rechausser les bulbes d'ail, la surface du bulbe doit se trouver à l'air. Utiliser les parties extérieures pour la plantation et le centre pour la consommation. (Jean, 2003).

En France, on peut le planter à partir de mai. Dans les régions plus chaudes, la plantation peut se faire jusqu'en automne si elle est fait dans un sol qui se drainera bien en hiver. Les plantations automnales donnent de meilleures récoltes.

Au Canada, la plantation se fait généralement en octobre sous un paillis qui est retiré au printemps. Certains préfèrent planter au printemps dès que le sol est dégelé. La récolte se fait en juillet, début août.

Il ne faut pas planter les gousses des épicereries, elles sont souvent traitées aux anti-germinatifs (Jean, 2003).

I.5.7.Composition chimique :

La chimie de l'ail est tout à fait complexe (Amagase et *al.*, 2001). Les études sur l'ail ont commencé en 1844 avec Wertheim qui a extrait, examiné l'huile essentielle puis a établi le terme "*allyl*" pour le radical C₃H₅ (Jansen et *al.*, 1987). Son travail a été repris, continué et corrigé par Semmler en 1892, qui a publié plus de détails sur les constituants soufrés que contient l'huile de l'ail, il a trouvé des di- et trisulfures, dont le *diallyl disulfure*, comme constituant majeur (Guenther , 1977), à la place du *diallyl sulfure* qu'a identifié Wertheim en 1844 (Block, 1992). En 1909, Rundqvist avance une théorie (plus tard réfutée) que le précurseur des disulfures était un glucoside qu'il a nommé "*alliine*" mais n'a pas l'isoler sous une forme pure (Guenther , 1977).

Les premiers exposés sur les propriétés physiques et la structure chimique du principal composé odorifiant et antibactérien de l'ail écrasé, étaient donnés par Cavallito¹⁰ et *al.* en 1944. Il a suggéré la structure: CH₂=CH-CH₂-S(O)-S-CH₂-CH=CH₂, et a

introduit le terme "*Allicine*" pour ce composant (Benzeggouta, 2005). L'allicine est un composé instable et hautement thermolabile qui se transforme rapidement pour produire de nouveaux composés soufrés (Mendez Lagunas, 2007). D'autres investigations par Stoll et Seebeck montraient que l'allicine est formée par une réaction enzymatique d'un amino acide, appelé "*Alliine*" (Jansen, 1987).

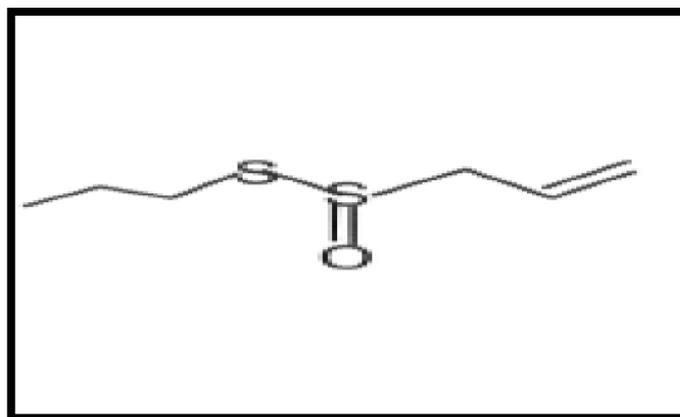


Figure 02: Allyl 2-propenethiosulfinate (allicine)

L'ail contient approximativement entre 0.1 à 0.36 % d'huile volatile (peut aller jusqu'à 0.2-0.5% (Amagase et *al.*, 2001), des enzymes exp: alliinase peroxydase, des protéines 16.8% du poids sec, des minéraux, des vitamines: thiamine – riboflavine – niacine ..., des amino acides (Leung Albert, 1980). Il renferme également des sucres: fructanes, des saponosides (hétérosides de furostanol) mais connu surtout pour ses composés soufrés.

Le constituant principal de l'ail frais non contusé est l'*alliine* ou *sulfoxyde de S-allyl-L- (+)-cystéine*, il y a aussi le S-(E)-1-propenyl cysteine sulfoxyde et le S-méthyl-cysteine sulfoxyde. Ces trois composés sont des amino acides non protéiniques du métabolisme secondaire de l'ail (Block, 1992).

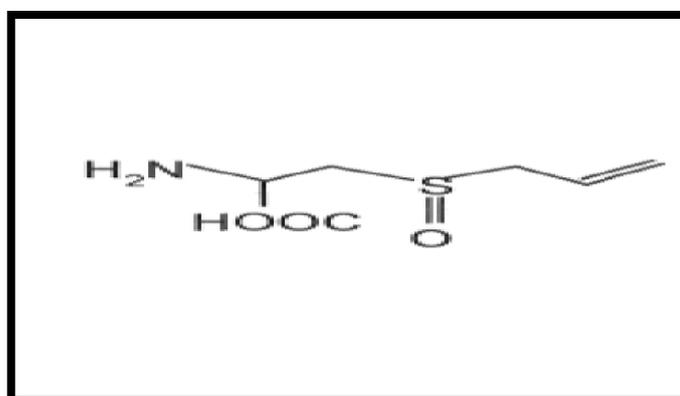


Figure03 : S-allylcysteine sulfoxide (alliine)

Lorsque les tissus sont coupés ou broyés, l'alliine est dégradée par l'enzyme l'alliinase (S-alkyl-L-cystéine sulfoxyde lyase), en acide pyruvique et acide 2-propènesulfénique, ce dernier étant aussitôt transformé en allicine (0.3 % de la masse fraîche) (Bruneton, 1999), qui est un diallyl thiosulfinate (Shankaranarayana et al., 1982), d'autres thiosulfines sont présents: méthane-thiosulfines, allyl méthane-thiosulfines, propyl propanethiosulfines, et autres... (Block, 1992).

L'huile essentielle, qui est obtenue par entraînement à la vapeur et sous pression, contient une variété de sulfures: diallyl disulfure (DADS), diallyl trisulfure (DATS)... (Amagase et al., 2001). Ses caractéristiques: liquide claire, jaune pâle à rouge-orange (Burdock, 1995), piquant, acide et odeur aromatique de l'ail (Shaath, 1995). Les disulfures et les polysulfures sont moins volatils que les sulfures, mais possèdent une odeur plus offensive. Ils surviennent à travers des transformations secondaires provoquées par des enzymes de la plante et la chaleur de distillation (Robinson, 1991).

Les huiles macérées issues de l'ail, sont développées pour leur usage comme condiment (Amagase et al., 2001), mais trouvent aussi d'autres utilisations comme antimicrobiens et comme Anticancéreux (Ohta et al., 1999).

Durant le processus de la fabrication de cette huile (macération de l'ail dans une huile végétale), peu d'alliine est converti en allicine. Mais puisque cette dernière est instable, et se décompose facilement, la préparation de l'huile macérée contient les constituants de la décomposition de l'allicine : vinyldithiines, composés majeurs des préparations à l'huile de l'ail, ajoenes, diallyl disulfure et différents dialk(en)yl sulfures, qui sont liposolubles (Benzeggouta, 2005).

I.5.8. Propriétés pharmacologiques et emplois :

C'est une des plantes les plus étudiées et utilisées hier et aujourd'hui. Il possède des Applications traditionnelles alimentaires et médicinales (Ross et al., 2001). Durant plusieurs siècles l'ail était un principal régime alimentaire, un condiment mais aussi un médicament, et dans plusieurs cultures contre le mauvais œil (Shaath et al., 1995).

Utilisé par les Egyptiens pour éviter les maladies (Richard et Loo., 1992), sur le Papyrus (1500 av. J.C.) il est inscrit que l'ail était un remède contre plusieurs maladies. Dans la Grèce antique et dans l'île de Cos, où la 8e conférence internationale sur les flaveurs s'est tenue, Hippocrate a recommandé plusieurs préparations à l'ail (Shaath et al., 1995). Les Romains l'utilisaient dans tous les potages et en distribuaient à leurs légionnaires avant chaque combat. Preuve qu'ils lui attribuaient déjà des vertus stimulantes

(Satiadev, 1998). Le naturaliste romain, Pline l'ancien a inscrit plusieurs usages de l'ail: pour éloigner les scorpions, désinfecter les morsures de chiens, guérir la lèpre, asthme et épilepsie (Shaath et *al.* , 1995).

Dans la médecine chinoise il était utilisé contre la diarrhée, dysenterie (bactérienne ou parasitaire), tuberculose pulmonaire, hématurie (sang dans les urines), diphtérie, coqueluche, typhoïde, hépatite, trachome, teigne du cuir chevelu ... (Leung Albert ,1980). Les Irlandais, les Danois et les Russes utilisaient l'ail, il y a des centaines d'années pour traiter la toux et le froid (Shaath et *al.*, 1995).

L'ail était considéré comme une panacée (remède à tous), et ce jusqu'au Moyen Age, quand les grandes épidémies de peste mirent alors ses vertus à rude épreuve. Il était utilisé comme remède sous forme de vinaigre à l'ail, ou encore avec d'autres aromates et épices pour combattre la contagion. Les gents pensaient que son odeur puissante éloignait les puces et autres parasites vecteurs de maladies (Satiadev ,1998). Il était aussi utilisé pour traiter la bronchite chronique, mal de dents, douleurs d'oreille, pellicules, hypertension, artériosclérose, hystérie (Leung Albert, 1980).

Plusieurs de ces usages traditionnels ont été repris et vérifiés par des essais cliniques. Du fait que l'ail est riche en fructosanes jusqu'à 75% du poids sec, il est diurétique. C'est un hypotenseur dont l'effet est connu depuis longtemps chez l'homme, et a été confirmé chez l'animal. Egalement un antiathéromateux capable de faire diminuer triglycérides et cholestérol sanguins et d'augmenter le taux des HDL. Une alimentation suffisamment riche en ail diminue l'agrégation plaquettaire et augmente l'activité fibrinolytique, d'où l'intérêt de la plante dans la prévention des thromboses (Bezanger et *al.*, 1990).

C'est aussi un expectorant, larvicide, insecticide, hypoglycémiant, antiviral, et prévient de certains cancers, dont plusieurs études sur le cancer de l'estomac.

Ses propriétés antiseptiques ont été mises à profit depuis des siècles contre des maladies telles que la peste ou le choléra. Louis Pasteur, en 1858, était le premier à avoir constaté que l'ail tue les bactéries. Durant la Première Guerre Mondiale, l'armée Britannique utilisait l'ail pour contrôler les infections. Les docteurs Russes traitaient leurs malades avec de l'ail à défaut de Pénicilline. Ces activités antibactériennes et même antifongiques de l'ail ont été mises en évidence *in vitro* (Benzeggouta, 2005).

L'huile essentielle possède les mêmes usages et propriétés que l'ail frais ou ses extraits (Elnima et *al.* , 1983). Des études récentes montrent l'activité antimicrobienne de l'huile macérée de l'ail contre, des bactéries à gram positif et à gram négatif, des levures et

même peut inhiber la croissance de la bactérie *Helicobacter pylori* responsable du cancer de l'estomac (Yoshida et *al.*, 1998).

Les composés soufrés volatils spécialement: allicine, diallyl disulfure, diallyl trisulfure, ajoènes, vinylthiines, sont généralement considérés responsables de la plupart des activités pharmacologiques.

Enfin, il faut savoir que dès qu'il est cuit, l'ail perd une grande partie de ses propriétés médicinales et antiseptiques. Mieux vaut donc le consommer cru et finement haché, dans certaines pathologies – pour ne pas nuire aux gens avec l'odeur forte – comme le cas de l'oignon, selon le livre de "*la Médecine du Prophète*" ou "*Tibb Ennabaoui*" (Benzeggouta, 2005).

I.5.9.Récolte :

L'ail est considéré comme « mûr » lorsque le tiers supérieur des feuilles est jaune ou sec (Chaux et Foury., 1994 ; Renaud, 2003).

La récolte a lieu en juin -juillet, des rendements de 8 à 12 t/ha et 6 à 7 tonnes/hectare sont possible selon les variétés. Mais les rendements moyens sont souvent inférieurs de 30 à 40% de ces chiffres (Clement ,1981).

I.5.10.Conservation :

L'ail doit être obligatoirement séché, d'abord au champ, pendant quelques jours puis sous hangar ou en grenier ; soit au sol, soit -pour l'ail en botte- sur fil de fer ou en cellules. (Chaux et Foury., 1994).La conservation a lieu dans un local bien aéré et sec ; au froid (de -0,5 à 1 °C) ou au chaud (plus de 18 °C) pour empêcher toute germination. (Clement ,1981).



Chapitre II
Les
Huiles Essentielles

Les molécules actives, impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, sont issues du métabolisme secondaire. Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes. Une partie de ces métabolites secondaires se concentre dans les sacs oléifères, qui sont des poches sécrétrices d'huiles essentielles. L'exploration des huiles essentielles pour la recherche de molécules à activité antibiotique semble donc être une voie intéressante (Elodie, 2010).

II.1.Définition :

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par hydrodistillation ou par expression mécanique (Kalemba et Kunicka., 2003). Elles sont obtenues à partir de feuilles (basilic) , de graines (coriandre) , de bourgeons, de fleurs (rose) , de brindilles, d'herbes, d'écorces (cannelle), de bois, de racines (ail) ou de fruits (citron) , mais également à partir des gommages qui s'écoulent du tronc des arbres. L'hydrodistillation reste le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles, en particulier à des fins commerciales (Burt, 2004). Les métabolites secondaires sont extraits des plantes par un entraînement à la vapeur d'eau. Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison (Gonny et *al.*, 2004). Les huiles essentielles peuvent aussi être obtenues par expression à froid, comme pour les agrumes. De nouvelles techniques, permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression (Santoyo et *al.*, 2005) ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Kimbaris et *al.*, 2006).

II.2.Origine des huiles essentielles :

Les plantes vertes puisent l'eau et utilisent l'énergie solaire et le gaz carbonique présent dans l'air pour synthétiser les glucides, ce processus est appelé photosynthèse ,il se déroule au niveau des feuilles, plus précisément au niveau des chloroplastes qui renferme la chlorophylle, les produits issus de la photosynthèse sont (glucose, NADPH,ATP) constituants une source d'énergies, il contribuent à la génération des nouvelles cellules, il interviennent indirectement dans la biosynthèse des divers composés secondaires tel que les lipides, les hétérosides et les essences. Ainsi les huiles essentielles sont des résidus des métabolismes végétale (Lahrech, 2010).

II.3. Répartition, localisation :

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Il y aurait, selon Lawrence 17500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont repartis dans un nombre limité de familles : *Myrtacées, Lauracées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Opiacée, Cupressacées, Zingibéracées, Pipéracées ...etc.*

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : des fleurs, des feuilles, des écorces, des bois, des racines et des rhizomes .

Dans le cas le plus simple, les huiles essentielles se forment dans le cytosol des cellules où, soit elles se rassemblent en gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles, soit elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques ou des cellules du mésophyle de nombreux pétales (Gehard ,1993). D'autres structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante sont impliquées dans l'accumulation des huiles volatiles. Ces structures regroupent les poils et canaux sécrétrices et les poches sécrétrices (Bruneton, 1999).

II.4. Rôle physiologique :

Beaucoup de plantes produisent des huiles essentielles en tant que métabolismes secondaires. Leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu. Selon Bakkali (2008), les huiles essentielles peuvent avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques , permettant de conserver l'humidité des plantes désertique , réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines , par protection contre la flore microbienne infectieuse , action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables.

II.5. Propriétés physico-chimiques :

On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de cannelle, de girofle et de saffran.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (Rhayour, 2002).

II.6. Composition chimique :

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Gildo, 2006).

II.6.1. Les terpénoïdes :

Le terme terpène rappelle la toute première extraction de ce type de composé dans l'essence de térébenthine. Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés. Ils répondent dans la plupart de cas à la formule générale $(C_5H_8)_n$. Les constituants des huiles essentielles sont très variés. On y trouve en plus de terpènes, des hydrocarbures, des esters, des lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des phénols, des oxydes et autres (Seenivasan, 2006).

II.6.2. Les monoterpènes :

Les carbures sont presque toujours présent. Ils peuvent être acycliques (terpinene, cymène) ou bi cycliques (pinène camphène, sabinene), ils constituent parfois plus de 90 % de l'huile essentielle (citrus, térébenthines) (Bruneton, 2008).

II.6.3. Sesquiterpènes :

Les Sesquiterpènes sont de structures très diverses (C_{15}) : les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents (Chouitah, 2012).

II.6.4. Les composés aromatiques :

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou du girofle (Kunle et okogum., 2003).

II.6.5. Les composés d'origines diverses :

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation. Ces produits peuvent être azotés ou soufrés.

-Alcools : menthol, géraniol, linalool...

-Aldéhydes : géraniol, citronellal...

- Cétones : camphre, pipéritone
- Phénols: thymol, carvacrol ...
- Esters : acétate de géranyle,...
- Acides : acide géranique,...
- Oxydes : 1,8-cinéole,...
- Phénylpropanoïdes ; eugénol.
- Terpènes : limonène, para-cymène,...
- Autres : éthers, composés soufrés, composés azotés, sesquiterpène,... (Inouye et al., 2003).

