

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.AGR/2017

MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

NEZLA Soraya

Thème

*Optimisation de l'extraction et étude des activités
antibactérienne et anti-hémolytique des protéines de
l'ail : Allium Sativum.*

Soutenu le : 25/ 06 / 2018

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

M. KADRI N

MCA

Univ. de Bouira

Président

M.CHERGUI A

MAA

Univ. de Bouira

Promoteur

M. ADRAR N

MAB

Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2017/2018

RESUME

L'*Allium sativum* L. est une plante médicinale et un membre de la famille Alliaceae. Les constituants chimiques les plus signalés dans les bulbes d'ail sont les composés soufrés et les protéines qui représentent 6% de la composition totale de la plante, ces derniers ont été l'objet de notre étude. Nous avons réalisé une étude préliminaire sur le choix de la méthode d'extraction et l'effet de facteur temps, les meilleurs résultats ont été obtenus lors de l'extraction par macération avec l'utilisation du broyat frais. L'optimisation de l'extraction de la fraction protéique via le plan d'expérience Box-Behnken (RSM) a été une étape suivante avec comme paramètres optimales ; un pH de 6,22, un temps de macération de 1h42 min et une température de 24,53 C°. La fraction optimisée a subi une électrophorèse SDS-PAGE dont deux bandes ont été révélées, celle d'Alliinase (110 kDa) et celle de ASPI et/ou SOD avec un poids moléculaire voisinage de 20 KDa. La méthode de diffusion des puits a été utilisée afin d'étudier la sensibilité de *Entérocooccus faecalis* et *Staphylococcus aureus* vis-à-vis l'extrait, une zone de 20 ±0,5 mm été exprimé par les deux souches. L'étude a été complété par la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide et la CMB sur milieu solide pour les mêmes souches qui ont exprimé une CMI de 9,36 mg/ml et 18,72 mg/ml respectivement pour *Entérocooccus faecalis* et *Staphylococcus aureus*. Les CMB ont été révélés a partir de : 37,45 mg/ml et 9,36 mg/ml respectivement pour *Entérocooccus faecalis* avec un effet moyennement bactéricide et *Staphylococcus aureus* avec un effet bactéricide. Enfin, le travail été achevé par l'étude de l'activité anti-hémolytique du même l'extrait sur les érythrocytes humains et en présence d'un générateur d'hémolyse, le H₂ O₂. Le pourcentage le plus significative de l'activité été de 94,24% pour une concentration protéique de 0,25 mg/ml.

Mots-clés : *Allium sativum*, optimisation, *Entérocooccus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, antibactérienne, Anti-hémolytique.

ABSTRACT

Allium sativum L. is a medicinal plant and a member of the family Alliaceae. The most reported chemical constituents in garlic bulbs are the sulfur compounds and the proteins which represent 6% of the total composition of the plant; these were the object of our study. We carried out a preliminary study on the choice of the extraction method and the effect of time factor; the best results were obtained during the extraction by maceration with the use of the fresh mash. The optimization of the extraction of the protein fraction via the Box-Behnken Experiment Plan (RSM) was a next step with optimal parameters; a pH of 6.22, a maceration time of 1 h 42 min and a temperature of 24.53 ° C. The optimized fraction was subjected to SDS-PAGE electrophoresis of which two bands were revealed, that of Alliinase (110 kDa) and that of ASPI and / or SOD with a molecular weight close to 20 KDa. The well diffusion method was used to study the susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* to the extract, an area of 20 ± 0.5 mm expressed by both strains. The study was supplemented by the determination of the MIC by the liquid dilution method and the solid-state CMB for the same strains that expressed a MIC of 9, 36 mg / ml and 18.72 mg / ml respectively. For *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. BMCs were revealed from: 37, 45 mg / ml and 9, 36 mg / ml respectively for *Enterococcus faecalis* with a moderately bactericidal effect and *Staphylococcus aureus* with a bactericidal effect. Finally, the work was completed by studying the anti-hemolytic activity of the same extract on human erythrocytes and in the presence of a generator of hemolysis, H₂ O₂. The most significant percentage of the activity was 94.24% for a protein concentration of 0.25 mg / ml.

Keywords: *Allium sativum*, Optimization, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, Antibacterial, Antihemolytic.

ملخص

لأليوم sativum L. هو نبات طبي وعضو في الأسرة Alliaceae. أكثر المكونات الكيميائية المعلنة في إنتاج مركبات الكبريت والبروتينات التي تمثل 6% من التركيب الكلي للنبات ؛ هذه كانت موضوع دراستنا. قمنا بإجراء دراسة أولية حول اختيار طريقة الاستخراج وتأثير عامل الوقت ؛ تم الحصول على أفضل النتائج مع استخدام الهريس الطازج. كان تحسين استخلاص جزء البروتين عن طريق خطة تجربة Box-Behnken (RSM) خطوة تالية مع المعاملات المثلى ؛ درجة الحموضة من 6,22، وقت النقع من 1 ساعة و 42 دقيقة و درجة حرارة 24.53 درجة مئوية. جزء الأمثل تعرضت لهجرة كهربية SDS-PAGE سجل ظهور شريطين : الأول يمثل 110 كيلو دالتون (alliinase) و ASPI و / أو SOD بوزن جزيئي قريب من 20 KDa. تم استخدام أسلوب جيد نشرها لدراسة قابلية المكورة المعوية البرازية والمكورات العنقودية الذهبية لاستخراج، وتبلغ مساحتها 20 ± 0.5 مم أعرب كل من السلالات. دراسة استكمال تحديد MIC من طريقة التخفيف السائل و CMB الحالة الصلبة لسامي السلالات التي يتم التعبير عنه MIC 9، 36 ملغ / مل و 18.72 ملغ / مل كيلو دالتون للمكورات المعوية البرازية والمكورات العنقودية الذهبية. وكشف خلايا نخاع العظم من: 37، 45 ملغ / مل و 36 و ملغ / مل على التوالي للمكورة المعوية البرازية مع تأثير مبيد للجراثيم معتدل والمكورات العنقودية الذهبية مع تأثير مبيد للجراثيم. وأخيرا ، تم الانتهاء من العمل من خلال دراسة النشاط المضاد للملح من نفس المستخلص على كريات الدم الحمراء البشرية وفي وجود مولد انحلال الدم ، H₂ O₂ كانت أهم نسبة من النشاط 94.24 % تركيز البروتين من 0.25 ملغ / مل.

Remerciement

Au terme de ce modeste travail, je tiens à remercier tout d'abord le Bon Dieu le tout puissant, qui ma donné la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement et très particulièrement mon promoteur M .CHERGUI A, de m'avoir donné l'honneur de m'encadrer et pour son aide, ses conseils précieux, son orientation et sa grande disponibilité à toute épreuve.

Je remercie également, M.KADRI N maitre de conférence classe A, pour avoir accepté de présider le jury

Mes sincères remerciements vont également à M .ADRAR N, maitre assistant classe B, d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie également Mlle MAAMRI .A et les autres doctorantes pour leurs disponibilités et leurs soutiens.

Mes remerciements les plus sincères aux ingénieurs de laboratoires : Biochimie et microbiologie et en particulièrement à Mme MESRANE .K pour ses conseils pratiques, son aide matériels et sa disponibilité.

Sans oublier mes amies qui ont su créer un esprit d'équipe et de collaboration très bénéfique.

Je tien à remercié toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

DEDICACE

Je dédie ce travail :

***A mon très cher père NEZLA Ismail, je lui dédie avec fierté ce modeste travail qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention qu'il m'a tant réservé, je suis très reconnaissante et j'aurai tant aimé partager la joie de ma réussite avec lui.*

***A mon beau père BOUDAA Omar, pour leur soutien moral et leur conseils qui ma aidé à réaliser ce travail.*

***A ma chère mère AZERAR Sabiha, et ma chère belle-mère ACHIOU Noura pour tout les sacrifices et leurs soutien moral, avec toute mon affection et ma reconnaissance; merci à vous.*

*** A mes frères : Larbi, Said, Toufik, Mouni et Karim : pour leurs aide et leurs amour. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de succès.*

***A mes sœurs : Hakima et son mari, Thilleli et en particulièrement notre ange Rania, pour leurs soutien, pour leur amour et soins.*

***A mes nièces : Ania, Thanina et leurs frère Abed Allah.*

***A la mémoire de mes grands-parents paternel : NEZLA Labri et GUETTAF louiza qui auront tant aimé assister à cet exploit. Que Dieu les accueille en son vaste paradis.*

***A mes grands-parents maternel : AZERAR Mnd Cherif et BESSOUDI Mebarka.*

***A toute ma famille : oncles, tantes, cousins et cousines.*

***A mes très chères amis(e) : Dihia, Chafiaa, Chahrazed, Siham, Djohar, Baya, Zahra, Hakima, Zina, Houria, Cillia, Ahlam, Farah, Djedjiga et en particulièrement à Akli, pour avoir grandement contribué à rendre ces années inoubliables. Vous êtes et vous resterez ma deuxième famille.*

*** Exceptionnellement à mon prof et promoteur, Monsieur CHERGUI Achour. Sachez que vous êtes, pour moi, un exemple édifiant devant me servir de référence.*

***A tous les profs qui m'ont enseignée depuis le premier palier jusqu'à ce niveau.*

Nezla Soraya



Liste des abréviations

- [c] : concentration
- µg/ml : microgramme par Millilitre
- µl : microlitre
- 3D : Trois dimensions
- ANOVA : Analyse Of Variance, Analyse de la Variance
- ASA : Allium Sativum Agglutinine
- av. J.-C : avant Jésus-Christ
- B.N : bouillon nutritif
- BSA : Bovin Serum Albumin, Albumine de Sérum Bovin
- C° : degré Celsius
- CC : cellules corticales
- Cm : Centimètre
- CMB : Concentration Minimale Bactéricide
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
- DO : Densité Optique
- E : Extrait
- E. Faecalis : *Enterococcus faecalis*.
- E.Coli : *Escherichia coli*
- Ex : Extrait
- Fig : Figure
- g : gramme
- G.N : gélose nutritive
- g/l : gramme par litre
- h : heur
- HCl : Acide Chlorhydrique
- kDa : kilo dalton
- kHz : Kilo hertz
- M : Molaire
- mA : milliampère
- mg/ml : milligramme par millilitre

- min : minute
- ml : millilitre
- mm : millimètre
- mM : millimolaire
- MT : Marqueur de Taille
- N° : Numéro
- nm : nanomètre
- PBS : Phosphate Buffered Saline, tampon phosphate salin
- Ph : potentiel hydrogène
- POX : Peroxydase
- Ps : pepsine
- PSC : gaine parenchymateuse
- R² : coefficient de détermination
- RSM : Response Surface Methodology , méthodes des surfaces de raiponce
- SDS : Dodécylsulfate de Sodium
- SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
- Staph aureus : *Staphylococcus aureus*
- t/min : tour par minute
- Tris : trishydroxyméthylaminométhane
- Try : trypsine
- UFC/ml : unité formant colonie par millilitre
- UV : ultraviolet
- V : volte
- v/v : volume par volume
- W : Wat

Liste de figures

Figure	Titre	Page
01	Présentation schématique d'une liaison peptidique chez les protéines	05
02	Structures de quelques alcaloïdes	08
03	Structure chimique de quelques monoterpènes	09
04	Structure chimique de quelques composés aromatiques	09
05	Classification des tanins	10
06	De la plante au médicament	12
07	l'ail avec la spathe membraneuse spécifique	15
08	plant <i>Allium sativum</i>	15
09	transformation d'alliin en allicin	16
10	localisation de la commune d'Aghebalou sur la carte d'Algérie	20
11	Localisation de la commune d'Aghebalou dans la wilaya de Bouira	20
12	Illustration du plan de box-Behnken pour trois facteurs	24
13	Schéma résumant le protocole d'extraction de la fraction protéique de l'Ail	25
14	Dialyse de dessalage de solution protéique	27
15	Migration des protéines sous l'effet du champ électrique	28
16	Schéma résumant le protocole de revivification des souches bactériennes	30
17	Courbe des valeurs prédites en fonction des valeurs observées pour la concentration protéique de l'Ail	40
18	Valeurs Résiduelles et valeurs prédites par rapport à l'écotype	40
19	Surface de réponse montrant l'effet de la température et temps de macération sur le taux des protéines	41
20	Surface de réponse montrant l'effet de temps de macération et le PH sur le taux des protéines	41
21	Surface de réponse montrant l'effet de température et le PH sur le taux des protéines	42
22	les conditions optimales d'extraction de la fraction protéique de l'ail	43
23	Profile protéique SDS-PAGE des extraits précipités à 60% de sulfate d'ammonium	44
24	Photo de l'effet de l'extrait protéique sur les bactéries d'Entérocooccus <i>faecalis</i>	47

25	Photo de l'effet de l'extrait protéique sur les bactéries de <i>staphylococcus aureus</i>	47
26	Photo de résultat de la CMI de l'extrait sur d' <i>Entérocooccus faecalis</i>	48
27	Photo de résultat de la CMI de l'extrait sur <i>Staphylococcus aureus</i>	58
28	photo de l'effet bactéricide de l'extrait sur <i>Entérocooccus faecalis</i>	50
29	photo de l'effet bactéricide de l'extrait sur <i>Staphylococcus aureus</i>	50
30	Photo présente l'activité anti-hémolytique de l'extrait protéique de l'ail	53