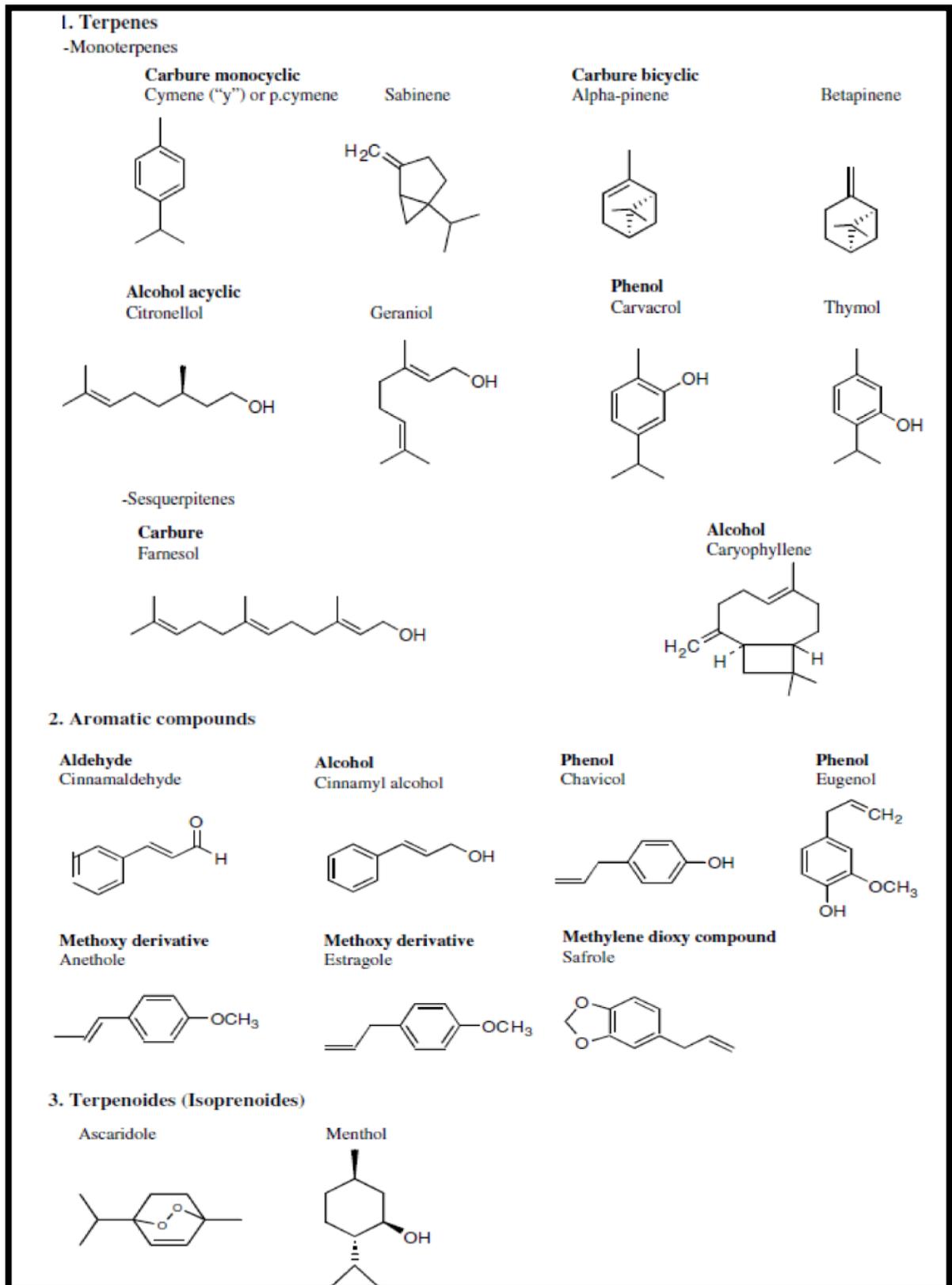


Figure 04: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008)

II.7.Méthodes d'extraction :

II.7.1. La distillation :

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (Franchomme et Penoël., 1990). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydro distillation, l'hydro diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

-L'hydro distillation (*water distillation*). L'hydrodistillation demeure la technique la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements (Ferhat *et al.*, 2010). Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Baser et Buchbauer., 2010). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesi, 2005).

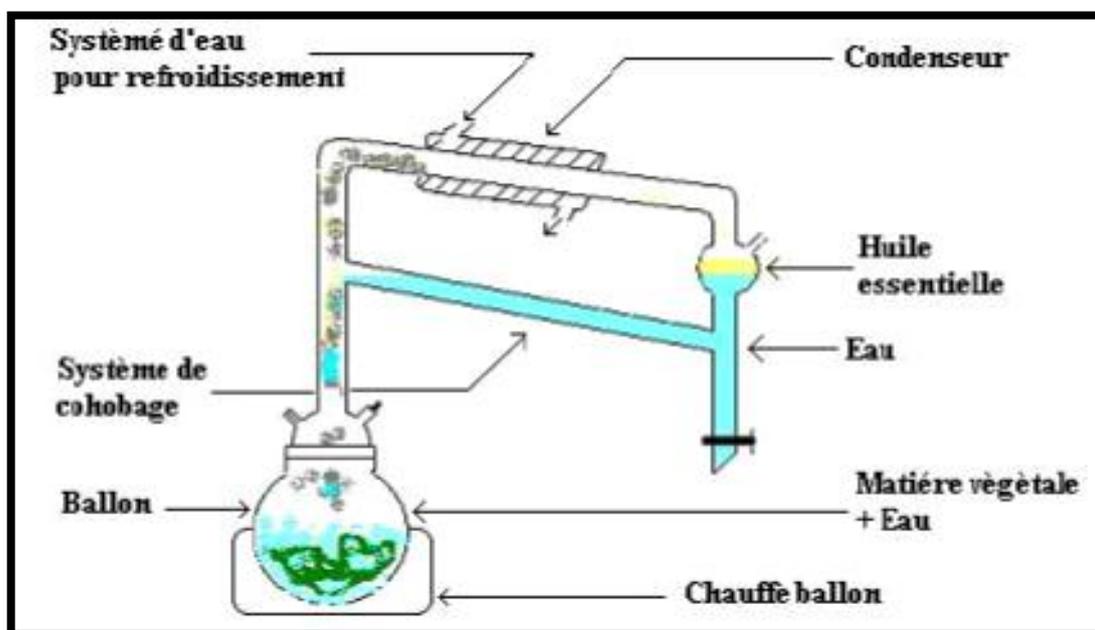


Figure 05 :Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile (Hernandez Ochoa, 2005)

-**La distillation par entraînement à la vapeur d'eau (*steam distillation*)**. Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (Franchomme et Pénéol., 1990).

-**L'hydro diffusion** : Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (*perdescendum*) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » (Richard, 1992).

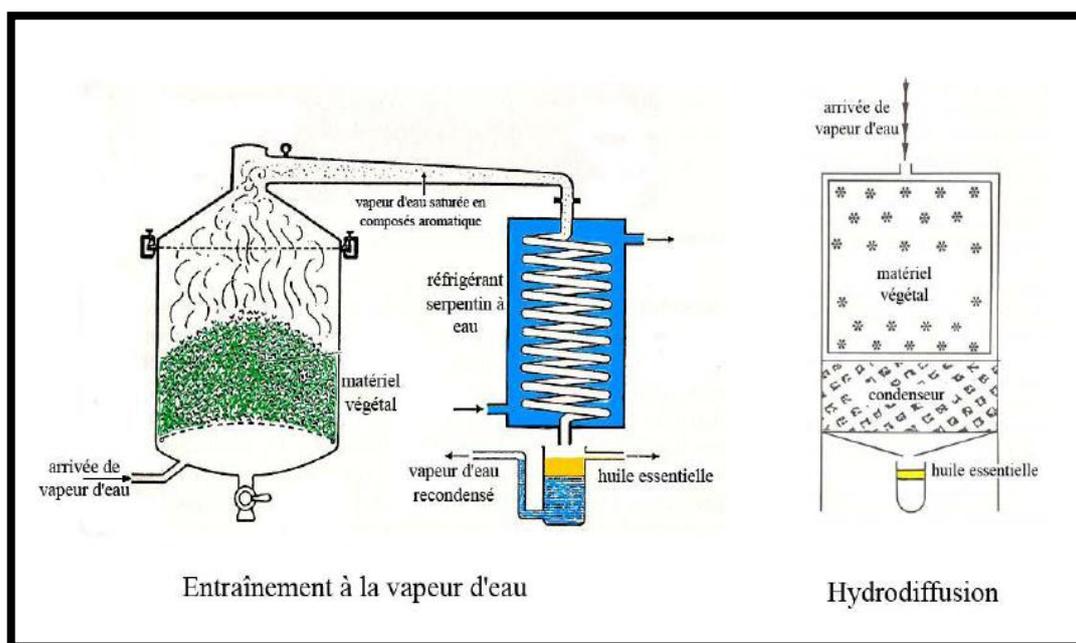


Figure 06 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.

II.7.2. Extraction par micro-ondes :

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (Paré, 1997). Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé).

On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (France Ida, 1996). Ce procédé (Figure 07), très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (Bruneton, 1999). Par ailleurs, l'analyse des huiles essentielles obtenues par cette méthode a montré selon Scheffer (1996) que la composition qualitative des huiles essentielles était la même que celle des huiles obtenues par distillation mais le pourcentage des constituants variait de manière significative.

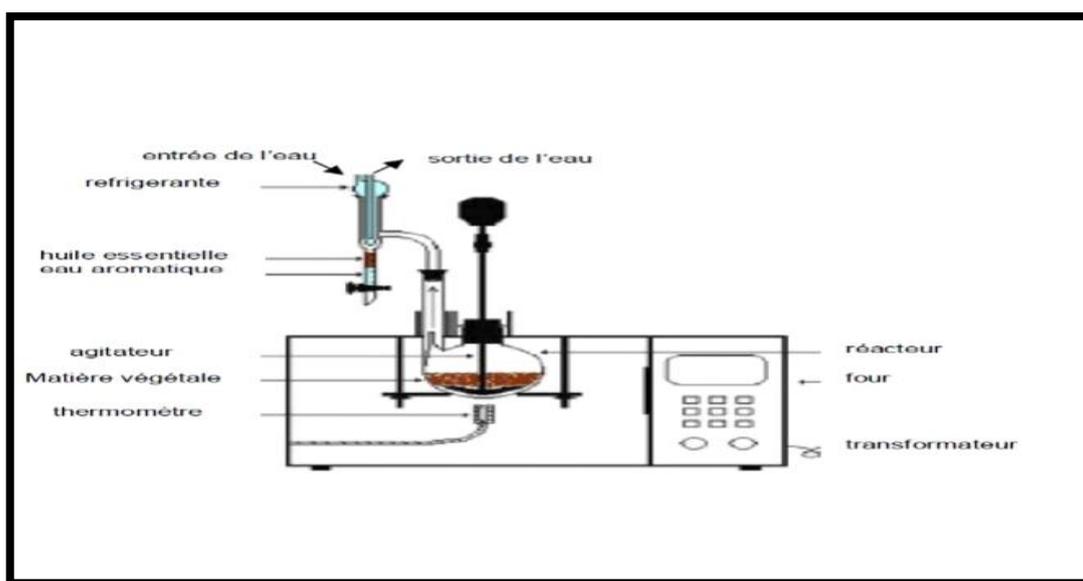


Figure 07: Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes (Lagunez-Rivera, 2006)

II.7.3. Expression à froid :

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices (Basil et al., 1998).

II.7.4. Extraction par solvants organiques :

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (Kim et Lee., 2002).

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient (AFNOR, 2000) :

- ❖ Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau
- ❖ Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilué

- ❖ Des teintures ou solutions non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- ❖ De résinoïdes ou extraits éthanoliques concentrés L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement (Lagunez Rivera, 2006).

II.7.5.Extraction par fluide à l'état supercritique :

L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique met en œuvre généralement le dioxyde de carbone (Aghel et *al.*, 2004).

D'autres travaux de recherche de Luque de Castro et Jiménez (1998) ; Gámiz-Gracia et Luque de Castro (2000) ; Ozel et *al.* (2003) ; Deng et *al.* (2005) montrent l'utilisation de l'eau dans son état supercritique. Dans ce système, le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un compresseur et d'un détendeur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus, les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité de CO₂ (Laib, 2011).

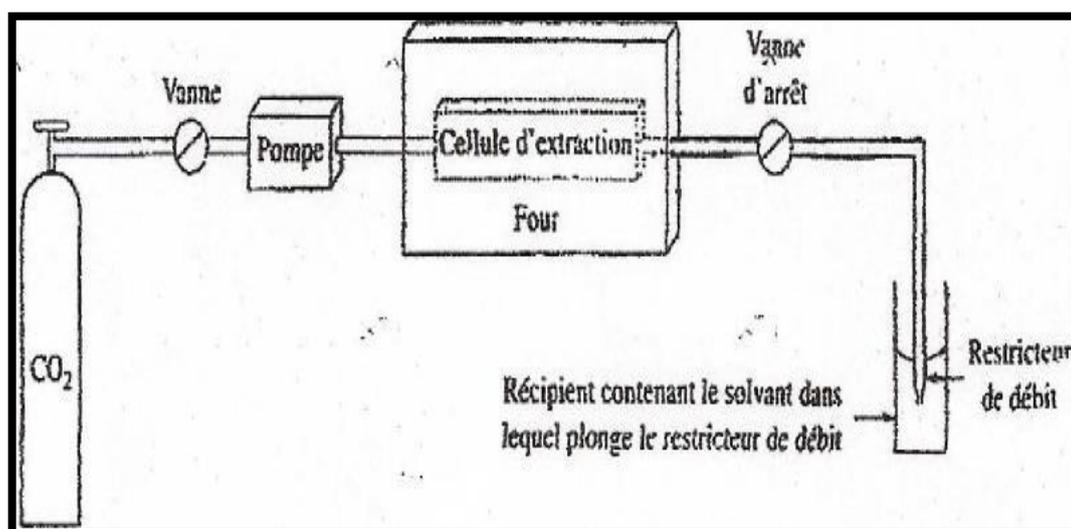


Figure 08 : Système d'extraction par les fluides supercritiques (Douglas et *al.*, 2003).

II.8. Toxicité des huiles essentielles :

Les HE sont des molécules actives. Elles peuvent avoir de graves effets secondaires. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise. Parmi ces effets, citons : des allergisants ou hypersensibilisants, photosensibilisants dus aux furocoumarines, neurotoxiques dus aux cétones, néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier, hépatotoxiques dus aux phénols pris pendant des laps de temps trop importants ou à doses massives L'eugénol, qui est l'un des constituants du Thym, est hépatotoxique. Chez l'enfant, 10 ml eugénol peut conduire à une insuffisance rénale. Il a été démontré que le linalol, l'un des constituants d'une autre espèce de thym, est cytotoxique pour les cellules de la peau humaine (Eisenhut, 2007 ; El kolli, 2008). En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible : la majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une dose létale (DL50) comprise entre 2 et 5 g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle...etc.) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande...etc.). D'autres, une quinzaine, ont une DL50 comprise entre 1 et 2 g /kg : Basilic, Estragon, Hysope (1,5ml/kg). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg ; convulsions apparaissant dès 0,07 g/kg), de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg) (Bruneton, 1999).

II.9. Domaines d'utilisation :**II.9.1. phytothérapie :**

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies. Le terme aromathérapie vient du chimiste Français René-Maurice Gattefosse, qui a utilisé l'HE de lavande pendant la première guerre mondiale pour soigner des blessures et des infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie (Roulier,1992).

Les HE sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisantes dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries (Schwartz et al .,1992). La listerine qui est une solution constituée d'HE de thymol et

d'eucalyptol possède une grande activité bactéricide sur les micro-organismes de la salive et de la plaque dentaire (Kato et *al.*,1990).

II.9.2. Utilisation en aéro-ionisation :

Dans les locaux, on peut aseptiser l'atmosphère avec un ionisateur d'huiles essentielles. Il se forme ainsi des aérosols vrais aromatiques, ionisés, créant de l'oxygène naissant ionique, fortement bactéricide, tout en contribuant à dépolluer l'atmosphère.

Elles servent dans la fabrication du " paragerm ", solution volatile à base d'essences naturelles (citron, lilas) à activité bactéricide, acaricide et fongistatique qui s'est révélée sans aucune toxicité pour l'homme aux doses utilisées (Rhayour,2002).

II.9.3. Parfumerie et cosmétologie :

L'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable (Vargas et *al.*.,1999).

II.9.4.Industrie alimentaire :

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure. Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des HE (Lachowicz et *al.*,1998). Les plantes aromatiques et leur HE sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires. Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des HE (Hammer et *al.*,1999), le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire (Fenaroli,1995). Ils y sont rajoutés pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires. (Bilgrami et *al.*, 1992).

II.10.Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des huiles essentielles :

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes (Benini, 2007). Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante.

II.10.1. Facteurs intrinsèques :

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (Bruneton, 1999). L'influence du stade végétatif (Stefanini et *al.*, 2006), l'organe de la plante (Barry, 2001 ; Chowdhury et *al.*, 2009), les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie (Aprotosoia et *al.* , 2010) et le polymorphisme chimique « chimiotypes ou formes physiologiques » (Anton et Lobstein ., 2005) sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

II.10.2 Facteurs extrinsèques :

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (Mohammad et *al.*, 2009; Olle et Bender., 2010). Il n'y a pas eu mal des travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (Marzoukia et *al.*,2009), les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (Lahlou, 2004).

L'instabilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations, etc. (Lucchesi, 2005).

La méthode d'extraction (Abramson et *al.*, 2007; Silano et Delbò ., 2008) et l'état du matériel végétal (Hettiarachichi, 2008) influent aussi sur la composition et le rendement des huiles essentielles. Il faut aussi signaler que le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles (Bouguerra,2012).

II.11. Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles :

Selon la Pharmacopée Française et Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants (Pibiri, 2006).

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique.

II.11.1 .Chromatographie en phase gazeuse(CPG) :

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles ; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées. La diversité des méthodes d'injection, de détection et le grand choix de colonnes permettent des analyses de plus en plus efficaces. Comme toutes les méthodes chromatographiques, la CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire (Fernandez et Cabrol-bass., 2007).

Dans un CPG, la séparation des composés est réalisée de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne. La CPG permet l'individualisation et quantification des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention) (Barboni, 2006).

II.11.2.Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM) :

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996).

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étages (Pradeau et Cohen., 1992).

-Ionisation : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ.

-Accélération : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.

-Séparation : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge.

-Détection : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.

-Traitement du signal : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

II.12. Production mondiale :

Plusieurs pays tirent une grande partie de leurs ressources de l'exploitation des plantes à huiles essentielles. On estime aujourd'hui à environ 40 000 le nombre d'espèces aromatiques croissant dans le monde dont 3 000 ont été étudiées et 300 sont exploitées industriellement (Souza et al., 2006). Plus de 90 % des espèces à étudier et à valoriser poussent dans les pays tropicaux (Ouamba, 1991). Les principales huiles essentielles produites et les principaux pays producteurs sont résumés dans le tableau n 2.

Tableau 2 : Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux pays producteurs dans le monde en 2008 (Perfumer et Flavorist., 2009).

Huiles essentielles	Production (Tonnes)	Principaux pays producteurs
Huiles d'oranges	51000	USA, Brésil, Argentine
Huiles du citron	9200	Argentine, Italie, Espagne
Huiles de l'eucalyptus	4000	Chine, Inde, Australie, Afrique du Sud
Huile de la menthe poivrée	3300	Inde, USA, Chine
Huile du clou de girofle	1800	Indonésie, Madagascar
Essence de la citronnelle	1800	Chine, Sri Lanka
Huiles de la menthe verte	1800	USA, Chine
Huiles du bois de cèdre	1650	USA, Chine
Huile du patchouli	1200	Indonésie, Inde
Huile de la lavande	1100	France

Teneur: Le rendement des huiles essentielles est souvent de faible quantité 10ml/kg sauf exception de quelques plantes comme par exemple: le bouton floral de girofle 150ml/kg (Lahrech, 2010).

II.13.La conservation des huiles essentielles :

A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement (Valnet, 1984 ; Salle et Pelletier., 1991).



Chapitre III
Activité
Antibactérienne

III.1. Définition de l'activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne correspond à l'activité d'une molécule ou composé présente au sein d'un végétal qui à très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou tue. La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien.

Face à un antibactérien donné, la sensibilité d'une bactérie peut être très différente selon la souche d'appartenance (Nicola et Daniel., 1998).

III.2. Quelques types des bactéries :**➤ *Staphylococcus aureus* :**

- ✓ Nom commun: *Staphylocoque doré* (staph.= grappe de raisin, aureus= doré).

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Micrococcaceae* et se compose de 34 espèces et 13 sous-espèces. *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus fréquente et la plus connue. C'est une coque à Gram positif de 0,5 à 1 µm de diamètre, non sporulé, immobile, aéro-anaérobie, T° optimale: 37, pH optimum: 6-7. Une espèce, *Staphylococcus aureus* (*staphylocoque doré*), tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales (Chambers, 1997).

➤ *Escherichia coli* :

Escherichia coli (bacille à Gram négatif), commensal du tube digestif, est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales. La plupart des *E. coli* se multiplient rapidement (18 à 24 h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, elles sont rondes, plates et à bords réguliers (Nataro et Kaper., 1998).

➤ *Pseudomonas aeruginosa* :

Un certain nombre de bacilles à Gram négatif de l'environnement se comportent comme des bactéries opportunistes et sont souvent à l'origine d'infections nosocomiales. Il s'agit souvent de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques. Une des plus redoutables est *Pseudomonas aeruginosa*, c'est une bactérie mobile, les flagelles sont polaires, aérobie stricts. La température optimale de croissance se situe entre 4 °C et 42 °C. Les souches de cette espèce sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur (Philippon, 1995).

➤ ***Klebsiella pneumoniae* :**

Le genre *Klebsiella* rassemble des bacilles à Gram négatif de 0.3 à 1.0µm de diamètre sur 0.6 à 6 µm de longueur, se présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en courtes chaînes et présentant les caractères généraux de la famille des Enterobacteriaceae (Ayan et *al.*, 2003). Elles sont des germes non mobiles, capsulés avec des colonies a aspect de muqueuses sensibles à la Gentamicine, Kanomycine, Céphalosporine et Polymyxine B mais pas sensibles à la pénicilline. (GIRARD, 2001).

K.p est responsable d'infections diverses : infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires, hépatiques intra-abdominales , septicémies, fasciites nécrosantes etc....et elle est responsable d'environ 10% des infections nosocomiales (Dong et *al.*, 2003).

III.3.Les activités antibactériennes des huiles essentielles :

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes.

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Elodie,2010). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* (Wan et *al.*, 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn et *al.*, 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* (Dorman et Deans., 2000).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (Tohidpour et *al.*, 2010). Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes

comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella entereditis* et *S. aureus* (Shin et Kim., 2005).

III.4.Mode d'action antibactérien des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large due principalement à leur grande affinité aux lipides membranaires grâce à leur nature hydrophobe (Dormans et Deans, 2000). Très peu d'études portant sur le mode d'action des huiles essentielles vis-à-vis des microorganismes ont été réalisées. En général les huiles essentielles empêchent la multiplication, la sporulation et la synthèse des toxines des bactéries. Sur les levures, elles agissent sur la biomasse et la production du pseudomycélium. Sur les moisissures, elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium et la toxicogénèse (Hulin et *al.*, 1998).

Kim et al. (1995) in Hulin et *al.* (1998) rapportent que les huiles essentielles semblent posséder plusieurs modes d'action sur les différents microorganismes. Ces modes d'action sont (Figure 09):

- *interférence avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, provoquant une augmentation de la perméabilité et la perte des constituants cellulaires.
- *altération des différents systèmes enzymatiques dont ceux impliqués dans la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- *destruction ou inactivation du matériel génétique

Chalchat et *al.* (1997) constatent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est hautement dépendante de leur composition chimique notamment de leurs constituants majeurs par l'étude du pouvoir antimicrobien de 13 huiles essentielles d'origine africaine. Les résultats de cette étude montrent qu'il y a une corrélation très étroite entre la composition chimique de ces huiles et leur activité vis-à-vis de 6 microorganismes testés (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*). Les huiles essentielles caractérisées par une faible activité contiennent une grande quantité de composés hydrocarbonés alors que les 3 huiles essentielles qui sont montrées actives sont riches en composés oxygénés.

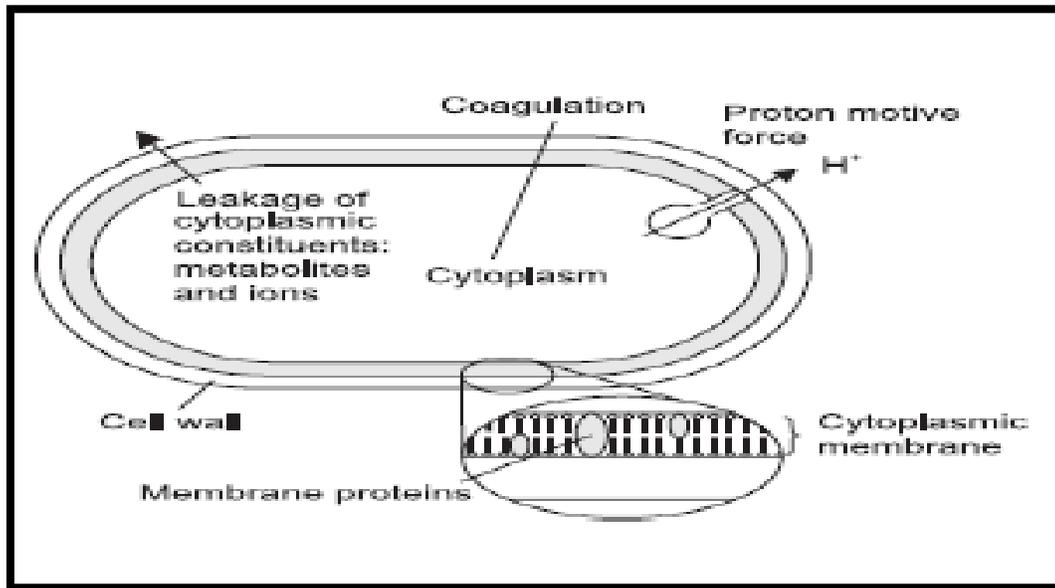


Figure 09: Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles (Burt, 2004)

III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :

Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon (Burt, 2004). Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients (Wilkinson, 2006).

III.5.1. Méthode de l'aromatogramme :

En plus de l'appellation méthode de l'aromatogramme, elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme, méthode de VINCENT, méthode de diffusion dans la gélose (agar). Elle est particulièrement adaptée à l'étude de l'action antibactérienne. Elle permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis à vis de l'huile essentielle donnée. Elle peut être aussi adaptée pour tester d'autres agents antimicrobiens (Bouguerra, 2012).

La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable (10-25mL), déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, papier buvard ou Wattman (6-8mm), préalablement imprégnés de quantités connues d'HE (5-30µL), sont alors placés en surface de la gélose (kechkar, 2008).

Généralement, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition (Wilkinson, 2006).

Une autre technique de diffusion sans disque, elle consiste en l'aménagement d'une cavité dans la gélose. Cette cavité est ensuite remplie d'un volume donné d'huile essentielle qui va diffuser dans la gélose, et on procède, après incubation, à la mesure du diamètre d'inhibition comme dans la technique précédente (Rhayour, 2002).

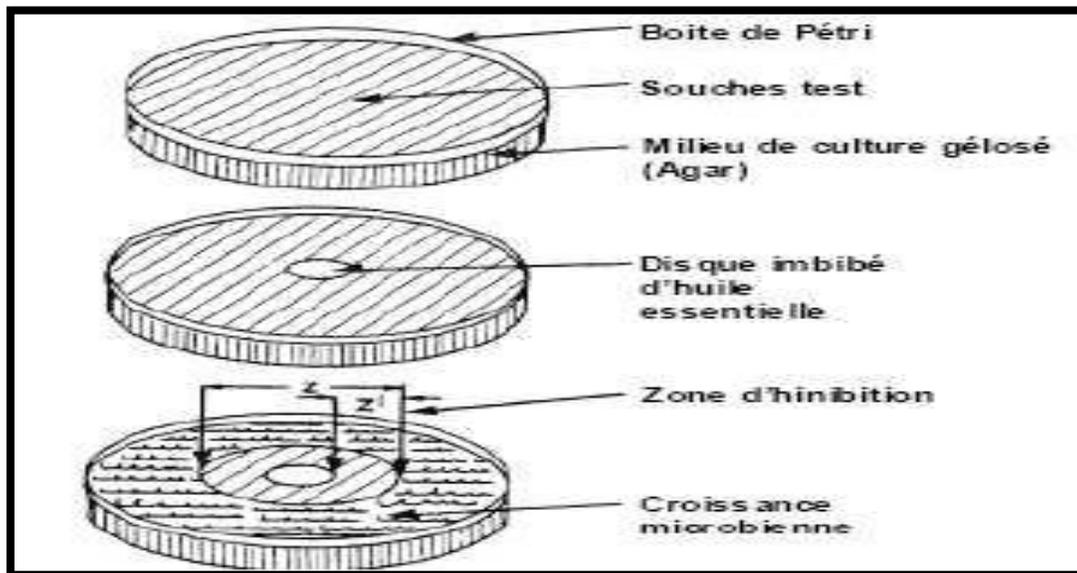


Figure 10 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (ZAIKA, 1988)

III.5.2. Méthode de microatmosphères :

Dans cette méthode, les disques imprégnés par l'huile essentielle sont déposés au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience (couvercle en bas), cette méthode est appelée « Méthode de microatmosphères ». Le disque n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance (De Billerbeck et al., 2002). Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase vapeur sont encore peu nombreux.

III.5.3. Méthode de dilution :

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice (CMI). Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Derwich et *al.*, 2010). L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de 2 concentrations : la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). Ces concentrations nous permettent de connaître la nature de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : bactériostatique ou bactéricide.

➤ Méthode de dilution d'agar :

La méthode de dilution d'agar est plus économique que celle qui se pratique sur milieu liquide, parce qu'elle a beaucoup d'avantages : un grand nombre de souches peuvent être testées immédiatement, la contamination est facilement détectée et le milieu peut contenir des matériaux opaques. Elle consiste à réaliser des dilutions des huiles essentielles, et les incorporer dans le milieu gélosé fondu et refroidi à 45°C, et à tester sur ce milieu les souches bactériennes à étudier (Tepsorn, 2009). Ces dernières sont ensemencées à la surface, soit en stries avec une anse calibrée (Benzeggouta, 2005), soit en point avec des micropipettes (Mayachiew et Devahastin., 2008).

Cette méthode est utilisée comme un indicateur de l'activité antibactérienne, en plus de la recherche de la valeur réelle lorsque c'est possible. Dans la littérature, les études publiées sur la méthode de dilution d'agar pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plante aromatiques ou de leurs huiles essentielles ont employé différents dissolvants pour incorporer les extraits dans le milieu (Su et *al.*, 2008).

➤ Méthode de dilution de bouillon :

La méthode de dilution en bouillon est utilisée aussi pour déterminer les concentrations minimales inhibitrice. Une gamme de dilution de l'huile essentielle est additionnée à une série de tubes contenant un milieu de culture liquide, de composition convenable. Après inoculation des espèces microbiennes étudiées et incubation dans les mêmes conditions, la concentration minimale inhibitrice est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée. C'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble n'est observé dans le milieu (kechkar, 2008).

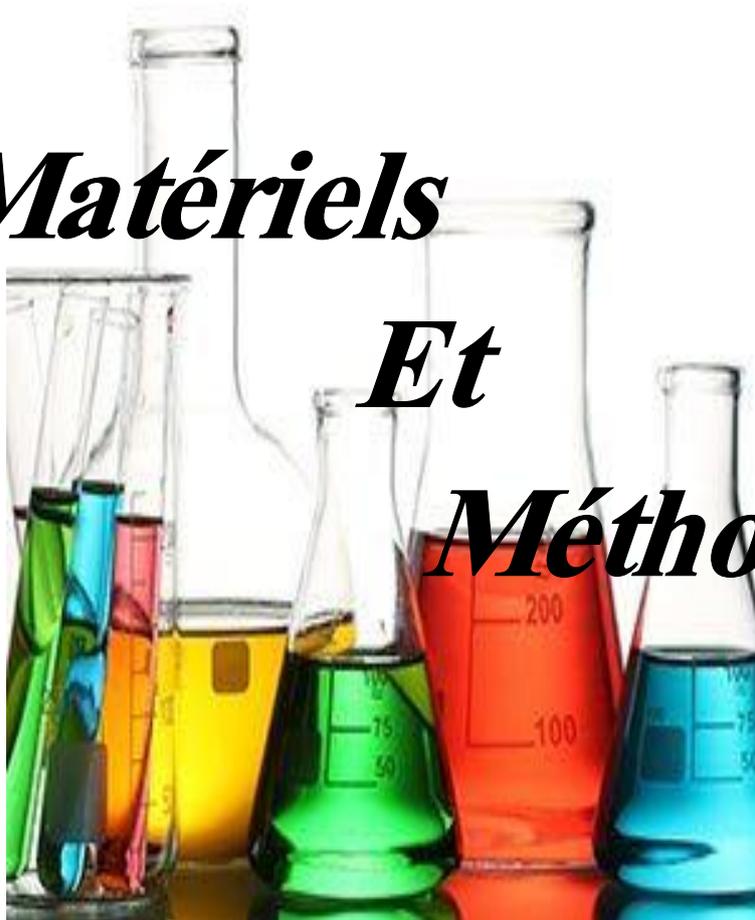
Partie

Expérimentale

Matériels

Et

Méthodes



1. Matériel :

1.1. Matériel végétal :

*Bulbes d'*Allium Sativum* :

Notre étude a porté sur les bulbes de quatre variétés d'*Allium sativum* , ces variétés (Germidour, Messidrom ,Mocpta Bulgar et rouge locale) ont été fournis par l'Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles (ITCMI) D'Oum El Bouaghi ,(de la part de notre Promoteur M^{emc} Boukaria.S) .



Figure 11 : Les bulbes d'*Allium Sativum*

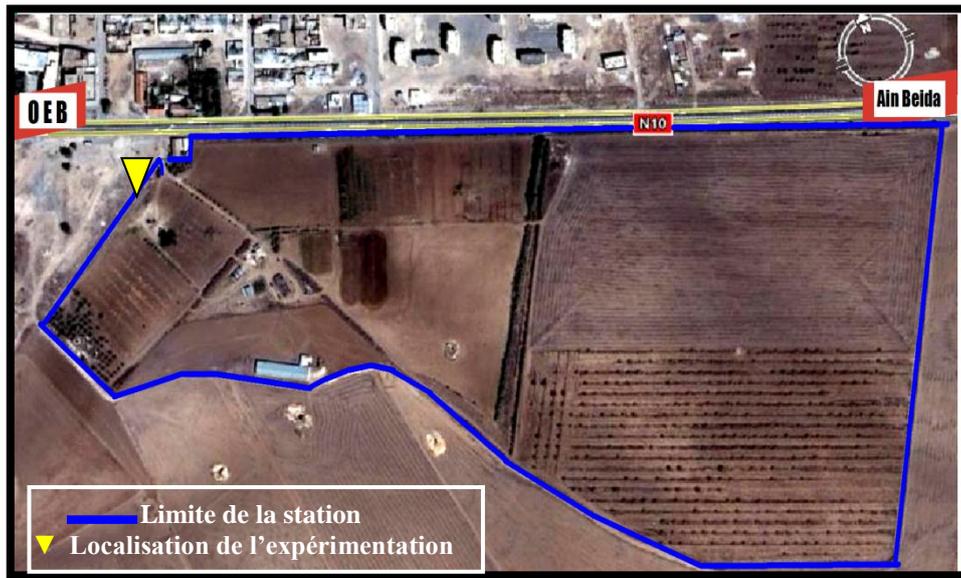
*Localisation géographique de la station de récolte :

L'Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles (ITCMI) station régionale d'Oum El Bouaghi a été créée en 22/10/1987(arrêté ministériel N° 237/ CAB/M).