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Les principales classes des composés phénoliques	07
II	Situation botanique de l'espèce <i>Allium sativum</i> L	14
III	Composition d'allium sativum (par rapport à 100 g d'allium sativum brut).	18
IV	Matrice de domine d'étude	24
V	Concentration protéique de l'extrait frais et conservé	38
VI	concentration protéique des extraits : avec et sans sonication	39
VII	Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expérience Box-Behnken (RSM) de la fraction protéique de l'Ail	41
VIII	Analyse de la variance de protéines totales	43
IX	Valeurs des diamètres des zones d'inhibition	49
X	La concentration minimale inhibitrice des protéines de l'ail	52
XI	Nature de l'activité antibactérienne	53
XII	Pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse	55

Table des matières

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

Partie I : synthèse bibliographique

Chapitre I : Les plantes médicinales

I 1	Historique.....	03
I 2	Définition des plantes médicinales.....	03
I 3	Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	03
I.4	Composition biochimique des plantes médicinales.....	04
I.4.1	Métabolites primaires.....	04
I.4.1.1	Définition et structure protéines.....	04
I.4.1.2	Classification des protéines végétales.....	05
	A. Albumines.....	05
	B. Globulines.....	05
	C. Les glutélines et les prolamines.....	06
I.4.2	Les métabolites secondaires.....	06
I.4.2.1	Définition de principe actif.....	06
I.4.2.2	Principaux groupes des principes actifs.....	06
	a) Polyphenols.....	07
	b) Les alcaloïdes.....	07
	c) Les huiles essentielles.....	08
	d) Les tannins.....	10
I.5.	Utilisation des plantes médicinales.....	11
I.5.1.	Utilisation en médecines.....	11
I.5.2.	En Agriculture.....	12
I.5.3.	En alimentation assaisonnements.....	12
I.5.4.	En cosmétique.....	12

Chapitre II : L'ail

II.1	Origine de l'Ail.....	13
II 2	Classification traditionnelle.....	13
II.3.	<i>Allium sativum</i>	13
II.3.1	Taxonomie.....	13
II.3.2	Description.....	14
II.4	Culture et conditionnement.....	15
II.5	Composition chimique.....	15
II.5.1	Les protéines.....	16

II.5.2	Les glucides.....	17
II.5.3	Les lipides.....	17
II.5.4	La composition en acides aminés libres.....	17
II.5.5	Les minéraux et oligo-éléments.....	17
II.6	Propriétés pharmacologiques et utilisations	18
II.7	Toxicité de l'ail	19

Partie II : Expérimentale

1. Matériels et méthodes

1.1.	Matériel biologique.....	20
1.1.1.	Matrice végétale.....	20
1.1.2.	Souches bactériennes	20
1.1.3.	Appareillage.....	21
1.2.	Méthodes	
1.2.1	Etudes préliminaires.....	21
A.	Etude de l'effet de la conservation sur le taux de protéines.....	21
B.	Effet de la sonication sur le taux de protéines.....	22
1.2.2	Optimisation des conditions d'extraction des protéines totales Par la méthode des surfaces de réponse RSM.....	22
1.2.3	Extraction des protéines totales dans les conditions optimales.....	25
1.2.4	Précipitation des protéines par sulfate d'ammonium	26
1.2.5	Dessalage par dialyse.....	26
1.2.6	Séparation des protéines par Electrophorèse PAGE-SDS	27
1.2.7	Tests de l'activité antibactérienne	29
a)	Revivification des souches	29
b)	Standardisation de l'inoculum des souches cible.....	30
c)	Test de sensibilité aux protéases.....	30
d)	Test d'activité par la méthode de diffusion des puits.....	31
e)	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	31
f)	Détermination de la Concentration Minimale bactéricide (CMB) en milieu solide.....	32
1.2.8	Activité anti-hémolytique sur des cellules sanguines humaines	32
a.	Préparation des érythrocytes	34
b.	La mise en évidence de l'activité anti-hémolytique	34

2. Résultats et discussion

2.1. Etudes préliminaires	34
2.1.1. Etude de l'effet de la conservation sur le taux de protéines.....	34
2.1.2. Effet de la sonication sur le taux de protéines.....	34
2.2. Optimisation des conditions d'extraction des protéines totales	35
2.2.1. Analyse de la variance de protéines totales.....	37
2.2.2. Etude paramétrique.....	40
a) Influence du temps de macération et de la température d'extraction.....	40
b) Influence du temps de macération et du Ph.....	41
c) Influence du pH et du temps de macération	42
2.2.3. Conclusion de l'étude d'optimisation.....	42
2.3. Essai de séparation électrophorétique sur PAGE-SDS.....	43
2.4. Tests de l'activité antibactérienne.....	45
2.4.1. Test d'inhibition par la méthode de diffusion des puits et sensibilité aux protéases...	45
2.4.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	47
2.4.3. Détermination de la CMB.....	48
2.5. Activité anti-hémolytique sur des cellules sanguines humaines.....	50
Conclusion et perspectives.....	54

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les plantes sont une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans plusieurs industries telles que l'industrie cosmétique, l'industrie agroalimentaire et l'industrie pharmaceutique (**BENABEDLKADER, 2012**). Quelles que soient les parties et les formes sous lesquelles elles sont utilisées, les plantes sont extrêmement riches, elles contiennent des structures chimiques complexes, ce qui les rend doués d'une multitude de propriétés médicinales (**MESSAI, 2011**).

Les plantes synthétisent de nombreux composés qui sont classés en fonction de leurs importances dans la viabilité de la plante dont les métabolites primaires qui sont indispensables à leurs existences, une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires. Ces derniers ont pour fonction notamment la protection contre les microorganismes, les animaux et même d'autres plantes. Ces métabolites jouent un rôle primordial dans la lutte contre diverses maladies et herbivores. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme tout en se basant sur les plantes médicinales (**HAMMOUDI, 2015**).

Aujourd'hui, la résistance des microorganismes aux antibiotiques est l'une des préoccupations majeures de la santé publique. A titre d'exemple *Staphylococcus aureus*, principal agent pathogène impliqué dans des infections nosocomiales, a acquis de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques dès les années 1960 (**VIEU 2014**), les souches du groupe *Bacillus cereus* qui sont résistantes aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (**YOBOUET 2016**) et les souches du groupe *Entérocooccus faecalis* dont la résistance est prononcée contre la vancomycine (**Laurent herber 2008**).

De ce fait, la recherche des nouvelles substances ayant des effets antimicrobiens devient une nécessité majeure. Pour cela, la phytothérapie constitue une solution intéressante. Plusieurs plantes médicinales sont utilisées pour ce but telles que : *Artemisia herba alba*, *Marrubium vulgare*, *Pinus pinaster* qui sont des plantes médicinales algériennes (**KAHLOUCHE-RIACHI, 2014**), ainsi que les huiles essentielles et d'autres fractions extraits de l'*Allium sativum* qui ont montrés des effets inhibiteurs sur différentes souches bactériennes (**Benkeblia, 2004; Curtis, Noll, Störmann, & Slusarenko, 2004; Eftekhari et al., 2011**).

Introduction générale

Cependant, très peu de travaux sont effectués sur l'utilisation ainsi que l'optimisation de l'extrait protéique brut de l'Ail contrairement aux autres fractions de la même plante telle que les polyphénols, flavonoïdes et autres.

Le présent travail est subdivisé essentiellement en deux parties : une partie bibliographique comprenant deux chapitres. Dans le premier nous avons présenté quelques connaissances sur les plantes médicinales et leurs principes actifs. Le deuxième chapitre le détaille de la matrice végétale utilisée : *Allium sativum*.

La deuxième partie est consacrée à un travail expérimental où nous avons réalisé l'optimisation de l'extraction de la fraction protéique de l'*Allium sativum* en adoptant un plan d'expérience Box Behnken à l'aide du logiciel Design Expert 11 dont trois facteurs les plus influençant ont été choisis : la température, le temps et le pH d'extraction . La précipitation au sulfate d'ammonium a été ensuite utilisée pour l'isolement de la fraction protéique qui a été extraite selon les conditions optimales.

Deux activités biologiques de l'extrait optimisé ont été étudiées :

- l'Activité antibactérienne sur deux souches de référence : *Staphylococcus aureus*, et *Entérocooccus faecalis*.
- Activité anti-hémolytique du même extrait optimisé.

PARTIE I :
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :
LES PLANTES
MEDICINALES

Chapitre I : Les plantes médicinales

I.1 Historique

Dès 3000 av.J.-C., la civilisation s'est épanouie en Egypte, au Moyen-Orient, en Inde et en Chine, et l'utilisation des plantes est devenue plus élaborée. Le premier recueil consacré aux plantes médicinales, le papyrus égyptien Ebers, que l'on fait remonter à 1500 av.J.-C., est le plus ancien exemple encore conservé. Il dresse l'inventaire de centaines des plantes médicinales, avec leurs modes d'utilisation, incantations et sorts. Parmi les plantes répertoriées, on trouve le balsamier (*Commiphora molmol*), le ricin (*Ricinus communis*) et l'ail (*Allium sativum*). En Inde, les Veda, des poèmes épiques rédigés eux aussi vers 1500 av.J.-C., contiennent des témoignages de la connaissance des plantes dès cette époque (**Fadi 2011**).

I.2 Définition des plantes médicinales

Plante médicinale : définie par la pharmacopée par une plante dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Aref & Heded 2015**). Egalement appelée « drogue végétale » (**Aref & Heded 2015**). Les parties les plus concentrées en principes actifs seront choisies donc il peut s'agir de la plante entière, des feuilles, de la tige, des rameaux, des sommités fleuries, de l'écorce, des racines, des fruits ou des fleurs, utilisées fraîches ou sèches (**Cazau-Beyret 2013**).

I.3 Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plus part des espèces végétales possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (**Maamri S, 2018**). On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie (**Maamri S, 2018**).

Actuellement, plusieurs travaux de recherche sont focalisés sur les plantes médicinales, afin de comprendre leur effet sur l'être humain et leur rôle dans l'environnement (**Maamri S, 2018**). En effet selon l'intérêt de l'étude réalisé on distingue :

- **Etude chimiotaxonomique** : qui consiste à rechercher des catégories de molécules dans les plantes en fonction de leur appartenance botanique.
- **Etude ethnopharmacologique** : qui consiste à recueillir des renseignements sur l'utilisation des plantes auprès des populations vivant encore près de la nature en Amérique du sud, dans les îles du Pacifique, en Afrique ou dans le sud-est Asiatique .

- **Etude pharmacologique :** est caractérisée par l'observation du comportement des plantes dans leur environnement naturel. Cette étude sert à obtenir des informations sur les interactions plantes-microorganismes, plantes-insectes et plantes-animaux qui sont associées à des signaux chimiques (**Maamri S, 2018**).

I.4 Composition biochimique des plantes médicinales

Les plantes contiennent des métabolites dits « secondaires » qui peuvent être considérées comme des substances indirectement essentielles à la vie des plantes contrairement aux métabolites primaires (les protéines, les glucides et les lipides) qui sont essentiels pour le développement et la croissance de la plante (**Krief, 2003**).

I.4.1 Métabolites primaires

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque. Les métabolites primaires rassemblent les protéines, les lipides, les carbohydrates et les acides nucléiques (**BENDIF, 2017**).

I.4.1.1. Définition et structure protéines

Les protéines sont des polymères naturels azotés dont la taille varie entre plusieurs milliers et plusieurs millions de daltons. Elles sont composées d'un enchaînement linéaire d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques (figure1). Cet enchaînement possède une organisation tridimensionnelle (ou repliement) qui lui est propre. De la séquence au repliement, puis à l'association, il existe quatre niveaux d'organisation structurale de la protéine (**BENALIA, 2016**) :

- **La structure primaire :** correspond à la succession linéaire des acides aminés, reliés entre eux par des liaisons peptidiques (**POULAIN, 2006**).
- **La structure secondaire :** décrit le repliement local de la chaîne principale d'une protéine et concerne les arrangements spatiaux entre les résidus d'acides aminés proches. De telles interactions confèrent souvent une structure périodique et ordonnée à la chaîne polypeptidique. Les hélices α et les feuillets β sont les éléments les plus importants de la structure secondaire (**Srinivasan & Rose, 1999**).
- **La structure tertiaire :** Elle correspond au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace résultant des interactions entre les résidus d'acides aminés très éloignés dans la

séquence linéaire. On parle plus couramment de structure tridimensionnelle ou structure 3D (POULAIN, 2006).

- **La structure quaternaire** : Elle se fait par l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques, identiques ou différentes, par des liaisons non-covalentes (liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, interactions hydrophobes). Chacune de ces chaînes est appelée monomère (ou sous-unité) et l'ensemble, oligomère ou protéine multimérique (KRID, 2008) .

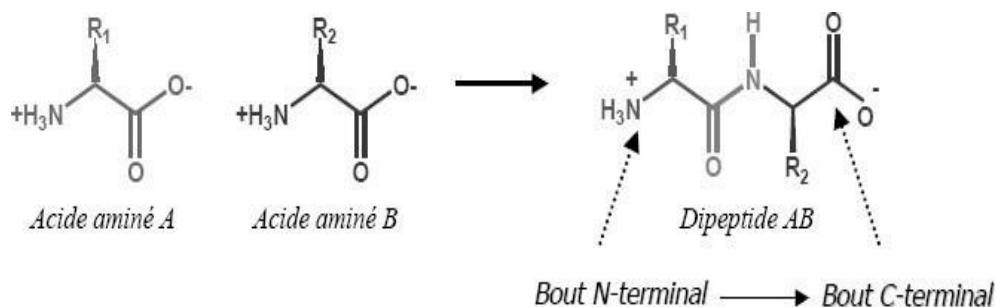


Fig 01 : Présentation schématique d'une liaison peptidique chez les protéines

I.4.1.2. Classification des protéines végétales

Il existe quatre grandes familles de protéines d'origine végétale, classées selon leur coefficient de sédimentation et selon la solubilité : les globulines, les albumines, les glutélines et les prolamines. Les albumines et les globulines constituent la majeure fraction protéique des végétaux (NESTERENKO 2012).

A. Albumines

La fraction albumine est la fraction soluble dans l'eau. Elle regroupe la plupart des protéines qui présentent une activité biologique, ainsi que les protéines de réserve telle que les enzymes, la lectine et les inhibiteurs. Elle a une masse molaire varie entre 10 kDa et 100 kDa. Généralement, les albumines présentent des teneurs élevées en lysine et en acides aminés soufrés, comme la méthionine et la cystéine, ainsi qu'une quantité élevée de ponts disulfures qui affectent leur résistance à la dénaturation thermique (NESTERENKO 2012).

B. Globulines

Les globulines sont solubles dans les solutions aqueuses salines. Elles sont constituées principalement de deux fractions caractérisées par des coefficients de sédimentation de 7S et 11S, ces fractions portent des noms spécifiques pour différents végétaux, et elle dépend de la provenance de la plante (légumineuse, céréale ou oléo-protéagineuse), ainsi que des conditions de culture (NESTERENKO 2012).

C. Les glutélines et les prolamines

La glutéline et la prolamine sont les protéines solubles dans les solutions aqueuses basiques et les mélanges eau/alcool respectivement. Leur structure est peu étudiée, mais il est connu que ces fractions représentent des agglomérats de globulines liées entre elles par des ponts disulfures et des interactions hydrophobes, et possèdent une morphologie complexe (NESTERENKO 2012).

I.4.2 Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont probablement des éléments qui participent à la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires qui sont utilisés par l'homme pour la thérapie humaine ou animale sous le nom de principe actif des drogues végétales (Krief, 2003).

I.4.2.1 Définition de principe actif

C'est une molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'Homme ou l'animal. Il est contenu dans une drogue végétale ou une préparation à base de drogue végétal (Chabrier, 2010).

Les drogues végétales sont essentiellement des plantes, parties de plantes, algues, champignons ou lichens, entiers, fragmentés ou coupés, utilisés en l'état, soit le plus souvent sous forme desséchée, soit à l'état frais. Certains exsudats n'ayant pas subi de traitements spécifiques sont également considérés comme des drogues végétales. Les drogues végétales doivent être définies avec précision par la dénomination scientifique universelle selon le système binominal (genre, espèce, variété, auteur) (Chabrier, 2010).

I.4.2.2 Principaux groupes des principes actifs

a) Polyphenols

Les polyphenols ou les composés phénoliques sont des métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal. On les trouve dans tous les fruits et les légumes (Dai & Mumper, 2010). Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus (Cheynier, 2005). Plus de 8000 structures ont été identifiées, allant des molécules plutôt simples (monomères et oligomères) aux polymères (Waksmundzka-Hajnos & Sherma 2011).

Les polyphenols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside. Ils sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), coumarines, stilbènes, flavonoïdes, lignanes, lignines, tanins (Visioli, Borsani, & Galli 2000).

Tableau. I : Les principales classes des composés phénoliques (Boubekri, 2014).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simple	Catéchol	
C6-C3	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïques	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamique	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	Citrus
C6-C2-C6	Silènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes		
	• Flavonols	Kamphérol, quercétine	Fruits, légumes, fleurs
	• Anthocyanes	Cyanidine, pélargonidine	Fleurs, fruits rouges
	• Flavanols	Catéchine, épicatechine	Pomme, raisin
	• Flavanones	Naringénine	Citrus
	• Isoflavonols	Daidzéine	Soja
(C6-C3) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3) _n	Lignines		Bois, noyau de fruits
(C15) _n	Tanins		Raisin rouge, kaki

b) Les alcaloïdes

Le terme d'alcaloïde (de l'arabe al kaly, la soude et du grec eidos, l'aspect) a été introduit par W. Meisner au début du XIX^e siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des « alcalis » (**Mohammed, 2013**).

Les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiquement hétérogène. Leurs caractéristiques communes sont la présence d'au moins un atome d'azote et leur forte activité biologique (**Medjekane, /2017**). L'atome d'azote accepte souvent un proton, ce qui leur confère un caractère légèrement basique en solution (d'où leur nom d'alcaloïdes) (**Medjekane, /2017**).

De la préhistoire jusqu'à nos jours, les alcaloïdes ont été utilisés comme médicaments relaxants musculaires, analgésique (morphine), antipaludiques (quinine), pour combattre l'excès d'acide urique (colchicine), comme anticancéreux (vinblastine, vincristine) et tranquillisants (**Medjekane, /2017**).

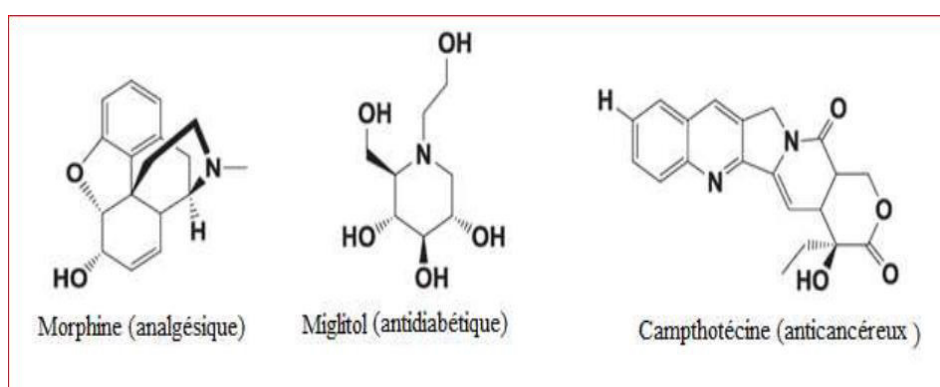


Fig .02 : Structures de quelques alcaloïdes (**Berrechioua 2016**).

c) Les huiles essentielles

Nom générique pour tous les produits lipophiles, volatils, préexistant dans une plante ou une drogue végétale (**Mehani, 2015**). Une huile essentielle est constituée de nombreuses substances chimiques peu solubles dans l'eau (**Mehani, 2015**). Dans la plante, celles-ci résultent pour la plupart du métabolisme des terpènes et sont localisées dans des organes où elles sont biosynthétisées (papilles, cellules et poils, poches, canaux) (**Mehani, 2015**). Les huiles essentielles sont obtenues par distillation à la vapeur, par hydrodistillation (entraînement à la vapeur d'eau) ou encore dans des cas particuliers, par pression mécanique (ex: agrumes) par dissolution dans des lipides (en fleurage pour des organes délicats tels que

la fleur de Jasmin) et plus fréquemment maintenant dans des gaz supercritiques (dioxyde de carbone) (Mehani, 2015) .

Les huiles essentielles ont une composition hétérogène dont les groupes majoritaires sont : le groupe des terpénoïdes, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phényle propane (Fekih 2015).

- **Groupe des terpénoïdes :** C'est le groupe le plus important. Il comprend des monoterpènes (10 atomes de carbone), des sesquiterpènes (20 atomes de carbone), des diterpènes (30 atomes de carbone) (Fekih 2015).

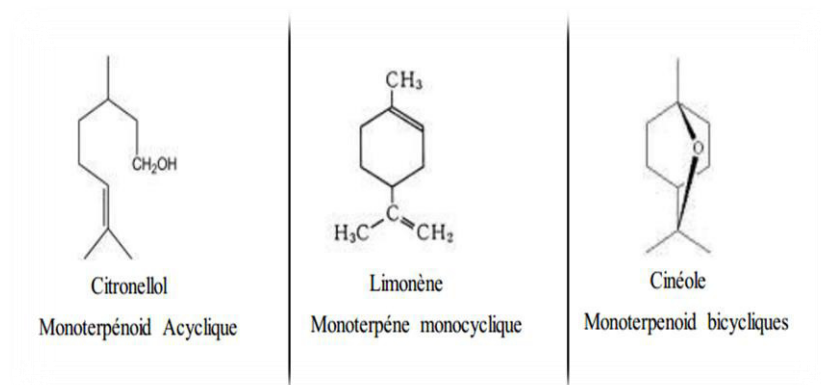


Fig.03: Structure chimique de quelques monoterpènes (Nait achour 2012).

- **Les phénylpropanes (composés aromatiques)**

Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles (Fekih 2015)



Fig. 04: Structure chimique de quelques composés aromatiques (Fekih 2015).

d) Les tannins

Ce sont des substances de saveur astringente ayant la propriété de tanner la peau et de se combiner aux protéines animales par des liaisons hydrogène (MEDJDOUB 2013).

Ce sont des composés polyphénoliques qui permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour rendre les tissus souples comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (MEDJDOUB 2013).

Chez les végétaux supérieurs, il existe deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétiques: Les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Boudjouref, 2011).

a-Tanins hydrolysables : sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques qui donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique, et les tanins ellagiques qui sont hydrolysés par les enzymes en oses et en acide ellagique (Boudjouref, 2011).

b-Tanins condensés : sont des polymères flavanolique constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine (Boudjouref, 2011).

Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (Boudjouref, 2011).

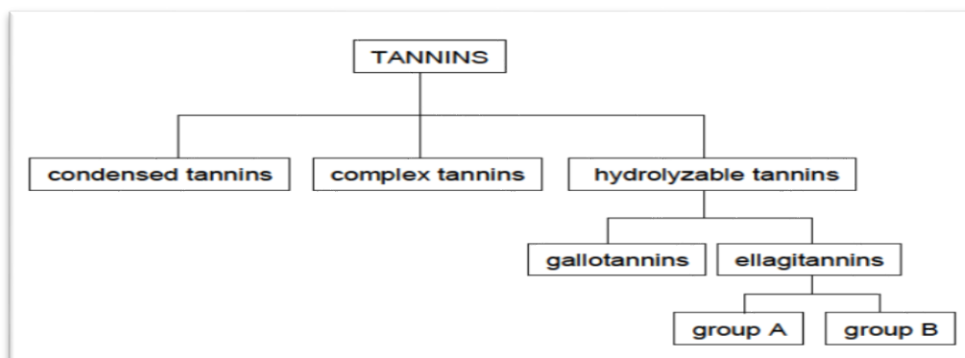


Fig.05 : Classification des tanins (Vermerris & Nicholson, 2006) .

I.5. Utilisation des plantes médicinales

I.5.1 Utilisation en médecines

Il existe plusieurs médicaments à base des plantes médicinales utilisés pour le traitement de pas mal de maladies telle que :

- Maladies cardiovasculaires, ex : Flavoce est un médicament constitué par la flavone non substitué en combinaison avec la rutine et isoquercetine est utile dans le traitement de l'athérosclérose (**Mehani, 2015**).
- les maladies du stress, des activités antioxydantes; tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composé phénoliques, parmi lesquels theaflavine, le resveratrol, le gallate et epigallocatechine procyanidine, très étudié en raison de leur rôle en tant qu'agent chemopreventifs basés sur leurs capacités antioxydantes (**Mehani, 2015**).
- Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire: Les produits naturels des plantes depuis des périodes très anciennes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ex: laquinine obtenue à partir du quinquina "Cinchona" a été avec succès employée pour traiter le malaria l'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*) est renommé pour ses propriétés: antibactériennes, anti-infectieux, antifongiques, antivirales, aussi comme antiviral (*Azadirachta indica, Aloe vera, Andrographis paniculata, Withania somnifera, Astragalus membranaceus, Curcuma longa...etc.*) (**Mehani, 2015**).

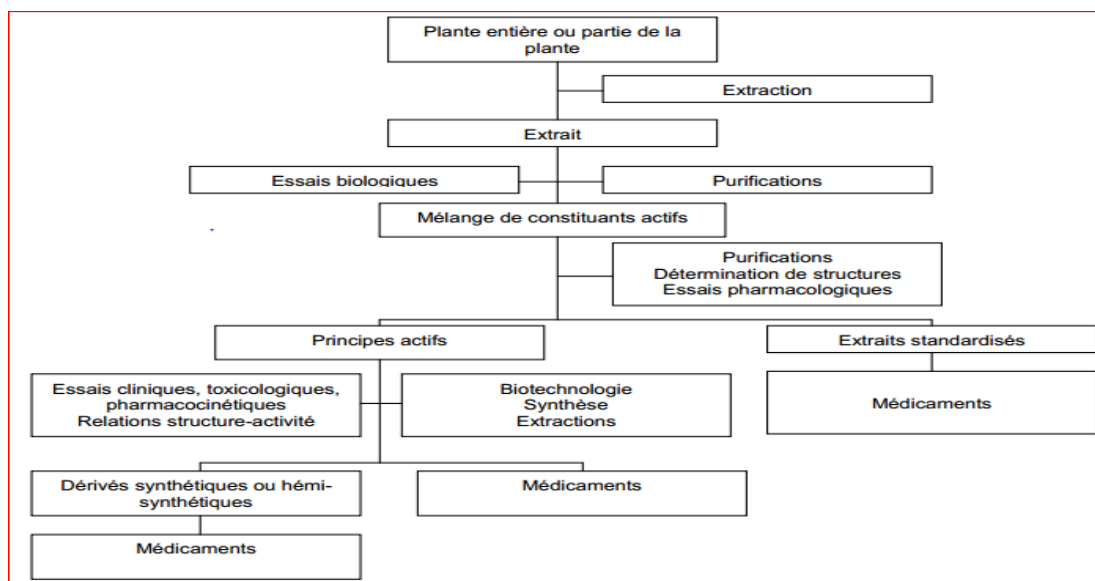


Fig.06 : De la plante au médicament (Beddou, 2015).