La station se localise au niveau de Bir Rogâa. (Commune de Berriche), située à 16 Km à l'Est du chef lieu de la wilaya d'Oum El Bouaghi (figure 12). Le site expérimental de l'institut s'étend sur une superficie de 22 ha dont 18 ha SAU, dans une vaste plaine dont l'altitude varie entre 950 à 1000 m.

- ✓ Coordonnées géographiques : 25° 51.783 NORD et 7°5.496 EST
- ✓ Les limites géographiques:
 - Limite Nord: Route Nationale RN°10
 - Limite Nord, sud, est et ouest : exploitations agricoles collectives (EAC) issues de la ferme pilote KOUAH

Le champ d'action de la station est constitué de dix wilayas suivantes : Oum El Boughi , Khenchela , Batna , Constantine , Mila , Setif , Tebessa,Biskra , M'sila Et El Oued.



(Image prise par satellite, 2014)

Figure 12 : Localisation géographique de station expérimentale ITCMI .OEB

1.2. Matériels du test de l'activité antibactérienne:

1.2.1. Souches bactériennes :

Les souches bactériennes sur lesquelles nous avons testé l'activité des huiles essentielles (Tableau n° 3), sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection), ont été choisies pour leur haute pathogénicité et leur multi résistance. Ce sont des espèces Gram négatif /ou Gram positif, pathogènes et responsables d'infections graves chez l'homme et dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques. Elles sont activées à 37 °C pendant 24 heures par repiquage sur milieu gélosé Muller-Hinton (MH). Ces souches bactériennes appartiennent à la collection du laboratoire de microbiologie de l'hôpital CHU de Constantine.

Tableau n° 3: Liste des souches bactériennes étudiées.

Famille	Genre et espèce	Gram
Enterobacteriacées	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Négatif
Enterobacteriacées	<i>Klebsilla pneumoniae</i> ATCC 700603	Négatif
Pseudomonadacées	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Négatif
Staphylococcacées	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positif

1.2.2. Les antibiotiques :

Les antibiotiques utilisés dans ce travail sont : Gentamicine (CN₁₀) et Cotrimoxazol (SXT₂₅).

1.2.3. Milieux de culture :

Selon les souches bactériennes nous avons utilisé les milieux de cultures suivants : Mueller Hinton (MH), Bouillon nutritif et l'eau physiologique. La composition chimique de ces milieux de culture est décrite dans Annexe 02.

2. Méthodes :

2.1. Extraction :

L'extraction des huiles essentielles de quatre variétés de l'ail a été effectuée par notre Promoteur M^{eme} Boukaria.Sabah au niveau du Laboratoire privé « Lacip groupe » à Ain Mlila wilaya d'Oum El Bouaghi .

L'extraction à effectuée par la méthode d'hydrodistillation en utilisant un dispositif de type clévenger.

2.1.1. Préparation du matériel végétal :

Les bulbes d'*Allium sativum* ont été coupés en petits morceaux puis écraser dans un mortier.

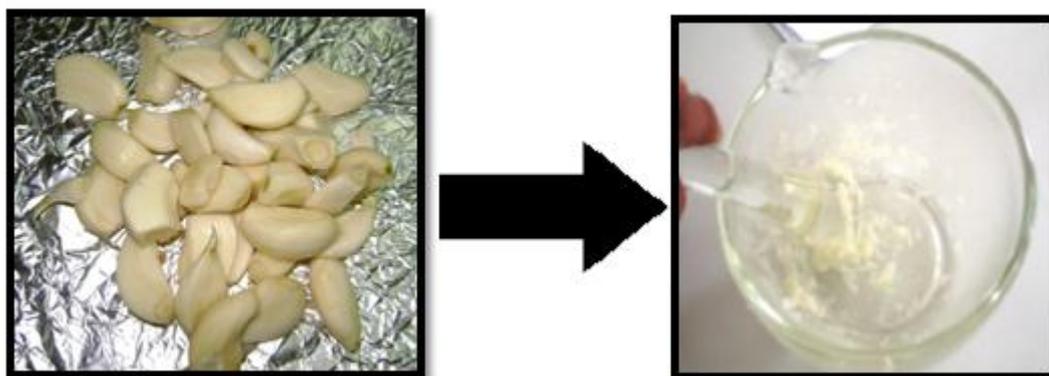


Figure 13: Préparation du matériel végétal.

2.1.2. Hydrodistillation :

Les HEs de l'ail sont extraits par la méthode d'hydrodistillation, par ébullition pendant 2 heures d'un mélange de 700 g de matériel végétal et d'eau distillée.

Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à immerger une quantité de la masse végétale dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté

Matériel et méthodes

à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile et enfin conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4-5 C°) sous l'abri de la lumière jusqu'à son usage (Haciseferogullari et *al.*,2005). L'opération d'extraction dure deux à trois heures à partir du début d'ébullition.

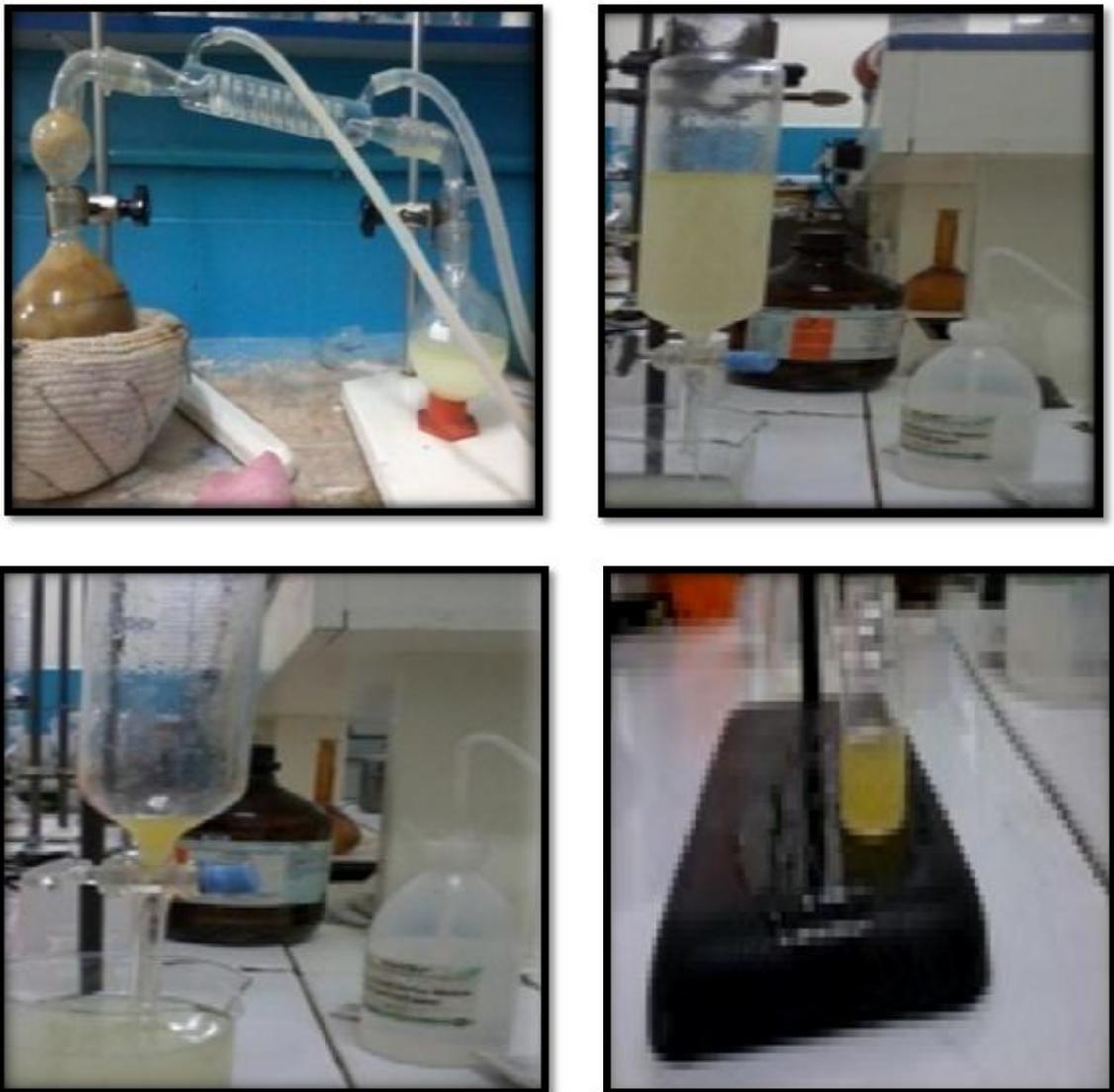


Figure 14: Les étapes de l'extraction de l'HE de l'ail par la méthode d'hydrodistillation.

2.1.3. Calcul de rendement:

Le rendement en H.E est le rapport de la quantité d'huile recueillie après l'hydrodistillation par rapport à la quantité de la plante à traiter ,exprimé en pourcentage (%) (Caree , 1953), et calculé par la formule suivante:

$$R = P_B / P_A \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle en %.

P_B : quantité de l'huile essentielle en gramme.

P_A : quantité de la biomasse végétale en gramme.

2.2 Activité antibactérienne :

Dans notre travail l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Allium Sativum* in vitro vis à vis des différentes souches bactérienne *Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, a été réalisée par la méthode de l'aromatogramme dans le laboratoire pédagogique du centre universitaire de Mila.

2.2.1. Méthode de diffusion par disque (l'aromatogramme) :

Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne d'une huile essentielle. Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'huile essentielle, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne de l'huile essentielle, est ainsi déterminé (Hayes et Markovic. , 2002) .

➤ Préparation de l'inoculum :

L'inoculum a été préparé à partir de culture les souches bactérienne dans le bouillon nutritif après incubation pendant 24 heures à 37°C dans l'étuve, quelques millilitres de cette culture sont ajoutés dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, et agité au vortex pendant quelques secondes , l'opacité de la suspension doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland, pour cela la concentration bactérienne des différentes solutions ou inoculums est évaluée par turbidité est exprimée par la mesure des densités optiques de 0.08 à 0.10. à une longueur d'onde de 625 nm , l'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. Il est à signaler d'une part que la suspension ajustée devra contenir 10⁸ UFC /ml (units forming colony /ml) et

Matériel et méthodes

d'autre part que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au-delà de 15 minutes faute de quoi la concentration et donc l'opacité risque d'augmenter à cause de la croissance bactérienne.

➤ **Ensemencement :**

Cet inoculum sert à ensemer des géloses de Mueller Hinton coulées dans des boîtes de Pétri. L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Pour chaque souche testée, 10 boîtes de pétri, sont écouvillonnées par le même écouvillon à la condition d'être recharger pour chacun d'elles.

➤ **Préparation des disques d'aromatogramme:**

- ✓ les disques sont fabriqués à partir de papier Watman n°3 avec un diamètre de 6 mm.
- ✓ ensuite ils sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'autoclave.

Les disques sont déposés délicatement sur la surface de la gélose MH inoculée à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. Puis à l'aide de micropipette 1 disque imprégné par les huiles bruts d'ail (RL, Gd, Md, M B) et 3 disques imprégnés par les HE diluée dans du DMSO (dimethylsulfoxide) à 1/2, 1/4 et 1/8 (v/v). De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des huiles testés, le test est répété trois fois pour avoir des résultats fiables. Finalement, les boîtes de pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C dans l'étuve .

➤ **Lecture :**

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition (à l'aide d'une règle à l'extérieure de la boîte) qui est représentée par une auréole formée autour de disque où aucune croissance n'est observée (Najjaa et al .,2007).

Matériel et méthodes

Tableau n°4: Evaluation de l'activité antibactérien selon le diamètre d'inhibition.

Observation	Signe	Diamètre d'inhibition
Non sensible	(-)	>8 mm
Sensible	(+)	8 à 14mm
Très sensible	(++)	15 à 20mm
Extrêmement sensible	(+++)	< 20mm

➤ **Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) :**

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

➤ **Préparation de la gamme de concentration de l'huile essentielle :**

Le principe de la méthode consiste à réaliser une série de dilutions (1/2, 1/4 et 1/8) de l'huile dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Une gamme de concentration de notre huile essentielle allant de : 500µl/µl à 125 µl/µl (tableau n°5).

Tableau n°5: Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer la CMI.

Rapport de dilution (HE/DMSO)	1/2	1/4	1/8
%	50	25	12,5
µl.HE/ µl.DMSO	500	250	125

Les étapes de réalisation du tests de l'activité antibactérienne sont résumées dans la figure 15.

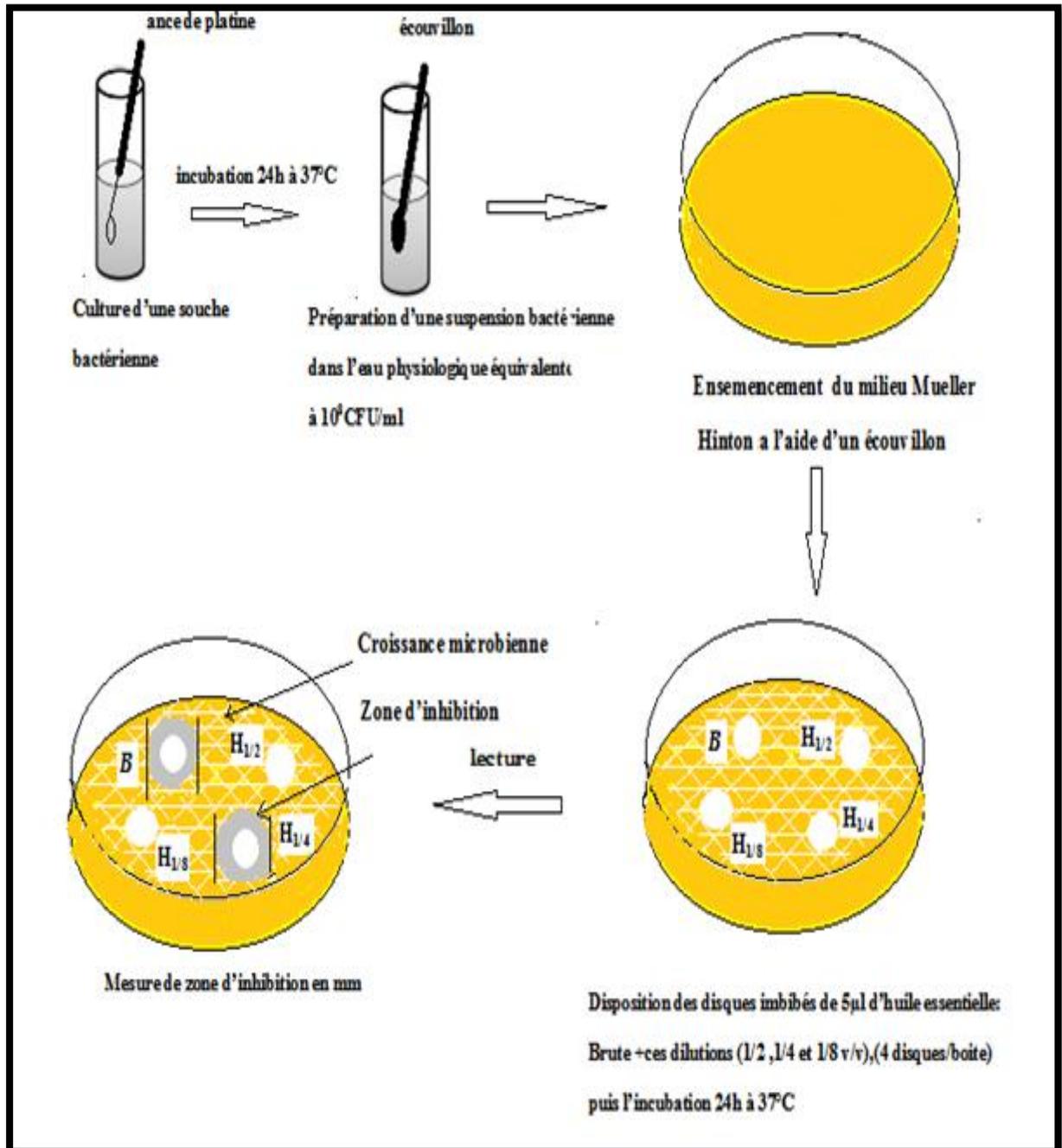


Figure 15 : Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne

Résultat

Et

Discussion



Résultat et discussion

Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont publié plus de 2 000 travaux Scientifiques (Lefrançois et Ruby ., 2006) portant sur le potentiel thérapeutique de l'ail (*Allium sativum*) qui est l'une des plantes les plus répondues dans la médecine traditionnelle et la plus largement citée dans la littérature pour ses propriétés médicinales. L'huile essentielle d'*Allium sativum* constitue l'extrait le plus connu principalement par son pouvoir antibactérien qui est attribué notamment aux composés sulfides qui les contient (Camille ,1998).

Dans le souci de valoriser et améliorer cette plante médicinale *Allium sativum* dans notre pays nous avons réalisés une étude comparative entre quatre variétés - appartenant à l'espèce *Allium sativum*- par l'évaluation de son pouvoir antibactérien vis-à-vis de quatre souches bactériennes.

1. Résultats de l'extraction de l'huile essentielle :

• Calcul du rendement :

L'hydrodistillation des bulbes de quatre variétés d'ail fournit par l' ITCMI d'OEB permet de récupérer un rendement en huile essentielle qui se diffère d'une variété à l'autre (Tableau n° 6).

Tableau n°6 : Les pourcentages des rendements en huile essentielle des variétés étudiées.