I.5.2 En Agriculture

Exemple : l'arbre *Azadirachta indica*, qui se développe dans tout le subcontinent indien, est une des plantes médicinales les plus importantes au Bangladesh, de 12 à 18 mètres de hauteur avec un périmètre atteignant jusqu'à 1,8 à 2,4 mètres (Mehani, 2015). Les huiles de cet arbre ont des utilisations dans l'agriculture dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites) (Mehani, 2015).

I.5.3 En alimentation assaisonnements

Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation sont pour une bonne part responsable des plaisirs de la table, considérée comme condiments et aromates (Mehani, 2015). La popularité des épices et herbes aromatiques a été et reste très liée à leurs propriétés organoleptiques (Mehani, 2015).

La notion de flaveur des épices et aromates recouvre l'ensemble des perceptions olfacto-gustatives. Ces perceptions résultent de stimuli générés par une multitude de composés organiques dont certains sont volatils et constituent ce qu'on appelle en général l'huile essentielle, les autres non volatils, sont plus particulièrement responsables de la saveur et de la couleur (Mehani, 2015).

I.5.4. En cosmétique : Produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène. Des suppléments diététiques (Mehani, 2015)

Chapitre II : L'Ail**II.1 Origine de l'Ail**

L'ail, *Allium sativum* L est un membre de la famille Alliaceae, a été largement reconnu comme épice précieuse et un remède populaire pour diverses affections et troubles physiologiques (Singh & Singh, 2008). Il est connu sous les noms : d'ail commun ou de thériaque du pauvre, il provient à l'origine d'Asie centrale. Il y a environ 10 000 ans, il s'est répandu progressivement en Extrême-Orient, en Arabie, en Égypte et dans le Bassin méditerranéen, transporté par les marchands au gré des routes commerciales. Ce bulbe est l'un des légumes les plus anciennement cultivés par l'homme qui l'utilisait autant pour son alimentation que pour sa santé (Berthet 2014). La famille botanique des Alliacées appartenant à la classe des monocotylédones. Parmi ses plus illustres représentants, elle compte l'ail et l'oignon ainsi que l'échalote, le poireau, la ciboulette et la ciboule (Birlouez 2016). L'ail cultivé se divise en deux sous-espèces connues sous le nom d'ail à tige dure (ophioscorodon) et ail à tige molle (*sativum*) (Bézanger-Beauquesne, Pinkas, Torck, & Trotin 1996).

II.2 Classification traditionnelle

Les cultivars sont distinguables selon des critères morpho-physiologiques en fonction de leur période de végétation et de la couleur de la tunique du bulbe et des bulbilles (Gallouin & Arvy 2015).

- **L'ail d'automne** est planté de septembre à novembre, c'est un ail blanc ou violet qui est souvent plus précoce mais supporte moins bien le froid (Gallouin & Arvy 2015).
- **L'ail de printemps** est planté entre décembre et janvier .C'est de l'ail rose qui se récolte presque toujours en sec en juillet (Gallouin & Arvy 2015). Il se conserve jusqu'en mars-avril de l'année suivante (Gallouin & Arvy 2015).
- **L'ail à bâtons** est dit alternatif car il peut être planté de novembre à février. Il produit couramment des hampes florales. Ce sont des ails roses récoltés généralement en sec de la mi-juin à la mi-juillet (Gallouin & Arvy 2015).

II.3 *Allium sativum***II.3.1 Taxonomie**

Nom commun : Ail

Nom en anglais : Garlic (Benzeggouta 2005).

Tableau II : Situation botanique de l'espèce *Allium sativum* L (Benzeggouta 2005).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>
Sous-classe	<i>Liliidae</i>
Ordre	<i>Liliales (Asparagales)</i>
Famille	<i>Aliaceae (ex Liliaceae)</i>
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>Allium sativum</i> L.

II.3.2 Description

C'est une plante d'origine d'Asie centrale. Elle est herbacée vivace, de 30 à 60 cm de haut, elle se caractérise par une forte odeur lorsqu'elle est écrasée. La partie souterraine se compose d'une ampoule composée avec de nombreuses fibres; dont la partie aérienne, les feuilles, sont linéaire, plates, solides, de 1,0 à 2,5 cm de largeur, de 30 à 60 cm de long, et ont un sommet aigu (Vilmorin 1855).

Les inflorescences sont des ombelles. De petites bulbilles sont produites dans les inflorescences (Arouna et al., 1999). Les fleurs sont variables en nombre et parfois absentes. Rarement ouvertes, elles peuvent se défraîchir dans le bourgeon. Les fleurs sont installées au bout de pédicelles minces et se composent d'un périanthe de 6 pièces d'environ 4-6 mm de long, rosâtre ou blanc, en cloche ; de 6 étamines ; et d'un ovaire supère triloculaire. Le fruit est une petite capsule à déhiscence loculicide (Arouna et al., 1999). Les graines, qui sont noires et arrondies, sont rarement employées pour la reproduction, parce qu'on leur préfère les cayeux (Vilmorin 1855).

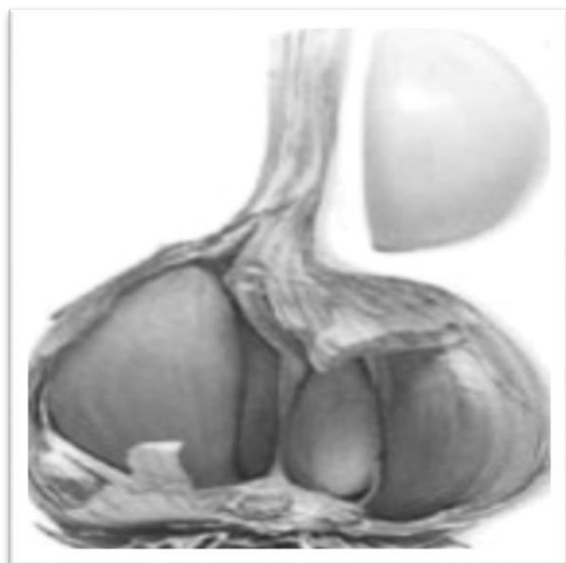


Fig. 07: l'ail avec la spathe membraneuse spécifique (Benzeggouta 2005).

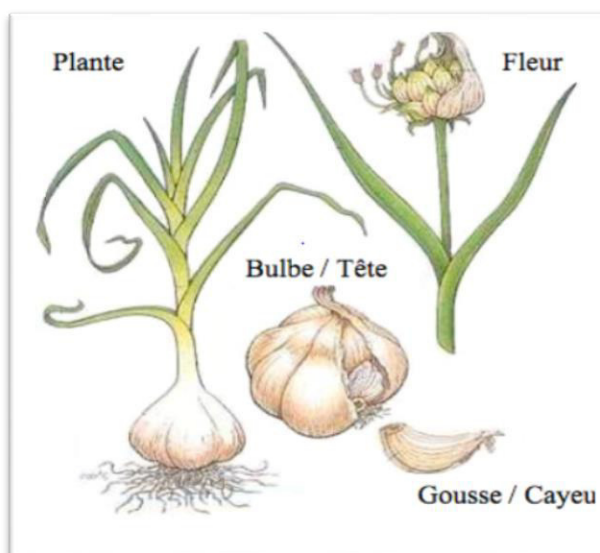


Fig.08: plante *Allium sativum* (Dethier, 2010)

II.4 Culture et conditionnement

Le rendement d'ail varie en fonction du climat, de l'altitude, du type de sol et du pH, des techniques culturales, et de la variété (Si Bennasseur 2005). L'ail, comme l'oignon, a des besoins en fertilisants et en lumière élevés. Un pH compris entre 6,8 et 7,5 est idéal (Si Bennasseur 2005). L'ail pousse bien sur n'importe quel sol, cependant il préfère un sol léger, bien drainé, friable, et de préférence riche en matière organique qui joue un rôle primordial dans la rétention de l'eau. Il est préférable de commencer la préparation du sol, l'année précédente (Si Bennasseur 2005).

Concernant l'installation de la culture, les semences d'ail doivent être stockées sous forme de bulbe entier, si non les girofles se détériorent rapidement (Si Bennasseur 2005). Le bulbe doit être fissuré juste avant la plantation. Dans le cas où le producteur compte utiliser des bulbes produits sur sa propre exploitation, il est recommandé qu'il leur laisse plus de temps pour mûrir que ceux qui sont destinés à la vente dans la mesure où cette pratique facilite la fissuration des bulbes au moment du semis (Si Bennasseur 2005).

II.5 Composition chimique

Les constituants chimiques les plus importants signalés dans les bulbes d'ail sont les composés soufrés (JUNGMIN, JAMES, & HARNL, 2005). Les sulfoxydes de cystéine et notamment l'alliine représentent plus de 82% de la teneur totale en soufre de l'ail (Berthet

2014). Les thiosulfonates (l'allicine par exemple), les ajoènes, les vinylthiols, et les sulfures (le disulfure de diallyle ou le trisulfure de diallyle par exemple) qui sont des produits de dégradation de l'alliine (**Guiet, 2011**). Lorsque le bulbe d'ail est lésé (écrasé, haché, etc.) l'alliine est libéré de son compartiment et interagit avec l'alliinase (enzyme) présente dans les vacuoles adjacentes pour former l'allicine (diallyl thiosulfonate) (**Guiet, 2011**). La transformation de l'alliine, précurseur aromatique principal, en diverses molécules odorantes aux propriétés démontrées, est la clé de la génération de la plupart des molécules actives de l'ail (**Majewski 2014**). L'alliine est une substance qui est un antibiotique plus fort que la pénicilline ou la tétracycline (**Majewski 2014**). En plus de ces composants soufrés trouvés dans l'huile essentielle, on trouve :

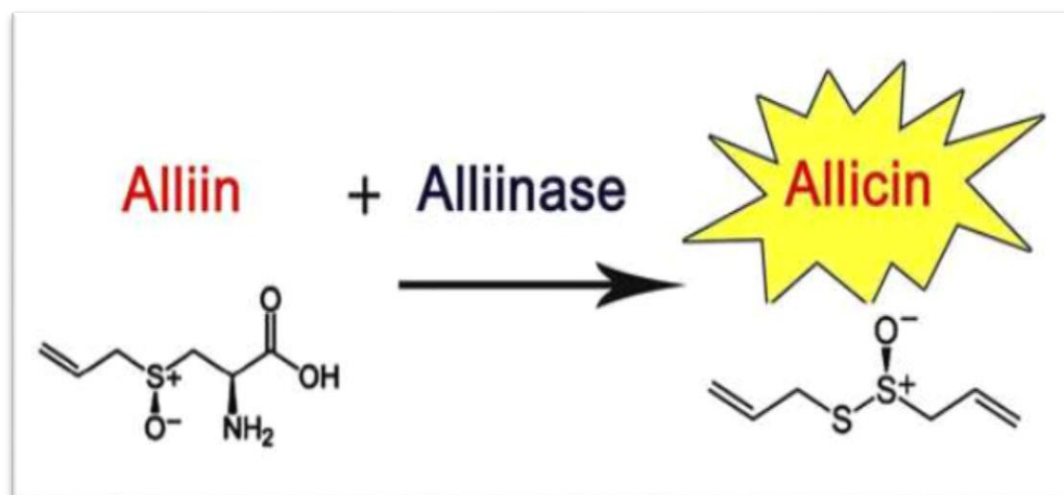


Fig 09 : transformation d'alliin en allicin (**Raco, 2016**).

II.5.1 Les protéines

Les protéines représentent 6% de la composition totale d'*Allium sativum*. Ils ont la particularité d'être riches en acides aminés soufrés (cystéine, méthionine). Il a été montré que ces protéines présentes diverses activités biologiques, les principales protéines sont les agglutinines ASA I (ASA₂₅) et ASA II (ASA₁₁₀) (**Trudel, 2005**). l'ASA I est une protéine dimère comprenant des sous-unités de lectines de 12,5 et 13,0 kDa et ASA II est une glycoprotéine de deux sous-unités identiques, elle se caractérise par une teneur élevée en acide aspartique, leucine et sérine mais une faible teneur en méthionine et en cystéine (**Kundra, 2015**). Les deux lectines présentent une grande spécificité pour le mannose et possèdent une propriété d'hémagglutination vers les lymphocytes, les thymocytes et le sang

périphérique humain. En dehors de ces protéines l'agglutinine, l'alliinase (110 kDa) (Clement, Pramod, & Venkatesh, 2010), la protéine antimicrobienne alliumine (13 kDa), la protéine antifongique allivine (13 kDa), provenant de l'ail ont également été découvertes. Deux protéines majeures de 40 kDa et 14 kDa ont également été séparées dont la protéine de 14 kDa était localisée dans les cellules corticales (CC) et la protéine de 40kDa était présente dans les cellules de la gaine parenchymateuse (PSC) des bulbes d'ail, qui était révélé par étude immuno-cytochimique et ultra-structural (Dorhoi , Dobrean , Zăhan , & Virag 2006).

L'ail possède également des enzymes comme l'hexokinase, l'alliinase, la γ L glutamylpeptidase, la γ -L glutamyltranspeptidase, la lipase, la peroxydase et la polyphenoloxydase (Ghesquiere 2016).

II.5.2 Les glucides : monosaccharides (fructose, glucose), des disaccharides (saccharose, lactose), des trisaccharides (raffinose), des tétrasaccharides (tétrafructose, scorodose), des polysaccharides (l'amidon, dextrine, inuline, fructosane), et autres comme le D-galactane, Larabinose, pectines, D-fructane (Ghesquiere 2016).

II.5.3 Les lipides :

Les acides gras (acide linoléique, acide linoléique, acide oléique, acide palmitique), des triglycérides, des phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine), des prostaglandines (prostaglandine A, prostaglandine E, prostaglandine F) (Ghesquiere 2016) .

II.5.4 La composition en acides aminés libres : des acides aminés essentiels (la lysine, la thréonine, la valine, la méthionine, l'isoleucine, le tryptophane, la phénylalanine, la leucine, l'histidine), ainsi que des autres acides aminés comme l'arginine, l'acide aspartique, la sérine, la glutamine, la proline, la glycine, l'alanine et la cystéine (Ghesquiere 2016).

II.5.5. Les minéraux et oligo-éléments :

Le phosphate, le potassium, le magnésium, le cuivre, le fer, le manganèse, le zinc et le sélénium. L'ail possède une grande quantité de sélénium contrairement aux autres légumes : Diméthylsélénide, acide méthylester méthane sulfénosélénoïque, diméthylsélénide, bis (méthylthio)sélénide, allylméthylsélénide, acide méthylester-2-propènesulfénosélénoïque, acide propylester-1- propènesulfénosélénoïque, allylthiométhylthiosélénide (Ghesquiere 2016).

Les vitamines : les vitamines A, B1, B2, B6, C et E (JUNGMIN et al., 2005).

Tableau III: composition de *allium sativum* (par rapport a 100 g de *allium sativum* brut)
(cardelle-coba, soria, & villamiel, 2010)

Propriétés	Valeur	Minéraux	Valeur	Vitamines	Valeur
Energie	119 Kcal	Potassium	446 mg	Thiamine (vit .B1)	0,16 mg
Humidité	70 %	Phosphore	134 mg	Riboflavine (vit. B2)	0,02 mg
Protéines	4,3 g	Magnésium	24,1 mg	Niacine (vit. B3)	1,02 mg
Carbohydrates	223 g	Sodium	19 mg	Piiridoxine (vit. B6)	0,32 mg
Fibres	1,2 g	Calcium	17,08 mg	Acide folique	4,8 µg
Graisses	0,23 g	Fer	1,2 mg	Acide ascorbique (vit. C)	14 mg
Alcool	0 g	Zinc	1,1 mg	β-carotène	5 µG
pH	6,05	Iode	4,7 µg	Vitamine A	Traces
Acidité	0,172 %	Sélénium	2 µg	Vitamine E	0,011µg

II .6 Propriétés pharmacologiques et utilisations

L'ail (*allium sativum*) peut être parmi les premières plantes cultivées dans le monde en raison de leur long temps de stockage et portabilité. Elle pourrait être séchées et conservées pour plusieurs mois (Benkeblia, 2004). En plus de sa valeur nutritionnels, elle est traditionnellement utilisée comme remède populaire pour divers troubles physiologiques tels que les hémorroïdes, la toux, douleur de l'abdomen, perte d'appétit, arthrite, pneumonie et le rhumatisme (Kamanna & Chandrasekhara 1982), mais possède aussi des activités contre beaucoup de microorganismes qui ont été mentionnés dans les rapports cliniques depuis près de 100 ans (Cellini et al., 1996) dont l'inhibition touche la variété de Gram-négatif et Gram-

positif étaient et Continuent à être largement étudiées (**Benkeblia, 2004**). En plus, les extraits aqueux des bulbes de l'ail, d'*Allium cepa* et de *Zingiber officinale* réduisent la glycémie chez le rat wistar rendu diabétique par l'alloxane, en comparant les trois espèces, *allium sativum* présente la meilleure activité (**Eyo , Ozougwu , & Echi 2011**). Une autre étude expérimentale ressentie a été réalisée pour évaluer l'efficacité de l'ail sur les facteurs de risque de la maladie cœur coronaire, pour cette raison, un extrait alcoolique d'*Allium sativum* a été administré par voie orale à un groupe de lapins albinos pour deux semaines. Les résultats de cette étude ont montré que l'ail possède un agent anti-coagulant à court terme significatif et actions thrombolytiques (**Singh & Chaturvedi, 2015**).

II.7 Toxicité de l'ail

En dehors des propriétés médicinales précieuses, l'ail peut également agir de manière toxique en cas de surdose (**JUNG, 2005**). L'ingestion répétée ou excessive d'ail produit des effets toxiques. Le problème le plus apparent de l'utilisation de l'ail en médecine humaine est sa forte odeur. Un problème d'importance clinique est que certaines personnes sont allergiques aux composés à base de soufre. Là plusieurs réactions allergiques à l'ail ont été rapportées; à savoir, la dermatite de contact, l'asthme, la rhinite, conjonctivite, urticaire, anaphylaxie et œdème de Quincke. Consommation de l'ail augmente les effets pharmacologiques des anticoagulants (warfarine, fluindione) et réduit l'efficacité du médicament anti-SIDA Saquinavir (**JUNG, 2005**).

PARTIE
EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

1. Matériels et méthodes

L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité antibactérienne sur : *Staphylococcus aureus* (FRI 137), et *Entérocooccus faecalis* (ATCC 49452), ainsi que activité anti-hémolytique de l'extrait protéique optimisé des bulbes de l'Ail (*Allium sativum*).

1.1 Matériels

1.1.1 Matrice végétale

La matière végétale utilisée dans notre étude est: l'*Allium sativum* qui est une plante médicinale (légume), récoltée dans un jardin à Takerboust commune d'Aghebalou (wilaya de Bouira) (figure 10 et 11) durant le mois de juillet 2017, lorsque ses feuilles sont totalement fanées, les bulbes semblent bien formées et en pleine maturité avec une couleur blanche rosée, odeur et un gout fort. Le stockage est effectué dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires. Les parties qui font l'objet de cette recherche sont les gousses de l'ail.



Fig 10 : localisation de la commune d'Aghebalou sur la carte d'Algérie



Fig 11: Localisation de la commune d'Aghebalou dans la wilaya de Bouira

1.1.2 Souches bactériennes

Les souches choisies pour cette étude sont des souches bactériennes de référence fournies par le Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies de Tizi-Ouzou. : *Staphylococcus aureus* (FRI 137) qui est une cocci Gram⁺ (AOUATI 2009 ; VIEU 2014) et *Entérocooccus faecalis* (ATCC 49452) qui est un bacille Gram⁺ (Cathro, McCarthy,

Hoffmann, & Zilm, 2016; Laurent herber 2008) dont leurs génotypes et phénotypes ont été bien étudiés. Elles ont été conservées à ($- 20\text{ C}^\circ$) en présence d'un cryoprotecteur (glycérol 30%) à fin de les protéger et les conserver avec un métabolisme assez ralenti ce qui ne permet pas leurs croissance mais seulement leurs viabilité.

1.1.3. Appareillage

- Cuve verticale d'électrophorèse, plaques en verre, peigne, générateur de courant électrique :Electrophoresis Power Supply –EV245.
- Spectrophotomètre UV-Visible : Optizen -322OUV
- Congélateur domestique : Condor-BH4JE.
- Balance électronique de précision 0,001g : OHAVS
- Bain ultrasonore en mode indirect : J.P.SELECTA, s.a –Autovia A2.
- Etuve réglable : Venticell.
- Centrifugeuse EZ Swing -3K.
- Agitateur magnétique : Hot plate stirrer.
- Bain marie : niive bath –NB20.
- PH-mètre :METTLER TOLEDO -Five Easy F20
- Autoclave :Wisoclave-WAC80
- Bec bunsen.

1.2. Méthodes

1.2.1. Etudes préliminaires

Des essais préliminaires ont été effectués, selon le modèle classique d'extraction en variant un paramètre et fixant les autres (plan d'expérience One factor at Time). Ces essais préliminaires sont effectués sur les broyats l'Ail (*Allium sativum*).

Afin de pouvoir choisir le meilleur état et méthode pour extraire les composés protéiques des bulbes de l'ail avec l'utilisation d'un même solvant d'extraction, une série d'extractions a été réalisée avec deux méthodes et à deux états différents.

A. Etude de l'effet de la conservation sur le taux de protéines.

La comparaison est réalisée entre un échantillon de l'ail (25 g) finement haché puis transférés dans un mortier et intimement mêlés à l'aide du pilon. La pate obtenue été conservé pendant 5 jours au réfrigérateur à une température de 4 C° . Un autre échantillon d'ail frais de la même variété (25 g) a subis le même traitement mécanique.

L'obtention de l'extrait protéique brut des deux échantillons a été réalisé selon le protocole de (Clement, Pramod, & Venkatesh, 2010; Kimbaris et al., 2006) modifié dont chaque un des échantillons a été solubilisé dans 50 ml de tampon tris-HCl (0,1 M) à PH = 7,4 (Annexe 2) puis laissé macérer pendant 2 h à 4 C°. Les solutions obtenues après macération ont été soumises à une deuxième extraction par sonication en mode indirecte dont la fréquence été fixe à 40 kHz et une température de 25 C° pendant 30 min selon (Clement et al., 2010). Les extraits obtenus sont séparément filtrés à travers du papier Whatman N°1.

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (BRADFORD, 1976) qui est basée sur le changement d'absorbance qui se manifeste par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (compléxation) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines.

Dans une fraction aliquote de 100µl on ajoute 6 ml de réactif de Bleu Brillant de Coomassie (G 250) préparé au niveau du laboratoire (Annexe 3). L'absorbance été ensuite mesurée par spectrophotomètre UV à 595 nm et la concentration protéique des échantillons été estimée à partir de la courbe d'étalonnage réalisée en utilisant de la BSA (Annexe 4).

B. Effet de la sonication sur le taux de protéines.

Deux extractions ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales (poids de l'Ail frais, tampon, température et durée de macération) dont la différence été dans l'utilisation de sonication seulement pour le de deuxième extrait.

L'extraction a été effectué en fusant broyer (25 g) de l'ail pour chaque extrait puis une étape de macération a été effectuée dans 50 ml de tampon tris-HCl (0,1 M, pH= 7,4) pendant 2 h à 4 °C. Le deuxième extrait a été supplémenté par sonication pendant 30 min à 25 C° et une fréquence de 40 KHz. Une étape de filtration a été réalisé a travers papier Whatman N°1, les filtrats ont été en suite récupère et le taux de protéine a été déterminé par la méthode de Bradford.

1.2.2. Optimisation des conditions d'extraction des protéines totales par la méthode des surfaces de réponse RSM

Le plan d'expérience consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs, qui sont les variables, discrètes ou continues, à chaque essai. Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le

nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse. L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise : « Obtenir un maximum d'information avec un minimum d'expériences ».

Plusieurs plans d'expériences sont fournis par Design Expert®, dont les plans factoriels et les surfaces de réponses sont utiles pour des études avec facteurs indépendants. Les plans de mélange sont très utilisés pour l'étude de formulations alors que les plans combinés sont des plans combinant des facteurs procédé et fractions de composants de mélange (**DESIRE, 2011**).

Dans notre travail, l'optimisation est effectuée selon une matrice obtenue par l'utilisation de Box-Behnken qui permet l'étude d'une réponse selon un modèle quadratique en fonction de facteurs continus. Ils ne nécessitent que 3 niveaux et peuvent être partagés en blocs. Ils ne permettent cependant pas la réalisation d'expériences dans les coins du domaine cubique. Le logiciel Design Expert® permet d'inclure des facteurs discrets mais en réalité le plan de Box-Behnken relatif aux facteurs continus est alors réalisé pour chaque combinaison possible des facteurs discrets (**DESIRE, 2011**).

Tous les facteurs étudiés via Box-Behnken ont trois niveaux : inférieur (-1), central (0) et supérieur (+1) qui sont illustrés dans la figure 12. Il est facile à mettre en œuvre et il possède la propriété de séquentialité. On peut entreprendre l'étude des k premiers facteurs en se réservant la possibilité d'en ajouter de nouveaux sans perdre les résultats des essais déjà effectués (**AKOUCHE & CHERFA 2013**).