Les huiles essentielles	Messidrom	Rouge Locale	Mocpta Bulgare	Germidour
Les rendements %	0,46%	0,51%	0,52%	0,63%

Selon les résultats du tableau n°6 nous remarquons que le rendement le plus élevé est obtenu chez la variété Germidour (0,63%), suivi par la variété Mocpta Bulgare (0,52 %), puis la Rouge Locale (0,51%), un faible rendement a été obtenu par la variété Messidrom (0,46 %) (Figure 16). Cette variation concernant les résultats de rendements peut être expliquée d'une part par le comportement génétique de la plante ou encore il est dû au protocole d'extraction qui a été suivi au cours de ce travail.

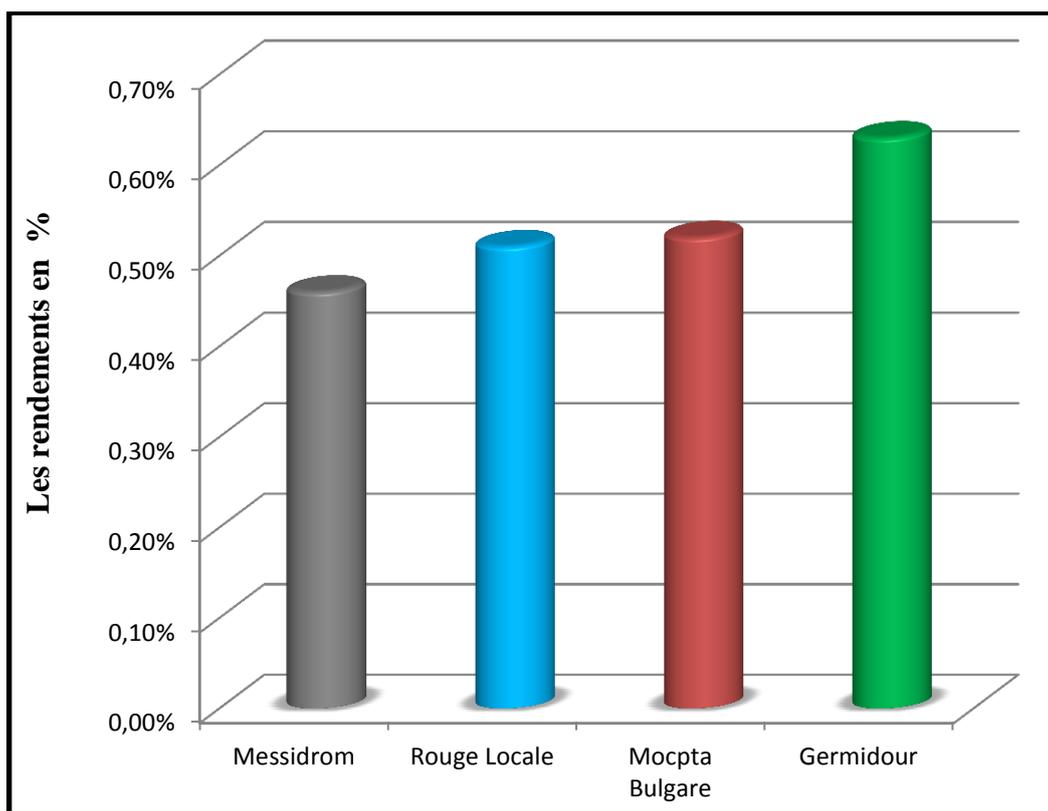


Figure16: Pourcentages en HEs de quatre variétés de l'ail obtenus par l'hydrodistillation.

Nos résultats sont très élevés en comparaison avec celui obtenu par la littérature, sachant que la plupart des travaux scientifiques réalisés portant sur *Allium sativum* mais sans citer la variété utilisée. Les rendements en l'huile obtenus par ; Benkeblia (2004), Haciseferogullari et al (2005), Khadri (2009) et par Derbal et Medjaldi (2014) sont respectivement de 0.2%, 0.14%, 0.09% et 0.4%.

Cependant nos résultats sont très faibles comparativement à ceux obtenu par Benmedour et al., 2015 qui ont trouvé un rendement de 1%.

Selon Amagase et al., (2001), l'ail contient approximativement entre (0,1 à 0.36%) d'huile volatile (peut aller jusqu'à 0.2-0.5%). donc on peut dire que nos résultats sont proches à celui obtenu par la recherche référentielle .

- **Les caractères organoleptiques de l'huile essentielle d'*Allium sativum*:**

Les caractères organoleptiques de l'huile essentielle d'*Allium sativum* obtenu par l'hydrodistillation sont représentés dans le tableau n°7.

Résultat et discussion

Tableau n°7 : Caractères organoleptiques de différentes huiles essentielles d'*Allium sativum*.

Les caractères Les huiles	couleur	Odeur	Aspect	Saveur
Messidrom	Jaune d'orée (foncé)	Forte et désagréable	Liquide mobile	piquant
Rouge Locale	Jaune très claire	Forte et désagréable	Liquide mobile	piquant
Mocpta Bulgare	Jaune d'orée (foncé)	Forte et désagréable	Liquide mobile	piquant
Germidour	Jaune d'orée (foncé)	Forte et désagréable	Liquide mobile	piquant

L'huile essentielle de Germidour ,Mocpta Bulgare et Messidrom est d'une couleur jaune d'orée (foncé) alors que celle de l'ail Rouge Locale est de la même couleur mais plus claire. Les quatre huiles ont une odeur ,Aspect, Saveur identique.

Selon Soubeiran (1857) et Bechet (1844): l'huile d'ail est caractérisée par une couleur jaune, et une odeur forte et âcre. Ceci est similaire aux résultats obtenus dans notre travail .

2. Résultats de l'activité antibactérien :

L'activité antibactérien des HEs de quatre variétés d'ail a été estimée en termes de diamètre de zone d'inhibition autour des disques contenant les huiles à tester vis-à-vis de quatre souches bactériennes étudiées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *klebsiella Pneumoniae*). La détermination de zone d'inhibition permet une estimation du caractère de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne contre les huiles testés.

2.1. Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques :

Les résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disque de quatre souches testés sont représentés dans le tableau n°8 et la figure 17.

Résultat et discussion

Tableau n°8: Diamètres des zones d'inhibition en mm en présence de deux antibiotiques.

Les antibiotiques Les bactéries	Gentamicine (CN ₁₀)	Cotrimoxazol (Sxt ₂₅)
<i>Escherichia coli</i>	24	16
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	22	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	11

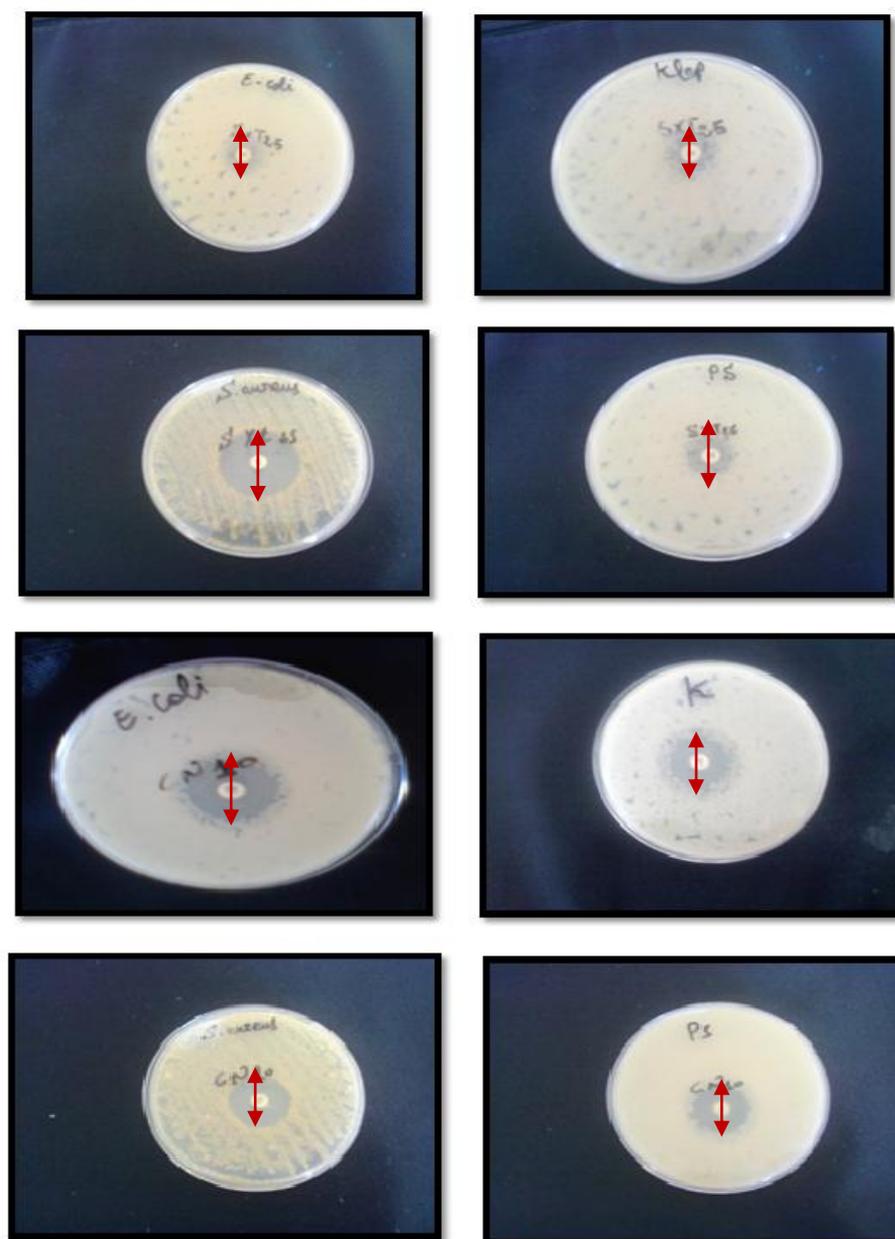


Figure17 : Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées.

Résultat et discussion

D'après les résultats obtenus (tableau n°8 et la figure17) nous soulignons une variabilité dans la réponse des souches étudiées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *klebsiella Pneumoniae*) vis-à-vis de deux antibiotiques testés.

- ✓ La bactérie *E. coli* est extrêmement sensible à gentamicine (CN₁₀) avec un diamètre de zone d'inhibition de 24mm , alors qu'elle est très sensible à la Cotrimoxazol (SXT₂₅) avec un diamètre de 16 mm.
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram -, elle est extrêmement sensible à l'antibiotique gentamicine (diamètre de zone d'inhibition de 21mm), alors qu'elle a montré une sensibilité vis-à-vis de SXT₂₅(diamètre de zone d'inhibition de 11 mm) .
- ✓ *Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram +, elle est extrêmement sensible aux antibiotique SXT₂₅(diamètre de zone d'inhibition de 31 mm) et au CN₁₀ avec un diamètre de zone d'inhibition de 25 mm.
- ✓ *Klebsiella pneumoniae* est extrêmement sensible vis-à-vis de CN₁₀ avec un diamètre de zone d'inhibition de 22 mm, alors qu'elle a montré une sensibilité à l'antibiotique SXT₂₅ (diamètre de zone d'inhibition de 13 mm).
- ✓ La sensibilité de souche *S. aureus* aux deux antibiotiques testés a montré un meilleur résultat par rapport aux autres bactéries étudiées avec un diamètre de zone d'inhibition de 31mm pour SXT₂₅ , et 25mm pour CN₁₀ .suivi par *E. coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 24mm pour CN₁₀ , et 16mm pour SXT₂₅,et *K.pneumoniae* avec un diamètre de zone d'inhibition de 22mm pour CN₁₀ , et 13mm pour SXT₂₅ ,et enfin *P-aeruginosa* avec un diamètre de zone d'inhibition de 21mm pour CN₁₀ , et 11mm pour SXT₂₅.(Figure18).

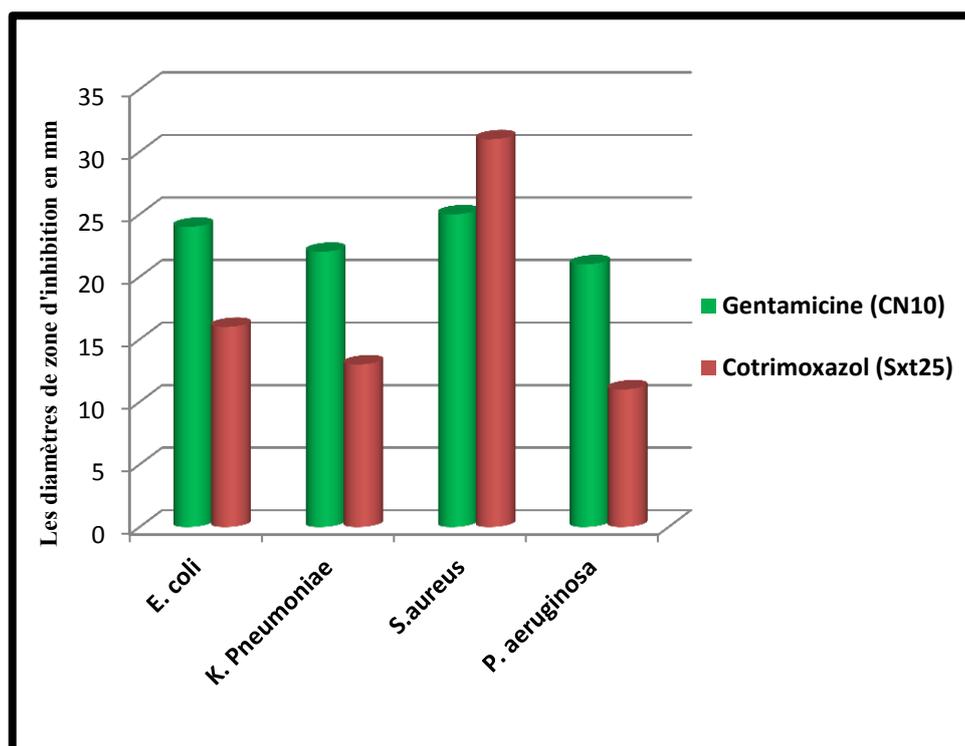


Figure18 : représentation graphique des diamètres des zones d’inhibition (en mm) des deux antibiotiques sur les différentes souches testées.

2.2. Résultats de l’activité antibactérienne de l’extrait brut des quatre variétés de l’ail et de leurs dilutions :

Les diamètres des zones d’inhibition des souches étudiées sous l’action de l’extrait brut de l’huile essentielle de l’ail sont représentées dans le tableau n°9.

Tableau n°9 : Diamètres de zones d’inhibitions en (mm) de l’extrait brut des quatre variétés d’*Allium sativum*.

Les huiles Les bactéries	Rouge locale	Messidrom	Mocpta-Bulgare	Germidour
E. coli	10	7	9	8
K .Pneumoniae	8	-	8	10
S. aureus	7	-	7	8
P. aeruginosa	9	-	7	-

(-): Absence d'une zone d'inhibition

Résultat et discussion

✓ Résultats de l'activité de l'extrait brut de l'huile essentielle de la variété Rouge locale sur les souches testées :

Les résultats obtenus indiquent que l'huile brute de l'ail RL a un effet inhibiteur vis-à-vis tous les souches testées, avec des zones d'inhibition allant de 07 mm à 10 mm sont observées. Le meilleur résultat obtenu est celui observé chez la bactérie *E. coli* avec un diamètre de 10mm, suivi par *P. aeruginosa*, puis *K. Pneumoniae* et enfin l'effet vis-à-vis de *S. aureus* avec un diamètre des zones d'inhibition de 9mm, 8mm et 7mm respectivement.

• Effet des différentes dilutions de l'huile essentielle de la variété rouge locale sur les souches testées :

La CMI obtenues par les dilutions de l'huile de cette variété (RL) est représentée dans le tableau n°10.

Tableau n°10: Valeurs des CMIs de l'huile de l'ail RL.

CMI μ l/ μ l	500	250	125
Les bactéries			
<i>E. coli</i>	+	+	-
<i>K. Pneumoniae</i>	-	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+

(+) présence de croissance (-) absence de croissance.

L'absence de la croissance bactérienne de la souche *K.pneumoniae* et *P. aeruginosa* dans la dilution 50% qui correspond à une CMI équivalente à 500 μ l/ μ l, cela confirme que l'huile de cette variété montre qu'il ya une activité vie-à-vie de ces bactéries avec un diamètre de zone d'inhibition de 7mm. Alors que nous remarquons la croissance des autres bactéries dans cette dilution, donc il n'ya aucune activité antibactérienne de l'huile de la variété RL contre ces bactéries.

Les quatre bactéries montrent une croissance dans la dilution 25% qui correspond à une CMI équivalente à 250 μ l/ μ l c'est-à-dire aucun effet antibactérienne de l'huile RL sur toutes les bactéries. Le même résultat pour la dilution 12,5% qui correspond à une CMI équivalente à 125 μ l/ μ l a l'exception de la bactérie *E. coli* qui ne montre aucune croissance dans cette dilution ce qui confirme la présence d' une activité antibactérienne de l'huile RL contre cette bactérie avec une zone d'inhibition de 8mm ,supérieure de celle donnée par la dilution 50%.

Résultat et discussion

D'après ces résultats nous constatons que l'huile brute de l'ail RL a une activité antibactérienne plus forte que celle de l'huile diluée de la même variété. Cette dernière perde son efficacité mais l'extrait brut possède un pouvoir puissant vis-à-vis de toutes les souches étudiées (figure 19).