Pour relier les facteurs à la réponse, une équation polynomiale du second degré est présentée ci-après :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots + e$$

Dont :

Y : c'est la réponse ou grandeur d'intérêt ;

x_i : représente un niveau du facteur i ;

x_j : représente un niveau de facteur j.

a₀, a_j, a_{ij}, a_{ii} : sont les coefficients du polynôme (**Goupy & Creighton, 2005**).

e : L'erreur

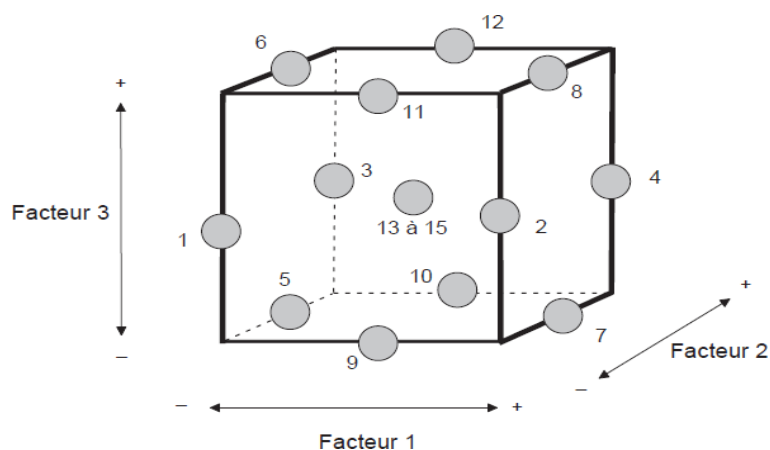


Fig 12: Illustration du plan de box-Behnken pour trois facteurs (Goupy & Creighton, 2005)

Les paramètres physico-chimiques adoptés et utilisés pour l'obtention de la matrice d'optimisation (tableau IV) de l'extraction des protéines totales de l'*Allium sativum* sont : le pH, la température d'incubation et le temps de macération.

Tableau IV: Matrice du domaine d'étude

Std	Run	Factor 1	Factor 2	Factor 3
		A: maceration time H	B: temperature °C	C: pH
3	1	1	25	6.75
15	2	2	14.5	6.75
2	3	3	4	6.75
9	4	2	4	5.5
1	5	1	4	8
10	6	2	25	5.5
11	7	2	4	8
7	8	1	14.5	8
17	9	2	14.5	6.75
12	10	2	25	8
13	11	2	14.5	6.75
4	12	3	25	6.75
14	13	2	14.5	6.75
6	14	3	14.5	5.5
5	15	1	14.5	5.5
16	16	2	14.5	6.75
8	17	3	14.5	8

L'optimisation a été effectuée par l'ensemble d'analyse comportait sur 17 points expérimentaux réalisées (tableau VI) dont cinq répétitions au centre de la conception ont été utilisés pour permettre l'estimation d'une erreur type et la reproductibilité de la manipulation.

L'estimation de la concentration protéique totale est réalisée pour chaque extrait selon la méthode de Bradford (**BRADFORD, 1976**) .

1.2.3. Extraction des protéines totales dans les conditions optimales

L'obtention de l'extrait protéique en conditions optimales a été effectuée selon le schéma de la figure suivante :

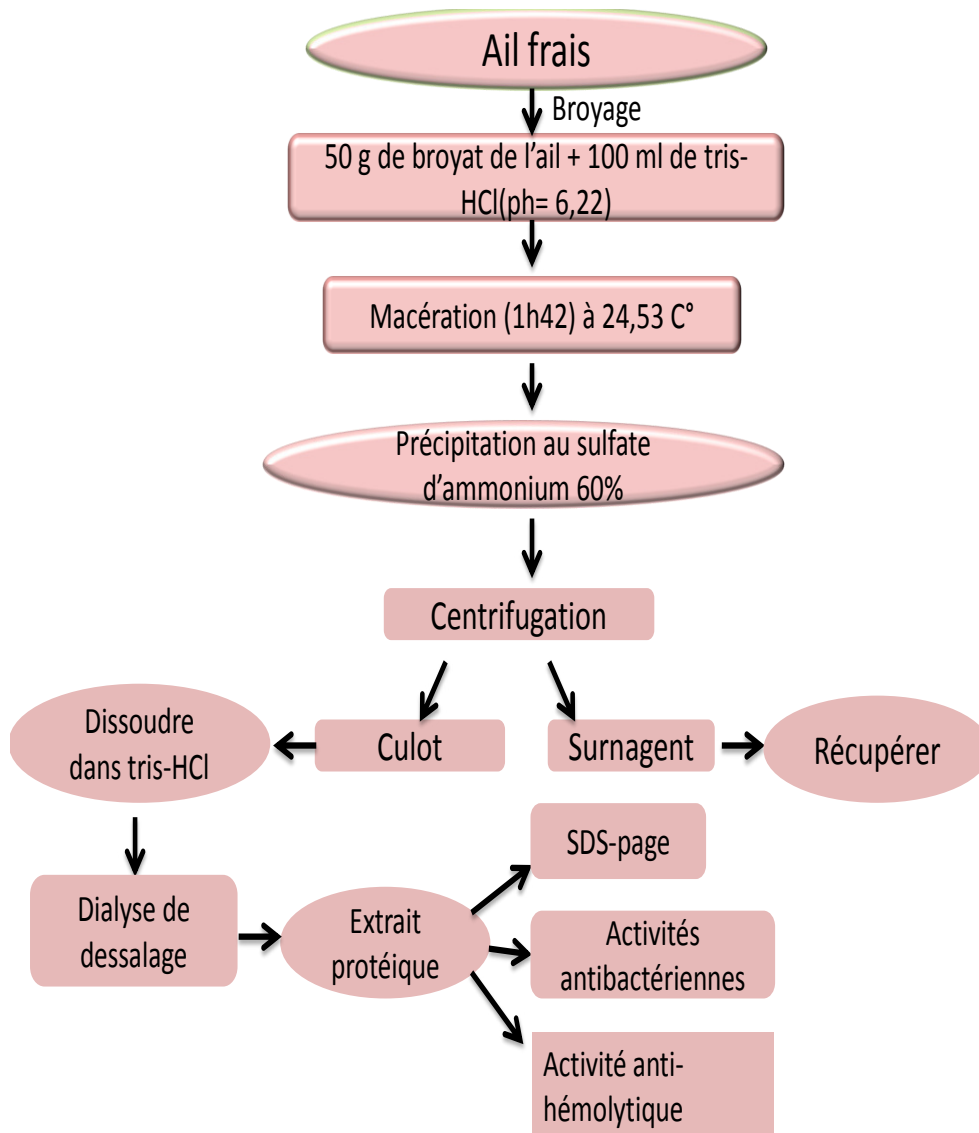


Fig 13 : schéma résumant le protocole d'extraction de la fraction protéique de l'Ail.

Le broyat de l'ail frais (50 g) a été macéré dans 100 ml de tampon tris-HCl de 0,1 M pendant 1h42 à une température de 24 ,53 et un pH de 6,22 puis une étape de filtration a été réalisée par papier Whatman dans le but de l'élimination des débris cellulaires.

1.2.4. Précipitation des protéines par sulfate d'ammonium

- Principe

Les sels sont des agents précipitant qui exercent leur effet par déshydratation et permettent aux protéines de conserver leur conformation native (**BOUMENDJEL, MESSARAH, BENYAHIA, LADJAMA ALI, & BOUZERNA, 2010**). Le sulfate d'ammonium est le plus utilisé vu sa stabilité et sa solubilité élevé.

- Technique de précipitation par sulfate d'ammonium

Le filtrat obtenu après l'extraction a été soumis à une précipitation par sulfate d'ammonium (60 %) qui a été réalisée en ajoutant progressivement du sulfate d'ammonium à l'extrait brut placé dans un bécher, sous agitation constante d'une manière à avoir la dissolution totale de ce dernier .Le pH de la solution obtenu a été neutralisé (pH = 7)

La quantité de sulfate d'ammonium à utiliser a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$R = 533 * (S_2 - S_1) / 100 - (0,3 * S_2)$$

Avec :

R : taux de sulfate d'ammonium équivalent en g/l.

533 : facteur de solubilisation du sulfate d'ammonium à 20°C.

S2 : concentration finale en sel.

S1 : concentration initiale en sel.

Une fois le sulfate d'ammonium est totalement solubilisé et le pH du mélange ajusté à 7, une étape de centrifugation est réalisée pendant 20 min et à une vitesse de 3000 tr/min ce qui a permis l'obtention de deux phase : Le surnageant et le culot qui contient les protéines précipités.

1.2.5. Dessalage par dialyse

- Principe de la dialyse

Il se base sur l'utilisation de membranes semi-perméables qui autorisent la diffusion des petites molécules (ions minéraux, oses, diholosides, aminoacides ...) et pas celle des

macromolécules comme les protéines permet de réaliser simplement des dessalages de solutions protéiques (Donald , Judith , & Lionel, 2016).

- **Technique de dialyse de dessalage**

Les protéines précipitées mises en suspension dans un volume réduit du tampon Tris-HCl (0,1 M) tris-HCl, pH =6 ,22) ont été dialysées contre 2 litres du même tampon, en utilisant une membrane semi-perméable (limite d'exclusion : 18 kDa sous une faible agitation à 4°C pendant une nuit (figure14).

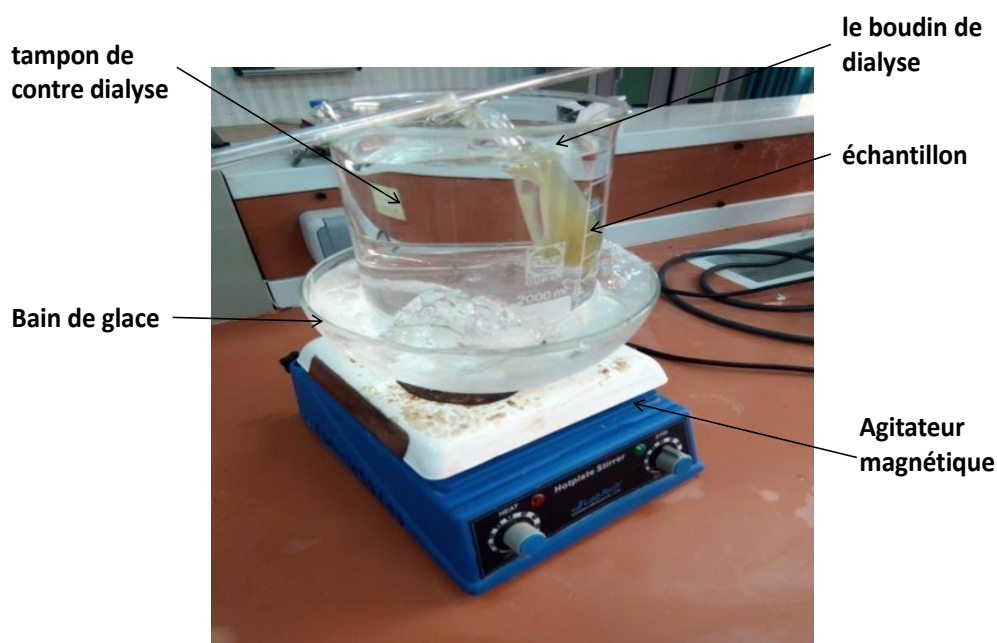


Fig14 : Dialyse de dessalage de la solution protéique (photo originale)

1.2.6. Séparation des protéines par Electrophorèse PAGE-SDS

- **Principe de l'électrophorèse**

L'électrophorèse est une technique qui permet la séparation et éventuellement l'identification des constituants d'un mélange de protéines et leurs poids moléculaires en utilisant la différence entre leurs vitesses de migration sous l'influence d'un champ électrique. La cartographie des masses moléculaires des protéines peut donc être établie en utilisant une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulphate de sodium (SDS-PAGE) (Darine 2010).

Le SDS (détergent anionique) a deux fonctions : d'une part, dissocier les protéines agrégées et, d'autre part, leur conférer une charge globale négative, permettant la séparation des protéines essentiellement en fonction de leur poids moléculaire (**Darine 2010**).

- **Technique d'électrophorèse**

Le Protocole d'électrophorèse a été réalisé selon (**laemmli, 1970**).

a. Traitements et migration des échantillons

Avant de lancer la migration de l'échantillon sur le gel de Polyacrylamide (figure 15), il a été nécessaire de dénaturer les protéines on faisant mélanger un volume de l'extrait avec un même volume du tampon d'échantillon (Annexe 5) suivie d'un chauffage à 95 C° pendant 5 min.

Le marqueur de taille utilisé (Prestained Molecular Weight Marker / SIGMA Aldreich)- (MW. 26600 – 180000), est composé des protéines standards : α -2-Macroglobulin from equine serum **180000**, β -Galactosidase from E.Coli **116000**, Lactoferrin from human milk **90000**, Pyruvate kinase from rabbit muscle **58000**, fumarase from porcine heart **48500**, Lactic Deshydrogenase from rabbit muscle **36500**, triosephosphate isomerase from rabbit muscle **26600**.

La plaque contenant l'ensemble gel et échantillons été ensuite plongées dans le tampon d'électrophorèse 5X+SDS, puis la migration est lancée sous les paramètres 80V, 40mA et 10W.

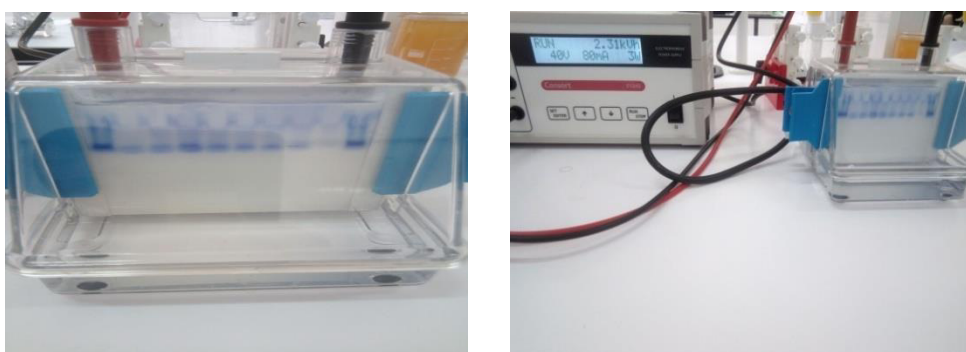


Fig 15 : migration des protéines sous l'effet du champ électrique (photo originale).

b. Traitement du gel après migration

Après migration, et en premier lieu, le gel de concentration a été découpé puis le reste (gel de séparation) a été décollé délicatement des plaques en verre.

Le gel de séparation a été plongé dans une solution de fixation (Annexe 5) pendant 30 min. Ensuite, il a subi une coloration par une solution de coloration (Annexe 5) pendant 30 min sous légère agitation. Enfin, un bain de décoloration a été effectué sous légère agitation manuelle jusqu'à l'obtention d'un gel transparent.

1.2.7. Tests de l'activité antibactérienne**a) Revivification des souches**

Les souches bactériennes utilisées: *Staphylococcus aureus* (FRI 137) et *Entérocooccus faecalis* (ATCC 49452) ont été conservées à -20°C pendant un an en présence de glycérol.

Afin de les revivifier, le protocole ci-dessous a été suivi. Les bactéries ont été décongelées rapidement puis elles sont inoculés dans des tubes contenant 5 ml de bouillon nutritif , homogénéisé bien puis elles sont incubées à 37 C° pendant 24 h (Achour **CHERGUI, 2014**).

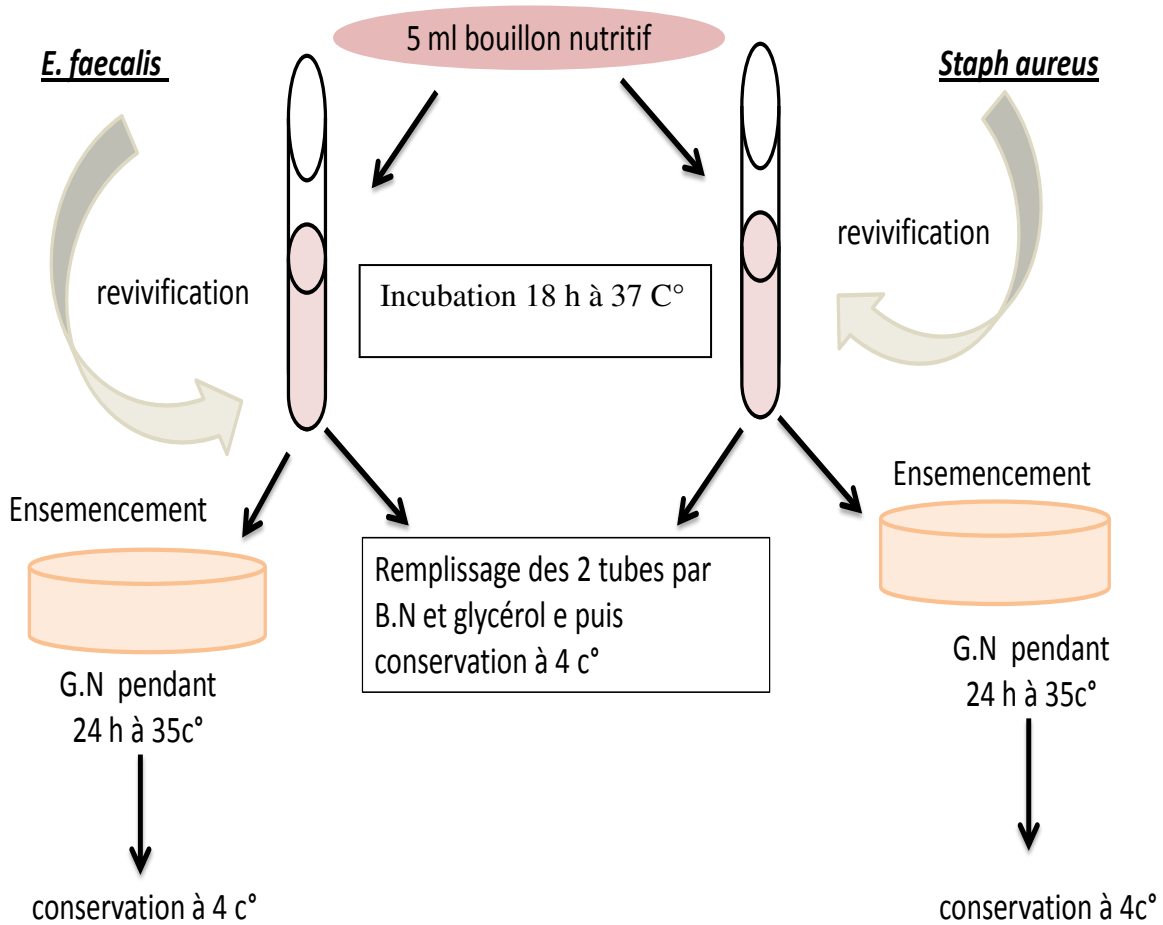


Fig 16 : schéma résumant le protocole de revivification des souches bactériennes.

b) Standardisation de l'inoculum des souches cible

La préparation de l'inoculum des souches a été réalisée selon **SELLEM, BRAHMI, MNASSER, RAFRAFI, and BOUHAOUALA-ZAHAR (2017)**. Les suspensions bactériennes sont dilués par un bouillon nutritif de sorte à avoir des $DO = 0,08$ (à 625nm) ce qui correspond à 10^7 UFC/ml.

Ensuite, 20 ml d'une gélose nutritive semi-solide ont été inoculés avec 20 μ l des suspensions provenant d'une culture jeune de *Staphylococcus aureus* (FRI 137) et *Entérocooccus faecalis* (ATCC 49452) respectivement. Les puits (enivrent 6 mm de diamètre) ont été réalisés avec le bout circulaire ouvert d'une pipette pasteur stérile.

c) Test de sensibilité aux protéases

On a utilisé deux enzymes protéolytiques à concentration finale d'enzyme de 1mg/ml respectivement de Trypsine et de Pepsine (Annexe 6). Cette étape nous donnera une idée sur les séquences en acides aminés des peptides bioactifs, car les deux enzymes protéolytiques utilisées ont des sites de coupures différents. La trypsine coupe à la droite des acides aminés basiques et la pepsine, à gauche des acides aminés neutres (Benkerroum, Oubel, Zahar, Dlia, & Filali-Maltouf, 2000; Achour Chergui et al., 2016).

Les préparations enzymatiques ont été obtenues par le mélange de 1ml de l'extrait protéique neutralisé à pH 7 avec 1 ml de la solution enzymatique (Rapport volumique 1:1) dont la concentration de l'enzyme été de 1mg/ml.

d) Test d'activité par la méthode de diffusion des puits

Les puits creusés dans la gélose coule dans les boites pétris (04 puits par boîte) sont charger respectivement par 70 μ L de : un témoin négatif 'T' (eau distillé stérile), extrait poétique 'E', préparation enzymatique de trypsine 'Try' et préparation enzymatique de pepsine 'Ps'. deux essai pour chaque souche sont réalisés (deux boites pour chaque souche).

Les boites sont laissées sur la paillasse pendant 1h à fin de laisser les préparations se diffuser dans la gélose, l'incubation en suite est réalisée dans une étuve à 37 C° pendant 24h.

L action inhibitrice se manifeste par la formation d une auréole autour des puits. La lecture du résultat s'effectue par mesure des diamètres des zones d inhibitions. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d inhibition est supérieur à 6 mm (Achour CHERGUI, 2014).

e) Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé (Do = 0,08 à 0,10), une gamme de concentration décroissante en extrait protéique. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en extrait protéique capable d'inhiber la croissance bactérienne (Jehl, Chabaud, & Grillon, 2015).

Les CMI des deux souches étudiés ont été déterminées selon le protocole de GANIÈRE, MANGION, and PÉRIDY (2004) modifier, trois séries de tubes ont été réalisés dont la première correspond au différentes concentrations de l'extrait , alors que la deuxième et la troisième correspond aux inoculum des bactéries standardisés . A partir de chacun des concentrations protéique, 1 ml été a chaque fois ajouté aux tubes inoculer par 1 ml de souche bactérienne standardisé .Les tubes ont été incubés pendant 18 à 24 h à 37°C, puis une lecture

visuelle a été effectuée. La croissance bactérienne a été indiquée par l'apparition d'une turbidité : le résultat est positif lorsqu'un trouble apparaît dans les tubes, le premier tube où il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice.

f) Détermination de la Concentration Minimale bactéricide (CMB) en milieu solide

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait protéique capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide de l'extrait. La même gamme de concentration, réalisée par la technique de dilution en milieu liquide, a été utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'extrait protéique. Les prélèvements ont été effectués dans chacun des tubes qui n'ont pas présenté une turbidité visible (dilution 1 / 2 et 1 / 4 pour les deux souches) puis déposés « en strie » sur gélose nutritive (deux boîtes pour chaque dilution). Les boîtesensemencées sont incubées 24 heures à 37°C. La CMB de l'extrait protéique a été déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie (**BOLOU et al., 2011**).

1.2.8. Activité anti-hémolytique sur des cellules sanguines humaines

a. Préparation des érythrocytes

La suspension érythrocytaire a été préparée selon le protocole de (**Alinezhad et al., 2012; Ebrahimzadeh, Nabavi, & Eslami, 2010**). Le sang hépariné a été centrifugé à 1500 tr / min pendant 10 min à 4° C. Le plasma et les couches de globules blancs ont été aspirés et éliminés. Les érythrocytes contenus dans le culot ont été repris dans le tampon PBS (à 0,2 M et pH 7,4) à 10 volumes. Après mélange par retournement, les échantillons ont été à nouveau centrifugés à 15000 tr /min pendant 10 min à 4° C et les surnageant ont été éliminés à l'aide d'une micropipette. Le lavage du culot a été répété 3 fois dans les mêmes conditions. Les érythrocytes lavés ont été suspendues dans le PBS (1 / 1), (v/v), puis conservés pendant 2 à 4 jours à 4 C°.

b. La mise en évidence de l'activité anti-hémolytique

Une suspension érythrocytaire à 4 % a été préparée dans le PBS dont la molarité a été de 0,2 M et un pH de 7,4(Annexe 7). 2 ml de cette suspension ont été ajoutés à 0,5 ml de chaque concentration d'extrait à tester déjà préparés dans le PBS (24 -12-6-1-0,5 et 0,25 mg/ml). Puis, le milieu a été dilué en le complétant avec le PBS jusqu'à 5 ml dans chaque

tube à essai. Le mélange obtenu a été incubé pendant 5 min à température ambiante. 0,5 ml de H₂O₂ à 1M préparés dans du PBS ont été ajoutés pour induire la peroxydation des lipides membranaires des érythrocytes. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 2h dans un bain marie à 37° C.

Ensuite, les échantillons ont subi une centrifugation à 1000 tr /min pendant 10 min. Enfin, les surnageant obtenus dans chaque tube ont été aspirés et les lectures des DO ont été réalisées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Afin d'avoir une hémolyse totale (100 %) un contrôle contenant 2 ml de suspension érythrocytaire à 4 % ont été incubés avec 2 ml de H₂O₂ (Nabavi et al., 2013; Naim, Gestetner, Bondi, & Yehudith 1975). L'acide ascorbique a été utilisé comme un standard dans les mêmes conditions. Trois essais pour chaque concentration ont été réalisés dans le but de la confirmation des résultats.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule décrite en dessous :

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = (Ac - Ae / Ac) * 100.$$

Dont :

-Ac: c'est l'absorbance obtenue après hémolyse totale.

-Ae : c'est l'absorbance obtenue en présence de l'extrait.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

2. Résultats et discussion

2.1 Etudes préliminaires

2.1.1 Etude de l'effet de la conservation sur le taux de protéines

L'extraction des protéines de l'ail a été réalisée sur deux échantillons dans les mêmes conditions (tampon, température, pH et la durée d'incubation). L'un des échantillons a été fraîchement préparé et macéré tandis que le deuxième est conservé à 4 C° pendant 5 jours avant de subir la macération. Le tableau V ci-dessous illustre les résultats obtenus de cette expérience.

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford a montré que le taux de protéines de l'extrait (2) conservé (5 mg/ml) a été beaucoup moins important que celui de l'extrait (1) frais (29,88 mg/ml). Il y a une forte probabilité que cette différence de concentration soit due à la présence et à la libération des protéases de l'extrait après hachage. D'autre part, la conservation pendant 5 jours a augmenté la durée de contact entre les protéases et d'autres protéines de l'extrait, ce qui a abouti à la dégradation de ces dernières. Des études antérieures sur les enzymes de l'ail avaient montré la présence des protéases qui ont une activité optimale à pH entre 6,0 et 6.5 (Halmi et al., 2014 ; Sendl, 1995). On remarque que le pH du tampon d'extraction utilisé durant ces travaux est proche de celui utilisé dans notre démarche.