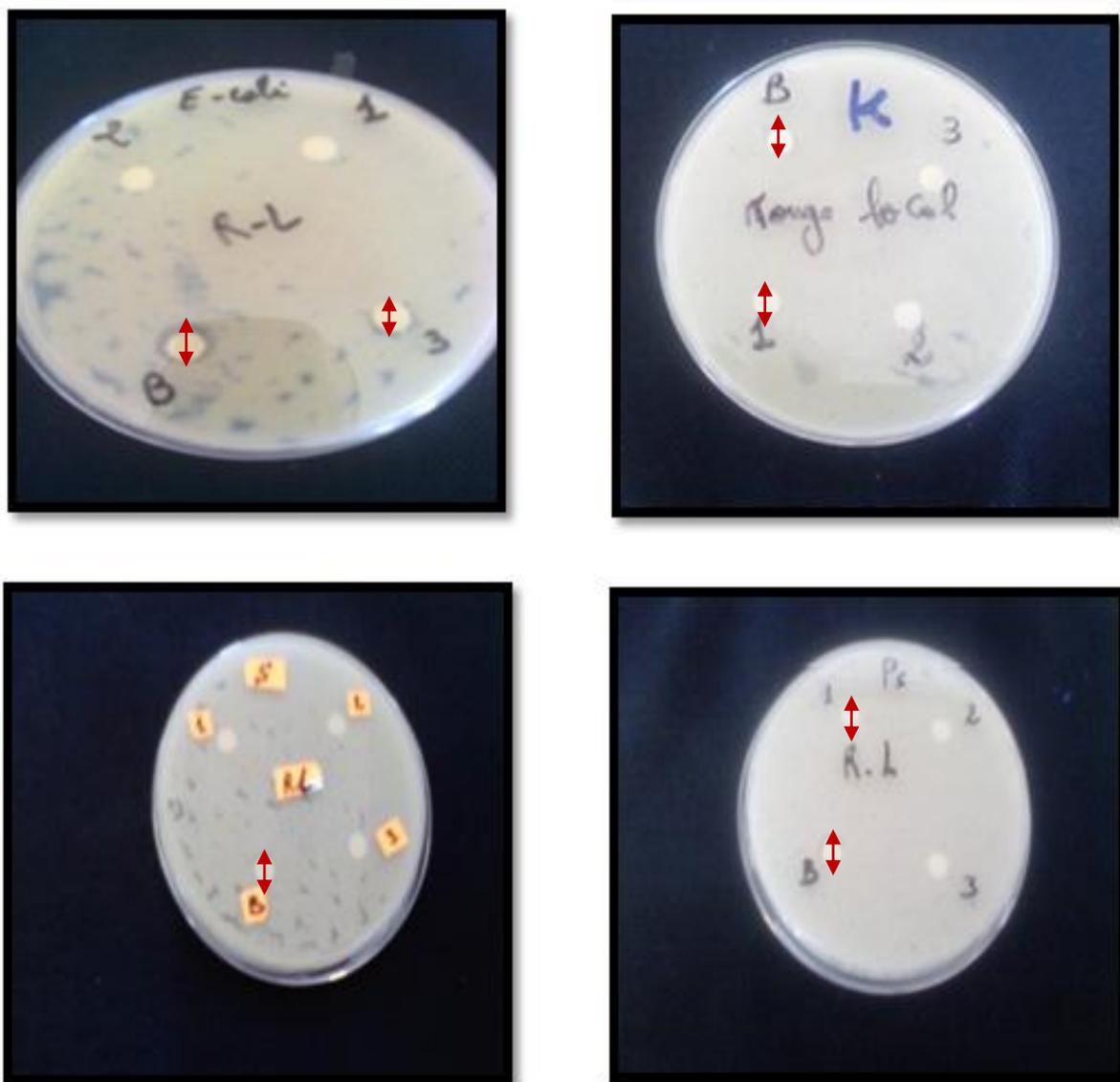


Figure 19 : Effet de l'HE de la variété Rouge Locale sur les bactéries étudiées.

✓ **Résultats de l'activité de l'extrait brut de l'huile essentielle de la variété Messidrom sur les souches testées :**

L'activité antibactérienne de l'huile brute de Md est avérée qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis des *K. Pneumoniae*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Cependant la souche *E. Coli* donne une légère zone d'inhibition autour de disque estimée par 7mm.

Résultat et discussion

- Effet des différentes dilutions de l'huile essentielle de la variété Messidrom sur les souches testées :

La CMI de l'HE de cette variété est représentée dans le tableau n°11.

Tableau n°11 : Les valeurs des CMIs de l'huile essentielle de la variété Messidrom.

CMI $\mu\text{l}/\mu\text{l}$	500	250	125
Les bactéries			
<i>E. coli</i>	+	-	-
<i>K. Pneumoniae</i>	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	+

La présence de la croissance des quatre bactéries dans la dilution 50% qui correspond à une CMI équivalente à 500 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ cela indique qu'il n'y a aucun effet de l'huile essentielle de Md sur les bactéries. Alors que dans la dilution 25% (CMI 250 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$) absence de la croissance de la bactérie *E. coli* et *P. aeruginosa* donc l'HE de Md a montré un effet inhibiteur sur ces bactéries avec un diamètre de zone d'inhibition de 7mm et 10mm respectivement.

L'absence de la croissance d'*E. coli* dans la dilution 12,5% (CMI 125 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$) confirme la présence d'un effet antibactérien de l'huile essentielle de Md sur cette souche avec un diamètre de zone d'inhibition de 8mm supérieure de celle donnée par la dilution 25% sur la même bactérie, tandis qu'il ne montre aucun effet sur les autres bactéries.

D'après ces résultats nous constatons que l'extrait brut de l'HE de la variété Md a une activité antibactérienne plus faible que celle de l'huile diluée de cette variété (figure 20).

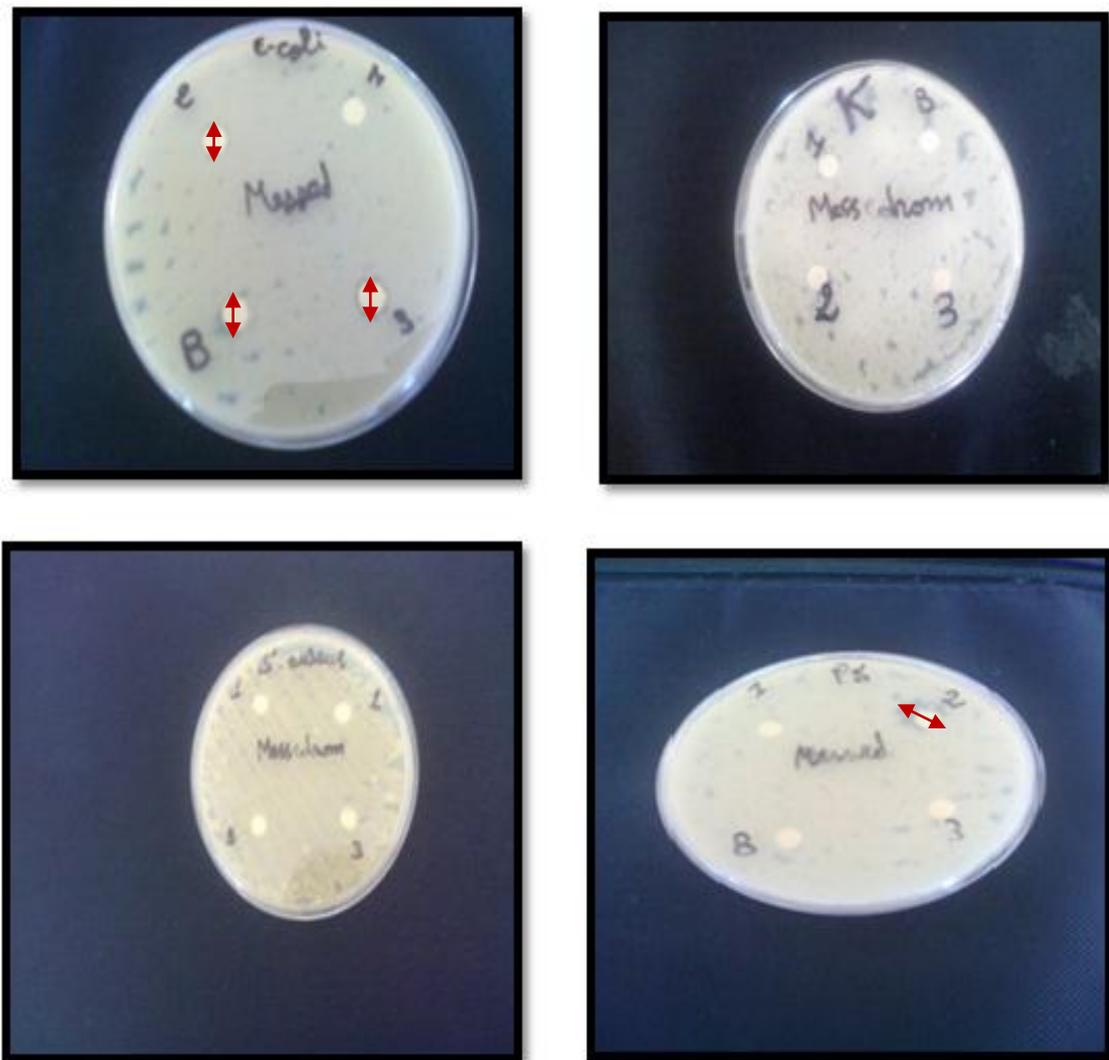


Figure 20 : Effet de l'HE de la variété Messidrom sur les bactéries étudiées.

✓ **Résultats de l'activité de l'extrait brut de l'HE de la variété Mocpta Bulgar sur les souches testées :**

L'extrait brut de l'HE de Mocpta-B montre une activité antibactérienne avec toutes les souches testées, il s'est avéré active contre *E. Coli* et *K. Pneumoniae* avec des zones d'inhibition de 9mm et 8mm respectivement. En revanche *S.aureus* et *P. aeruginosa* une légère zone d'inhibition a été observée autour des disques (7mm).

• **Effet de différentes dilutions de l'huile essentielle de la variété Mocpta Bulgar sur les souches testées :**

La CMI obtenu par les dilutions de l'huile essentielle de Mocpta Bulgar est représentée dans le tableau n°12.

Résultat et discussion

Tableau n°12 : Valeurs des CMI de l'HE de Mocpta Bulgar.

CMI $\mu\text{l}/\mu\text{l}$	500	250	125
Les bactéries			
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>K.Pneumoniae</i>	+	+	-
<i>S. aureus</i>	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	-

D'après ces résultats nous remarquons la croissance des bactéries *K.Pneumoniae*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* dans les dilutions 50% et 25% (CMI : 500 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$, 250 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ respectivement) ce qui confirme la résistance de ces bactéries contre l'activité de l'huile de MB, cependant elle ne montre aucune croissance dans la dilution 12,5%, et cela indique qu'il y a une activité antibactérienne de cette dilution sur ces bactéries avec des diamètres des zones d'inhibitions de 9mm,7mm et 9mm respectivement. Concernant l'*E. Coli*, s'avérée sensible avec toutes les dilutions.

D'après les résultats obtenus nous soulignons que l'extrait brut de l'HE de Mocpta Bulgar présente un effet sur les bactéries étudiées presque égal à celui donné par les huiles diluées (figure 21).

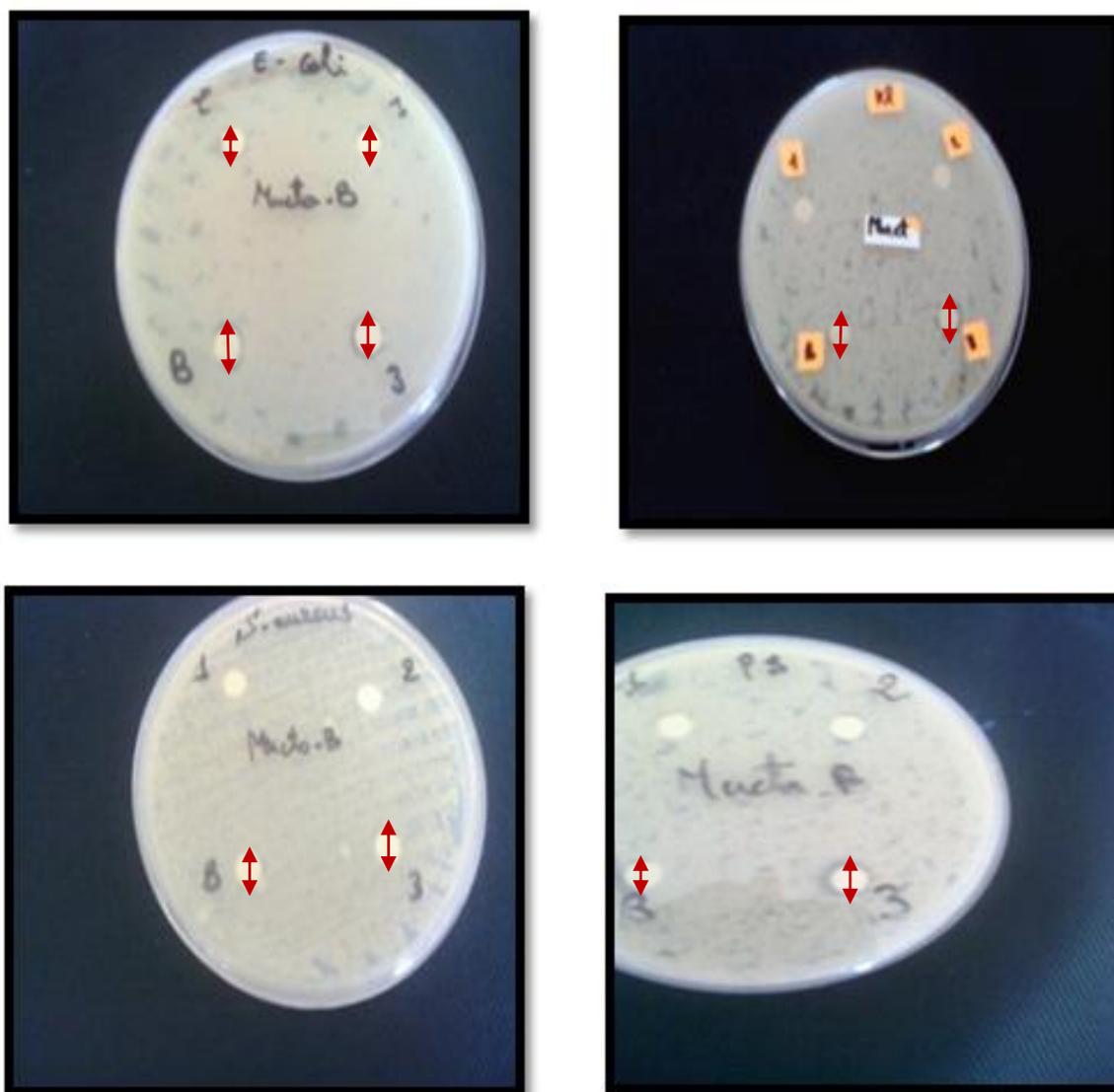


Figure 21 : Effet de l'HE de Mocpta Bulgar sur les bactéries étudiées.

✓ **Résultat de l'activité de l'extrait brut de l'huile essentielle de la variété Germidour sur les souches testées :**

L'extrait brut de l'HE de la variété Gd présente une activité antibactérienne sur les souches : *E. coli*, *k. Pneumoniae*, *S. aureus*. Avec un diamètre des zones d'inhibition respectivement de 8 mm, 10 mm, 8 mm. Pour la souche *P. aeruginosa* aucune zone d'inhibition n'a été enregistrée autour de disque.

• **Effet de différentes dilutions de l'huile essentielle de la variété Germidour sur les souches testées :**

Les valeurs des CMI de l'huile essentielle de cette variété sont représentées dans le tableau n°13.

Résultat et discussion

Tableau n°13 : Valeurs des CMI de l'huile essentielle de Germidou.

CMI $\mu\text{l}/\mu\text{l}$	500	250	125
Les bactéries			
<i>E. coli</i>	-	+	-
<i>K.Pneumoniae</i>	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+

Nous remarquons la croissance des trois bactéries *K.Pneumoniae*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* dans toutes les dilutions ce qui signifie que l'huile essentielle de Gd ne possède aucune action sur ces bactéries, alors que les dilutions 50% et 12,5% se révèlent active que contre l'*E. coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 7mm et 8mm respectivement ,la dilution 25% ne révèle aucun effet sur cette bactérie .

Selon ces résultats nous pourrons conclure que l'extrait brut de l'HE de la variété *Gd* agisse bien sur les bactéries que l'huile diluée de cette variété (Figure 22).

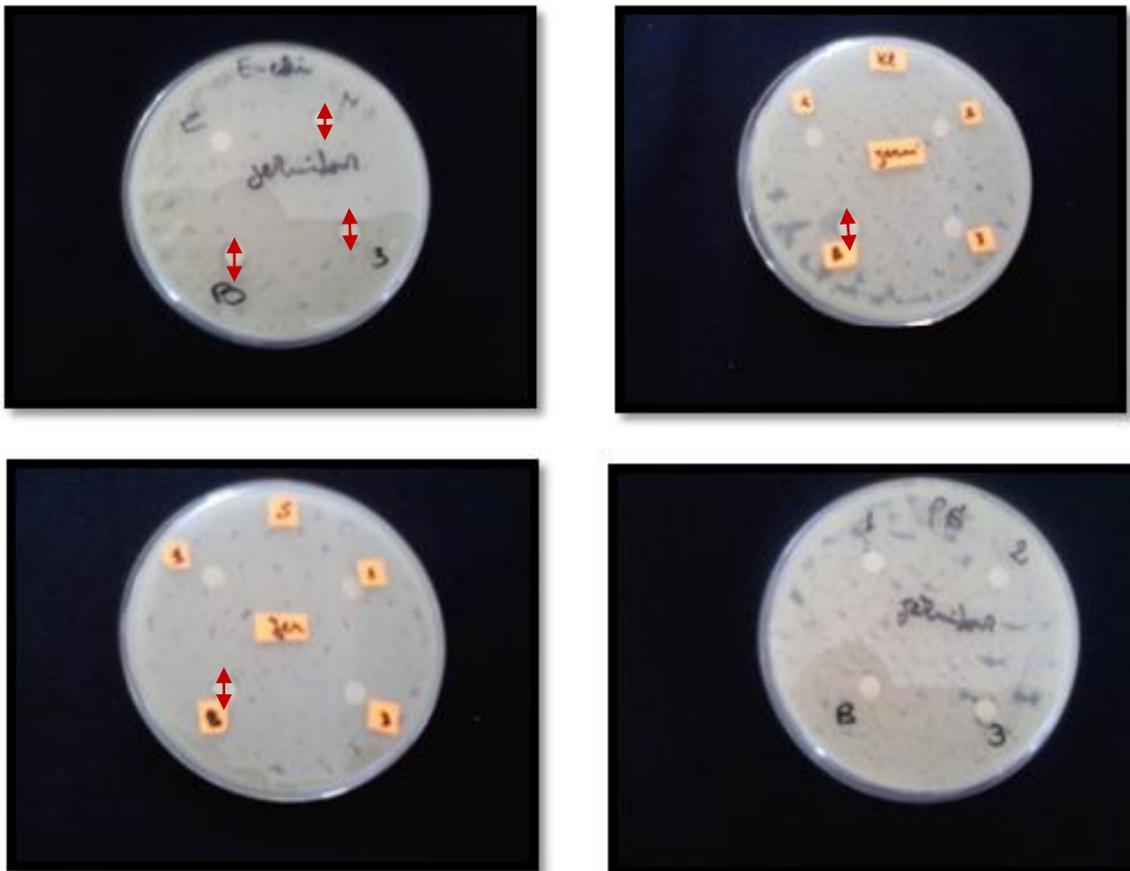


Figure 22 : Effet de l'HE de la variété Germidou sur les bactéries étudiées.

Résultat et discussion

D'après les résultats de l'effet des antibiotiques et les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de l'HE des quatre variétés de l'ail sur les bactéries étudiées nous remarquons que l'effet de l'extrait brut de l'HE des quatre variétés et leur dilutions (le plus grande diamètre 10mm est noté chez *E.Coli*, *K. Pneumoniae* et *P. aeruginosa*) est très faible comparativement à celui obtenu par les antibiotiques (le meilleure diamètre 31mm est noté chez *S. aureus*).

➤ **Comparaisons de l'effet des huiles essentielles de l'ail Rouge Locale, Messidrom, Mocpta-Bulgare et Germidour sur les quatre bactéries testés :**

D'après le Tableau n° 9 et l'histogramme de la figure 23. on peut montrer que les huiles essentielles des variétés étudiées sont douées d'une activité antibactérienne contre les souches utilisées dans cette étude.

Les résultats montrent clairement l'effet significatif de l'extrait brut de la variété rouge locale et la variété Germidour sur les quatre souches étudiées, donnent un effet plus fort que celui donné par les autres extraits bruts des autres variétés, avec un maximum d'inhibition de 10 mm de diamètre. Suivi par l'extrait brut de Mocpta-Bulgare qui exerce un effet antibactérien sur toutes les souches étudiées, avec des zones d'inhibitions comprises entre 7 mm et 9mm. Et enfin l'extrait brut de Messidrom n'exerce aucun effet sur les bactéries étudiées à l'exception sur *E.coli* qui manifeste une légère zone d'inhibition autour du disque estimée par 7mm.

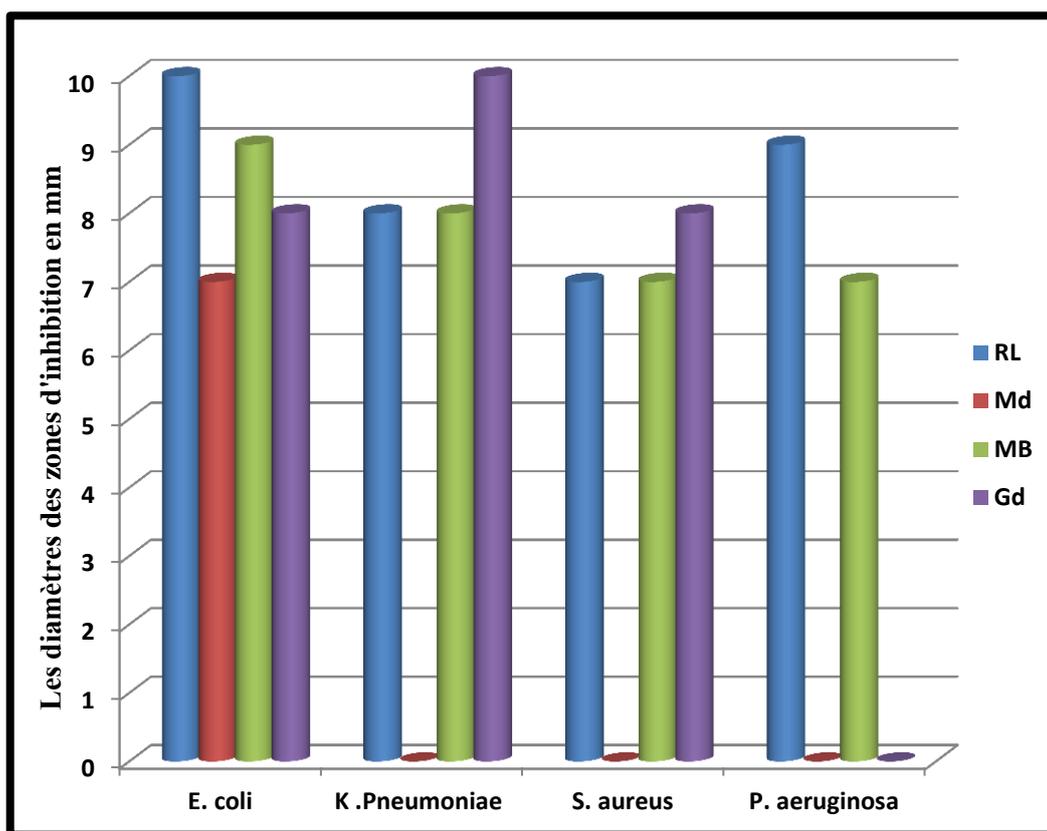


Figure 23: représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition(en mm) de l'extrait brute de quatre variétés de l'ail testés avec différentes bactéries.

Conclusion

Conclusion

Dans le but de rechercher de nouveaux agents naturels antibactériens aux intérêts thérapeutiques, les huiles essentielles de quatre variétés appartenant à l'espèce *Allium Sativum*, Rouge Locale, Messidrom, Mocpta Bulgar et Germidour. Ont fait l'objet d'une étude phytochimique. Deux analyses sont appliquées à ces variétés : extraction des huiles essentielles, et détermination de leur pouvoir antibactérienne in vitro sur des souches pathogènes: il s'agit de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), puis on a comparé les résultats de l'activité antibactérienne de ces variétés entre eux, enfin on a fait une comparaison entre ces résultats et ceux obtenues avec les antibiotiques .

L'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation (en utilisant un dispositif d'extraction type Clevenger) permet d'obtenir des rendements en huile essentielle de (0,63%), (0,52%), (0,51%) et (0,46%) Pour les variétés Germidour, Mocpta Bulgar, Rouge Locale et Messidrom respectivement. Les propriétés organoleptiques (Aspect, Saveur, couleur, odeur) de ces essences ont été déterminées. Nous avons ensuite testé l'activité antimicrobienne des huiles à l'aide de la technique de diffusion par disques.

L'évaluation de l'effet antibactérienne montre que la plupart des souches bactériennes utilisées sont très sensible aux antibiotiques utilisés.

Les huiles essentielles de quatre variétés de l'ail sont actives avec toutes les souches testées. Des zones d'inhibition de diamètres variables sont observées, l'extrait brut de l'huile essentielle de la variété Rouge Locale et Germidour présente une meilleure activité antibactérienne que les autres variétés avec un diamètre de zone d'inhibition de 10 mm ce dernier supérieur à celui de leur dilution qui est de 8 mm. Les bactéries Gram négatives sont plus sensibles à l'action des huiles que les bactéries Gram positives ainsi que l'extrait brut de l'HE inhibent mieux que l'HE diluée,

En conclusion, les variétés étudiée possède une activité antibactériennes sur les bactéries testés (le meilleure diamètre de zone d'inhibition de 10 mm) mais cette activité reste très faible comparativement avec celle des antibiotiques testés (le meilleure diamètre de zone d'inhibition est de 31mm).

Références

Et

Bibliographie



Références bibliographiques

A

- Abraham E. 2006.** Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'*Hibiscus Sabdariffa* L et à l'*Artemisia annua*. Thèse de doctorat ,l'institut national polytechnique de toulouse, P : 16-17.
- Abramson C.I., Wanderley P.A., Wanderley M.J.A., Silva J.C.R. and Michaluk L.M. 2007.** The Effect of essential oils of sweet fennel and pignut on mortality and learning in africanized Honeybees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) Neotropical Entomology 36 (6), pp. 828-835.
- AFNOR .2000.** Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- Aghel N., Yamini Y., Hadjiakhoondi A. et Mahdi Pourmortasavi S.2004.** Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta*. 62,p: 407-411.
- Amagase H., Petesch BL., Matsuura H., Kasuga S .and Itakura Y. 2001.** Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition*. 131, 955s-962s.
- Anton R.et Lobstein A. 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.
- Aprotosoai A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V. and Stanescu U. 2010.** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, Vol. 58 (1); pp. 46-54.
- Ayan M., Kuzucu C., Durmaz R., Aktas E.and Cizmeci Z.2003.** Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. *J Infect Control Hosp Epidemiol* 24: 495-500.

B

- Bakkali F., Averbek S., Averbek D.et IdaomarM. 2008.** Biological effects of essential oils .*Food and chemical toxicology* 46-446-475.

Références bibliographiques

- Balestra G.M., Heydari A., Ceccarelli D., Ovidi E., Quattrucci A. 2009.** Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection* 28(10):807–811.
- Barboni T. 2006.** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse de doctorat, Université de Corse , pp.21.
- Barry N. 2001. Art d'extraire les huiles essentielles. De parfum à faire soi-même, pp. 125-128. In Belaagoune S. et Himed L. 2007.** Etude de l'activité antioxydant d'une huile essentielle de *Schinus molle*. Mémoire d'Ingénieur. INATAA, Université Constantine, 57p.
- Basil A., Jimenez-carmonna M. M. et Clifford A.A. 1998.** Extraction of rosemary by super heated water. *Journal of food chemistry*.46,p:5205-5209.
- Benini C. 2007.** Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielle saux Comores. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux, 109p.
- Benkeblia N.2004.** Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*; 37:263 268.
- Benmeddour T., Laouar H ., Benabdi A. A .et Brahimi S. 2015.** Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de trois espèces du genre *Allium* : *A. cepa*, *A. fistulosum* et *A. sativum* cultivées dans le périmètre agricole de Doussan (wilaya de Biskra).
- Benzeggouta N. 2005.** Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Thèse Magister en pharmacochimie, Université Mentouri de Constantine Institut de chimie,45-55p.
- Bezanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M .et Troutin F. 1990.** Plantes médicinales des régions tempérées. Maloine édition.
- Bilgrami K.S. ; Sinha K.K .et Sinha A.K. 1992.** Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. J. Med. Res.* 96, 171-175.

Références bibliographiques

- Block E .1992.** The organosulfur chemistry of the genus *Allium*. Implications for the organic chemistry of sulphur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31 (9) 1135-1178p.
- Bouguerra A.2012.** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Thèse de Magister en Sciences Alimentaires, Université Mentouri Constantine, 3-4-8-17p.
- Boyle W. 1955.** Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfumer Essent. Oil Rev.* 66: 25-28
- Bruneton J .1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations Lavoisier.
- Bruneton J. 2008.** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 2' éd., Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, p 1188.
- Burdock GA (Ed) .1995 .** Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. Volume I, 3e Edition CRC Press.
- Burt S. 2004 .** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.



- Callery .et Emma. 1998.** Le grand Livre des herbes « le guide pratique de la culture, du séchage et des vertus de plus de 50 herbes ».
- Camille D. 1998.** Microbiologie, 90 heures de travaux pratique, enseignement.
- Caree P. 1953.** Précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Ed. Ballière JB. Et fils.
- Cavallito C.J., Buck J.S.et Suter C.M. 1944.** Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 66:1950–1951.
- Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. 1997.** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9: 67-75.

Références bibliographiques

- Chambers H. F. 1997.** Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10 : 781-791.
- Chaux Cl.et Foury Cl . 1994.** Production légumière - tome1. Généralités (série Agriculture d'aujourd'hui).Edition Tec et Doc Lavoisier Paris, Londres, New York.
- Choi MK., Chae KY., Lee JY.et Kyung KH. 2007.** Antimicrobial activity of chemical substances derived from s-alk(en)yl L-cysteine sulfoxide (alliin) in garlic, *Allium sativum*. *Food Sci Biotechnol.* 16: 1- 7.
- Chouitah O.2012.**Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra* .Thèse de doctorat, Université d'Oran, 17-25 26 p.
- Chowdhury J.U., Mobarok H., Bhuiyan N.I. and Nandi N.C. 2009.** Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. Cultivated in bangladesh. *Bangladesh J. Bot.* 38(2): pp.181-183.
- Clement J.M. 1981.** « Larousse agricole » Librairie Larousse Paris p1208.
- Constantin E. 1996.**Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris.p : 1-14.

D

- De Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P. et Marquier P. 2002.** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Revue hygiène.* Vol. X - N°3, pp. 248- 254.
- Deng C., Yao N., Wang A. et Zhang X. 2005.** Determination of essential oil in a traditional Chinese medicine, *Fructus amomi* by pressurized hot water extraction followed by liquid- phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* P :236-237.
- Derbal R .et Medjaldi W.2014.** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de l'espèce *Allium Sativum* L. Thèse de Master, Centre Universitaire de Mila.

Références bibliographiques

-Derwich E., Benziane Z. et Boukir A. 2010. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. Res. J. Agric. & Biol. Sci., 6 (3):pp.191-198.

-Dong Y., Chellius M.K., Brisse S., Kozyrovska G. et Triplet E.W. 2003. Comparisons between two *Klebsiella*: the plant endophyte *K.pneumoniae* 342 and clinical isolate *K.pneumoniae* MGH78578. J Symbiosis 35: 247-259.

-Douglas A., Skoog H.F.J. et Nieman T.A. 2003. *Principe d'analyse instrumentale*, 5^e Edition, de Boeck diffusion, 944

-Dutertre J. 2011. Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la Réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste. Thèse d'état de docteur en médecine, Université Bordeaux 2 - Victor Segalen, 34p.

-Dwek A.C. 2002. Herbal Medicine for the Skin. Their Chemistry and Effects on Skin and Mucous Membranes. Personal Care Magazine. 3 (2), 19-21.

E

-Eisenhut M. 2007. The toxicity of essential oils, article in presse, International Journal of Infectious Diseases. 11(4): 365.

-El Kolli M. 2008. Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Athemis pedunculata* Desp., d'*Athemis punctata* Vahl. et de *Daucus crinitus* Desf. Thèse de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.

-Elnima El., Ahmed SA., Mekkawi AG. and Mossa JS. 1983. The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie*. 38 (11) 747-748.

-Elodie G . 2011. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat, L'Université de Corse, 49-50 .

-Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D. 2007. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

Références bibliographiques

-Essman EJ. 1984. The medical uses of herbs. *Fitoterapia*. 55: 279-289.

F

-FAO STAT .2004. Microsoft Encarta 2007 -1993-2006 Microsoft Corporation

-Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z. 1986. Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé., 64 (2) : 159-164.

-Fenaroli G. 1995. Fenaroli's Handbook of flavor ingredient, 3rd ed.CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

-Ferhat M.A., Meklati B.Y.Et Chemat F. 2010. *Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions* .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157 p.

-Fernandez X.et Cabrol-bass D. 2007. Analyse des arômes, Techniques-Ingénieur. pp. 3233- 5, 10.

-Fisher K. et Phillips C .2009. In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycinresistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J. Biomed. Sci.* 66: 180-185

-Fouché J.C.,Marquet A.et Hambuckers A.2000. Les plantes médicinales, de la plante au médicament.Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman.

-France-Ida J.1996. Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essence. 3 :5-6.

-Franchomme P.et Pénéol D. 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.

G

-Gámiz-Gracia L. et Luque de Castro M.D.2000. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*. 51,p:1179-1185.

Références bibliographiques

- Gerhard K. H., Przemek., Jim Mattsson., Christian S. , Hardtke Z., Renee Sung .and Thomas B.1993.Studies on the role of the *Arabidopsis gene* *monopteros* in vascular development and plant cell axialization .journal of physiological plant .vol 1 1p165-170
- GIRARD R. 2001. Technique d'hygiène hospitalière. Ed. Lyon sud : 90
- Gildo P. 2006. Précis de phytothérapie, Larousse Encyclopedie MEMO, Edition Alpen , p 34.
- Gonny M., Bradesi P.et Casanova J .2004. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using 13C-NMR spectroscopy. *Flavour Fragr. J.* 19: 424- 433.
- Grieve M. 1972. A Modern Herbal , volume 1, A to H. 2nd ed. New-Yok: Dover publications, 443 p.
- Guenther E .1975-1977.The essential oils Volumes II, IV and VI. Robert E Krieger Publishing.



- Haciseferogullari H., Ozcan M., Demir F.et Calisir S. 2005.Somenutritional and Technological properties of garlic. *Journal of Food Engineering*; 68: 463- 469.
- Hammer K.A., Carson C.F. et Riley T.V .1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl Microbiol.* 86(6): 985-990.
- Hayes AJ.et Markovic B .2002. Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chem Toxicol.*40: 535-543
- Hettiarachichi D.S. 2008. Volatile oil content determination in the Australian sandalwood industry: Towards a standardised method. *Sandalwood Research Newsletter*, Issue 23;pp.1-4.
- Hernandez Ochoa L-R. 2005. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par une combine « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse.
- Huitleme T.V. 1818. Dictionnaire des sciences médicales. Paris.

Références bibliographiques

-**Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L. 1998.** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18: 563-582.

I

-**Inouye S., S. Abe. et repots. 2003.** Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts *International Journal of Aromatherapy* , vol 13p 33-41.

J

-**Jean .Benoît Legault –PasseportSanté.net ; D'après Healthy News ; 9 décembre 2003**

-**Jean b.1999.** pharmacognosie-phychimie, plantes médicinales, Editions Tec&Doc, Editions médicales internationales ,1120P.(ISBN2-7430-0315-4).

-**Jansen H., Müller B .and Knobloch K. 1987 .**Allicin characterization and its determination by HPLC. *Planta Medica*. 53 (6) 559-562.

K

-**Kalemba D. et Kunicka A.2003.**Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829

-**Kato T., Lijima H., Ishihara K., Kanek T., Hirai K., Naito Y et Okuda K. 1990 .** Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* 31(4) : 301-307.

-**Kechkar M. 2008.** Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine, Algérie. 99p.

-**Khadri S.2009.** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'ail cultivé (*Allium sativum*) de l'est Algérien vis-à-vis de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de magister en Biochimie Université Badji Mokhtar-Anaba.

Références bibliographiques

-**Kim N.S.et Lee D.S. 2002.** Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* . 98,p: 31-47.

-**Kimbaris AC., Siatis NG., Daferera DJ., Tarantilis PA., Pappas CS.et Polissiou MG. 2006.** Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem.* 13: 54-60

-**Kunle, O.et J. Okogun. 2003.** Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract *Phytomedicine* .Vol 10. P59-61.

L

-**Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcock A. et Coventry M.J. 1998 .** The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L) against acid-tolerant food microflora. *Lett Appl Microbiol.* 1998, 26(3): 209-214.

-**Lagunez-Rivera L. 2006.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. P :15-35.

-**Lahlou M. 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18 : pp. 435-448.

-**Lahrech K. 2010.** Extraction et analyse des huiles essentielles de menthe pulegium L. et de *saccocalyx satureioide*. tests d'activités antibactériennes et antifongiques. Thèse de Magister, Université d'Oran Es-Sénia 2-3p

-**LAIB I .2011.** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs .Thèse de Magister en Sciences Alimentaires, Université mentouri constantine P28-29.

-**Larousse.2001.**Encyclopédie des plantes médicinales :Identification, préparations, soins.P28-31.

Références bibliographiques

- Lefrançois P. et Ruby F Dionne J-Y.2006.**Ail. Société Canadienne de Recherche surLe PSN. P23
- Leung Albert Y .1980.** Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics. Wiley-Interscience Publication New York.
- Longevialle P. 1981.** Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson,Paris.p :32- 35.
- Lucchesi M. E. 2005.** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat. Université de La Réunion, 72-143p.
- Luque de Castro M.D. et Jiménez-Carmona M.M. 1998.** Conventional techniques for the isolation of valuabales essential oils. *Trends Anal. Chem.* 17 ,p: 441.



- Marzoukia H., Elaissib A., Khaldic A., Bouzidd S., Falconierie D., Marongiu B., Pirasa A. and Porcedda S. 2009.** Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Natural Products Journal*, Vol. 2; pp. 86-91.
- Matyar A., Kaya A. and Dinçer S. 2008.** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, *Turkey Science of The Total Environment*, 15: 279-285.
- Mayachiew P. et Devahastin S. 2008.** Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 41; pp. 1153-1159.
- Medjoudj H. 2007.** Etude du comportement au sechage de six legumes : carotte, courgette, cardon, pomme de terre, ail et oignon. Thèse de magister en sciences alimentaires, Université Mentouri de Constantine, 33-38p.
- Mendez Lagunas L. 2007.** L'effet des conditions variables de séchage sur la cinetique de séchage et la qualité de l'ail.Thèse doctorat en Sciences et Technologie des Aliments, Université Laval Québec,12p.

Références bibliographiques

-**Mohammad S., Abu-Darwish and Abu-Dieyeh Z.H.M. 2009.** Essential oil content and Heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 11, N° 1, pp.59-63.

-**Moore GS.et Atkins RD. 1997.**The fungicidal and fungistatic effects of an aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi. *Mycologia*; 69: 341-48.

N

-**Najjaa H., Neffati M., Zouari S.and Ammar E.2007.** Essential oil composition and Antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum* L.,a North African endemic species. *C.R.Chimie*;10:820_826.

-**Nataro J. P.and Kaper J. B. 1998 .** Diarrheagenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11 : 142-201. Novelli G. P. (1997) Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol.* 48 : 517-527.

-**Nicola M.et Daniel C. 1998.** Activité technologiques en microbiologie-Téchniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'aquitaine - Bordeaux, pp : 152.

-**Nostro A.,Germano M.p.,D'Angelo V.,Marino A.Et Cannatelli M.a.2000.** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity.Lettres en microbiologie appliquée.30 (5), p 379.

O

-**Ohta R., Yamada N., Kaneko H., Ishikawa K., Fukuda H., FujinoT. and Suzuki A. 1999.** *In vitro* inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. *Antimicrobial Agents and chemotherapy.* 43, 1811-1812.

-**Olivier B. 2014.** Y a-t-il une place pour la phytothérapie dans la prévention des maladies cardiovasculaires. thèse de docteur en pharmacie diplôme d'état, Université Joseph Fourier, 44.

-**Olle M. and Bender I. 2010.** The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research* 8 (3), pp.687-696.

Références bibliographiques

-**Ouamba J.M. 1991.** Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo. Extraction et analyse des huiles essentielles Oximation des aldéhydes naturels. Mémoire de magister. Université Montpellier II, 342p.

-**Ozel M.Z., Gogus F.et Lewis A.C. 2003.** Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*. 82,p: 381-386.

P

-**Paré J. 1997.** Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles, 4 :p.4.

-**Perfumer .et Flavorist. 2009.** A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries, Vol. 34. In Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.

-**Philippon A. 1995.** Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. *Lett. Infectiol.* 10 : 619-630.

-**Pibiri M.C.2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p :177.

-**Pradeau D. et Cohen Y. 1992.** L'analyse pratique du médicament, Ed.médicales internationales. P :418-428.

R

-**Renaud V. 2003.**Tous les légumes courants, rares ou méconnus, cultivables sous nos climats Les éditions Eugen Ulmer Paris p 224

-**Rhayour K. 2002.** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 10-170p.

Références bibliographiques

- Richard H. 1992.** Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p.
- Richard H. et Loo A. 1992.** Composition des extraits d'épices et herbes aromatiques. *In* Richard H (coordonnateur) Epice et Aromates. Tec et Doc – Lavoisier, apria.
- Robinson T. 1991 .**The organic constituents of higher plants. The chemistry and interrelationships. Cordus Press, MA, USA.
- 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.
- Roulier G. 1992.** Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Edt. Dangles. France.



- Salle J.L. et Pelletier J. 1991.** Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, pp.19-45.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibanez E., Senorans FJ. et Reglero G. 2005.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food Prot.* **68**: 790-795
- Satiadev S. 1998.** L'ail condiment et médicament. *PROSI Magazine* – N° 351.
- Scheffer J.J.C. 1996.** Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.*, 10:S6-S7.
- Schnaubelt K . 1998 .** Advanced Aromatherapy. Vermont :Healing Arts Press.
- Schwartz R., Davis R .et Hilton T.J. 1992.** Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement. *Am. J. Dent.* 5(3) : 147-150.
- Seenivasan P. 2006 .** *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *Journal of Complementary and Alternative Medicine.* vol 9 p6-39.

Références bibliographiques

- Shaath NA., Flores FB., Osman M. and Abd-el Aal M .1995.** The essential oil of *Allium sativum L.*, Liliaceae (Garlic). In Charalambous G (Ed.), Food Flavors: Generation, Analysis and Process influence. Elsevier Science.
- Shankaranarayana ML., Raghavan B., Abraham KO. and Natarajan CP .1982.** Sulphur Compounds in Flavours. In Morton ID and Macleod AJ (Ed) Food Flavours, part A Introduction. Elsevier Scientific Publishing Company.
- Shin S.et Kim JH. 2005 .**In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res.* **28**: 897-901
- Silano V. and Delbò M. 2008.** Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller. EMEA, European Medicines Agency. London ; 23p.
- Soubeiran E. 1857.** Traite de pharmacie theorique et pratique, volume 1,V. Masson.P637.
- Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M. and Lima E.O. 2006.** Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, 87 (1), pp. 22-25.
- Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Meireles M.A.A., Moura L.S. and Marchese, J. A. 2006.** Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var. *dulcis* in the season of the year. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, Vol.8, pp.86-90.
- Su Y.C., Lu S.Y., Ho C.L., Wang E.I-C. and Wei X.T. 2008.** Composition and bioactivities of the leaf essential oils of *Cinnamomum subavenium* Miq. from Taiwan. *Journal of Essential Oil Research* Vol. 20; pp. 328-335.

T

- Tepsorn R. 2009.** Antimicrobial activity of thai traditional medicinal plants extract incorporated alginate-tapioca starch based edible films against food related bacteria including foodborne pathogens. Doctorate Thèses. Thailand, 370p.

Références bibliographiques

-Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A. et Nazemi J .2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Phytomedicine*. **17**: 142-145

V

-Valnet J. 1984 . Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris p 544

-Vargas I., Sanz I. et Prima-Yuferá E. 1999. Antimicrobial and Antioxidant compounds in the non volatile fraction of expressed range essential oil. *J. Food Prot.* 62(8): 929-932

W

-Wan J., Wilcock A. et Coventry MJ .1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 152-158

-Wannissorn B., Jarikasem S., Siriwangchai T. and Thubthimthed S .2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*. **76**: 233-236

-Wilkinson J.M. 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII. pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.

Y

-Yoshida H., Iwata N., Katsuzaki H., Naganawa R., Ishikawa K., Fukuda H., Fujino T. and Suzuki A. 1998. Antimicrobial activity of a compound isolated from an oil-macerated garlic extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(5) 1014-1017.

Références bibliographiques

Z

-**ZAIKA L. L. 1988.** "Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination" Journal of Food Safety Vol. 9(2): 97-118.

-**Zeghad N.2009.** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (thymus vulgaris, rosmarinus officinalis) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale) , Université Mentouri Constantine, p 02.

Résumés

Résumé :

Dans ce travail on a fait une étude comparative entre les activités antibactérienne de quatre variétés d'*Allium Sativum* (Germidour, Mocpta Bulgar, Rouge Locale et Messidrom) appartenant à la famille de liliacée vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)), cette étude a été réalisée au niveau des laboratoires pédagogiques du centre universitaire de Mila.

L'extraction des huiles essentielles, à partir des bulbes des variétés étudiés , a été réalisée par la méthode d'hydrodistillation en utilisant un dispositif d'extraction de type Clevenger, les rendements en huile essentielle pour les variétés : Germidour, Mocpta Bulgar, Rouge Locale et Messidrom étaient de 0,63% , 0,52% , 0,51% et 0,46% respectivement.

À l'aide de la technique de diffusion par disques et la technique de dilution nous avons testé l'activité antibactérien des huiles essentielle qui a donnée des résultats intéressants, les quatre variétés se sont révélées actives contre toutes les bactéries étudiées à l'exception de la variété Messidrom qui n'a aucun effet avec toutes les bactéries sauf l'*E. Coli*. L'extrait brut de l'HE de la variété Rouge Locale et de la variété Germidour étaient les plus actifs parmi les autres extraits avec un diamètre d'inhibition de croissance de 10 mm pour la bactérie *E. coli* et *K. pneumoniae*.

Concernant la CMI obtenus avec toutes les variété contre l' *E.Coli* (ATCC 25922) est de 12.5 % ,qui est de même à celui obtenus avec la variété Mocpta Bulgar contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des quatre variétés étudiées sont très faibles comparativement à ceux des antibiotiques testés (gentamicine et cotrimoxazol avec de diamètre de zone d'inhibition de 25mm et 31 mm respectivement).

Mots clés: *Allium Sativum*, Rouge Locale , Messidrom ,Germidour, Mocpta Bulgar, Huile essentielle ,Extraction, Hydrodistillation , Activité antibactérienne, Concentration minimale inhibitrice .

Abstract:

In this work we made a comparative study of the antibacterial activities of four varieties of *Allium sativum* (Germidour, Mocpta Bulgar, Red and Local Messidrom) belonging to the lily family vis-à-vis four bacterial strains (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603)), this study was conducted at the teaching laboratories of the University Centre of Mila.

The extraction of essential oils from the bulbs of the studied varieties was conducted by the steam distillation method using an extraction device types Clevenger, the yields of essential oil to the varieties: Germidour, Mocpta Bulgar, Red Locale and Messidrom were 0.63%, 0.52%, 0.51% and 0.46% respectively.

Using the disk diffusion technique and the dilution technique we tested the antibacterial activity of the essential oils that gave interesting results, the four varieties proved to be active against all bacteria studied except Messidrom the variety that has no effect with all bacteria except *E. Coli*. HE The crude extract of the variety Rouge Local and variety Germidour was the most active of the other extracts with a growth inhibition diameter of 10 mm for *E. coli* and *K. pneumoniae*.

Regarding the MIC obtained with all the variety against the *E. coli* (ATCC 25922) is de12.5%, and that obtained with the variety Mocpta Bulgar against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

The results of the antibacterial activity of the essential oils of four study varieties are very low compared to that of the tested antibiotics (gentamycin and cotrimoxazole with 25mm inhibition zone diameter and 31 mm respectively).

Key words: *Allium sativum*, Red Locale, Messidrom, Germidour, Mocpta Bulgar, essential oil, extraction, steam distillation, Antibacterial activity, minimum inhibitory concentration.

الملخص :

تمت هذه الدراسة بالمخابر البيداغوجية للمركز الجامعي لولاية ميلة حيث تضمنت إجراء مقارنة بين أربعة أصناف من نبات الثوم (Messidrom و Germidour, MocptaBulgar, Rouge locale,) الذي ينحدر من العائلة الزنبقية وهذه المقارنة تتعلق بفعالية الزيوت الأساسية لهذه الأصناف ضد أربع سلالات بكتيرية :
S.aureus (ATCC 25923), P.aeruginosa (ATCC 27853), E.coli (ATCC 25922) و
K.pneumoniae (ATCC 700603).

بالنسبة لاستخلاص الزيوت الأساسية من خلال فصوص الأصناف المدروسة فقد كان عن طريق عملية التقطير ببخار الماء، والتي أعطت مردود يختلف من صنف لآخر حيث كان المردود كالتالي :

Messidrom 0.46%, Rouge locale 0.51%, MocptaBulgare 0.52% , Germidour 0.63%

بعدها و بالإعتماد على تقنية الإنتشار على الأقراص وطريقة التخفيف قمنا بإجراء اختبار النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية لهذه الأصناف حيث أعطت نتائج مهمة إذ نلاحظ أن الزيوت الأساسية للأصناف الأربعة أظهرت نشاط ضد كل السلالات البكتيرية باستثناء الزيت الأساسي للصنف Messidrom الذي أظهر نشاط ضد E.Coli فقط، كما نلاحظ أن الزيت الصافي للصنف Rouge locale و Germidor هو الأكثر فعالية من بين الزيوت الأساسية الصافية الأخرى بقطر مثبت للنمو 10 مم لكل من E.Coli و K.pneumoniae أما فيما يخص النشاط الأصغر المثبط لهذه الزيوت والذي تحصلنا عليه بواسطة عملية التخفيف فقد كان 12.5% مع كل الأصناف المدروسة ضد E.Coli و مع الصنف MocptaBulgare فقط ضد P.aeruginosa و S.aureus و K.pneumoniae.

نتائج النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية للأصناف المدروسة تعتبر جد ضعيفة مقارنة مع نتائج النشاط المضاد للبكتيريا للمضادات الحيوية المستعملة Cotrimoxazole و Gentamicine بقطر مثبت للنمو 25 مم و 31 مم على الترتيب.

الكلمات المفتاحية : الثوم - Rouge locale - Germidour - Messidor - MocptaBulgare الزيوت الأساسية - استخلاص - التقطير ببخار الماء - النشاط المضاد للبكتيريا - النشاط المثبط الأصغر.

Annexes

Annexes

Annexe 01 :

❖ Appareillage:



Agitateur



Autoclave



Balance



Bec bunsen



Etuve



Micro-onde



Spectrophotomètre



Vortex

❖ Verreries:

Anse de platine

Baguette d'agitation

Baraux

Boîtes de pétrie

Écouvillon

Eprouvettes

Fioles

Flacons (1000 ml)

Annexes

Papier Watman N°3

Pince

Micropipette

Tubes à culture

Tubes à essais

Spatules

❖ Produits:

Bouillon nutritive poudre (BN)

Chlorure de sodium (NaCL)

Dimethylsulfoxyde (DMSO)

Eau distillé

Gélose Muller Hinton poudre (MH)

Annexes 02 :

❖ Composition des principaux Milieux de culture utilisés

• Milieux liquides

Eau physiologique stérile

Composition en g/l

Chlorure de sodium (NaCL).....0,9g

Eau distillée..... 100ml

Bouillon nutritive (BN)

Composition en g/l:

Bouillon nutritive poudre.....12g

Eau distillée.....600ml

PH=7.2

Stérilisation à 121°C/15min

• Milieux solides

Gélose Muller Hinton (MH)

Composition en g/l

Gélose Mueller Hinton poudre.....38g

Eau distillée.....1L

PH =7.3

Stérilisation à 121°C/15min