D'après le résultat obtenu dans cette étude préliminaire, c'est l'extrait frais qui a été choisi pour la suite du travail, vue sa teneur élevée en protéines totales.

Tableau V : concentration protéique de l'extrait frais et conservé.

Extraits	[c] mg/ml
1. Extrait frais + sonication	29,88
3 Séjourné + sonication	5

2.1.2 Effet de la sonication sur le taux de protéines

L'extraction a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales pour les deux extraits, la différence a été dans l'utilisation d'ultrasonore seulement pour l'extrait 2. Le dosage des protéines a été en suite effectuée selon la méthode de Bradford et les résultats ont été illustrés dans le tableau VI.

La concentration protéique de l'extrait obtenu après la sonication a été beaucoup moins importante (29,88 mg/ml) que celle obtenue dans l'extrait non traité par sonication (51,68 mg/ml) et cela est probablement dû au phénomène de cavitation et de propagation des ondes ultrasonores mais aussi à la nature du solvant utilisé ainsi que sa composition chimique car lorsqu'un liquide ne permet pas la conduction des ondes ultrasonores, par conséquent le phénomène de cavitation n'aura pas lieu, ce qui engendre la diminution du rendement d'extraction par le manque de l'éclatement cellulaires, éventuellement (LAUGIER, 2007) .

La formation des ondes stationnaires peut être la cause de la dégradation des protéines, car dans un milieu fini, l'interaction entre l'onde incidente et l'onde réfléchi aux interfaces peut donner naissance à une onde stationnaire au sein de laquelle il n'y a pas la propagation d'énergie, l'accumulation de cette dernière engendre l'augmentation importante de la température dans le milieu réactionnel, ce qui a provoqué peut être la dégradation non négligeable des protéines de l'extrait (ET TAOUIL, 2011) .

En fonction des résultats générés de cette expérience, l'utilisation de l'extraction par macération seule a été choisie et adoptée pour le reste du travail vu que la concentration protéique a été assez élevée dans l'extrait obtenu par macération que dans l'extrait traité par sonication.

Tableau VI : concentration protéique des extraits : avec et sans sonication.

Extraits	[c] mg/ml
Macération + sonication	29,88
Macération	51,68

2.2 Optimisation des conditions d'extraction des protéines totales

L'extraction est la première étape importante dans la récupération et la purification des principes actifs à partir de matrices végétales en particulier la fraction protéique. De nombreux facteurs contribuent à l'efficacité de l'extraction telle que : le type de solvant, le pH, la température et la taille des particules de la plante.

Lorsque de nombreux facteurs et leurs interactions affectent la réponse souhaitée, la méthodologie des surfaces de réponse (RSM) sera un outil efficace pour optimiser

l'extraction et surtout réduire les essais expérimentaux nécessaires pour évaluer plusieurs paramètres et leurs interactions (M. Silva, Rogez, & Larondelle, 2007; Pandey & Banik, 2012).

Trois facteurs (temps de macération, la température et le pH d'extraction) à trois niveaux (-1, 0 et 1) ont été appliqués pour optimiser l'extraction de la fraction protéique à partir du broyat de l'Ail frais. Les facteurs choisis dans la présente étude sont :

- Le temps de macération A : (1h, 2h et 3 h) ;
- La température d'extraction B : (4 C°, 14,5 C° et 25°C)
- Le PH d'extraction C : (5.5, 6.75 et 8)

A cet effet une étude composée de 17 expériences données par le logiciel Design expert, a été réalisé et nous a permis d'avoir les résultats représentés dans le tableau suivant.

Le modèle mathématique retenu a été donné par l'équation suivante $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$ et qui correspond à :

$$\text{Protein concentration (Y)} = +230.64224 + 84.41825 A + 2.31790 B - 80.77754 C + 0.023184 A * B - 2.34581 A * C - 0.229201 B * C - 15.88997 A^2 - 0.029134 B^2 + 6.35799 C^2$$

Tableau VII : Optimisation des conditions d'extraction par le plan d'expérience Box-Behnken (RSM) de la fraction protéique de l'Ail.

Std	Run	FACTOR			Protein concentration (mg/ml)	Protein concentration	
		Factor 1:A Maceration time (h)	Factor 2:B Temperature (°C)	Factor 3:C pH		predicted values (mg/ml)	Error
3	1	1	25	6.75	28.775	27,99	0,785
15	2	2	14.5	6.75	51	50,93	0,07
2	3	3	4	6.75	41.33	41,01	0,33
9	4	2	4	5.5	60	59,01	0,99
1	5	1	4	8	42.55	41,79	0,76
10	6	2	25	5.5	66.02	62,98	3,04
11	7	2	4	8	62.346	62,02	0,326
7	8	1	14.5	8	40.92	40,15	0,77
17	9	2	14.5	6.75	52.36	51,72	0,64
12	10	2	25	8	56.224	56,63	-0,406
13	11	2	14.5	6.75	55.2	53,91	1,29
4	12	3	25	6.75	40.704	40,53	0,174
14	13	2	14.5	6.75	58.673	54,88	3,79
6	14	3	14.5	5.5	61.938	50,88	11,05
5	15	1	14.5	5.5	46.02	45,24	0,78
16	16	2	14.5	6.75	54.77	54,61	0,16
8	17	3	14.5	8	45	44,08	0,92

Les concentrations protéiques expérimentales obtenues ont été proches de celles prédites avec des erreurs standards plus ou moins faibles (tableau VII) ce qui confirme la bonne application des conditions d'extraction en particulier les facteurs étudiés. Excepté certaines expériences où l'erreur standard était importante, ce qui peut être dû aux facteurs résiduels.

2.2.1 Analyse de la variance de protéines totales.

Une analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée sur les résultats obtenus (Tableau VII). Cette analyse permet de tester la pertinence des variables impliquées dans le modèle étudié (Tableau VIII).

Les données de l'analyse de la variance (ANOVA), nous ont permis de déduire que les facteurs choisis influencent d'une manière significative sur le taux de protéines extraites avec une forte significativité des combinaisons : Temps de macération (A), pH (C), Temps de macération² et pH² avec une valeur-*p* inférieure à 0,0500. Les valeurs supérieures à 0,1000 indiquent le non significativité des facteurs.

La valeur-F du modèle de 19,00 implique que le modèle est significatif. Il y a seulement 0,04% de chances qu'une valeur F aussi grande puisse se produire à cause du bruit.

La valeur F d'absence d'ajustement de 1,08 implique que le manque d'ajustement n'est pas significatif par rapport à l'erreur pure. Il y a 45,18% de chances qu'une valeur F de manque d'ajustement aussi importante puisse se produire en raison du bruit. Le manque d'ajustement non significatif est bon.

Le coefficient de détermination prédit : $R^2 = 61,78\%$ n'est pas aussi proche du R^2 ajusté de 91,01%, la différence étant supérieure à 0,2 cela peut indiquer que les facteurs non contrôlables (résiduels) ont été importants ou peut être aussi due au modèle.

Tableau VIII : Analyse de la variance de protéines totales.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	1538.55	9	170.95	19.00	0.0004	significant
A- maceration time	207.11	1	207.11	23.02	0.0020	
B-température	0.6102	1	0.6102	0.0678	0.8020	
C-pH	113.10	1	113.10	12.57	0.0094	
AB	0.1943	1	0.1943	0.0216	0.8873	
AC	36.73	1	36.73	4.08	0.0830	
BC	38.66	1	38.66	4.30	0.0769	
A²	994.13	1	994.13	110.51	< 0.0001	
B²	40.62	1	40.62	4.52	0.0712	
C²	340.54	1	340.54	37.85	0.0005	
Residual	62.97	7	9.00			
Lack of Fit	28.22	3	9.41	1.08	0.4518	not significant
Pure Error	34.76	4	8.69			
Cor Total	1601.52	16				

En traçant la courbe de parité donnant les valeurs prédites en fonction des valeurs observées (Figure 17), on remarque que les valeurs ont été très proches de la ligne droite ce qui confirme la bonne corrélation entre ces valeurs et ce qui signifie aussi que le modèle adopté a été le bon choix et l'effet des facteurs résiduelles n'ont pas un grand impacte sur les concentrations en protéines obtenues par le procédé d'extraction adopté. La figure18 confirme une fois de plus, que les valeurs résiduelles et celles prédites présentent une linéarité vue qu'elles ont été éparpillées autour du zéro avec un écartype assez minimale.

Design-Expert® Software
Trial Version
proteins concentration
Color points by value of
proteins concentration:
28.775 66.02

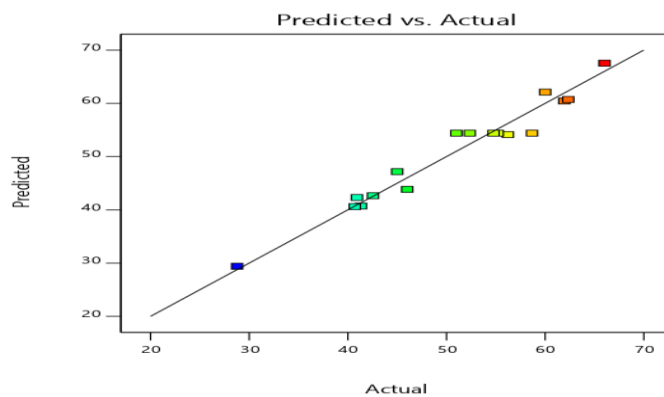


Fig 17: Courbe des valeurs prédites en fonction des valeurs observées pour la concentration protéique de l'Ail

Design-Expert® Software
Trial Version
proteins concentration
Color points by value of
proteins concentration:
28.775 66.02

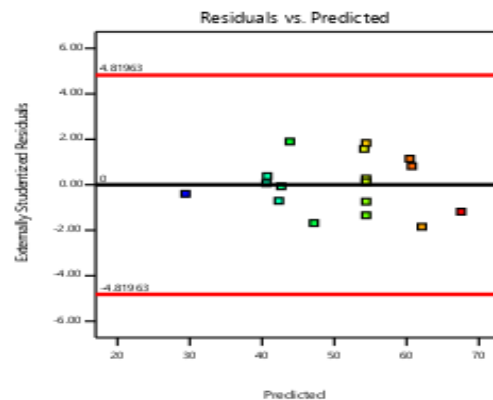


Fig 18: Valeurs Résiduelles et valeurs prédites par rapport à l'écartype.

2.2.2 Etude paramétrique

Les résultats de l'étude paramétrique a été réalisé en faisant varier à chaque fois deux facteurs choisis et déduire graphiquement à leur influencent simultanée sur le taux de protéines obtenu. La représentation de ces résultats en courbes de trois dimensions (3D) est appelé les surfaces de réponse (RSM : Response Surface Methodology). Cette méthode permet de visualiser les conditions optimales et de déterminer la meilleure concentration en protéines pour trois facteurs lorsqu'un facteur a été fixé.

a) Influence du temps de macération et de la température d'extraction.

L'influence du temps de macération et la température d'extraction sur le taux des protéines extraites a été illustrée dans la figure 19. La surface de réponse été sous forme convexe ce qui indique que les plages de variables ont été choisies correctement. La

concentration en protéines la plus élevée a été atteinte lorsque le temps de macération a été au voisinage de 2h à 2,5 h et à une température proche de 25 C°, avec un pH fixé à 6,75.

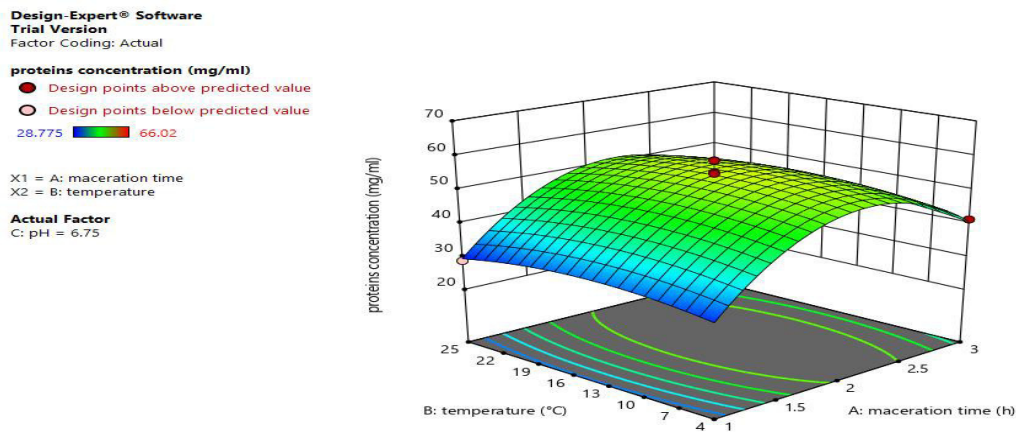


Fig 19 : Surface de réponse montrant l’effet de la température et du temps de macération sur le taux des protéines.

b) Influence du temps de macération et du pH.

La figure 23 représente la surface de réponse correspondante à la variation de la concentration protéique en fonction du temps de macération et du pH. La représentation est sous forme Ondulé ce qui signifie l’effet important de la variation de ces deux facteurs sur le taux des protéines avec un taux maximum de 60 mg /ml à pH voisin de 6,5- 7 et un temps de macération entre 2h et 2,5 h.

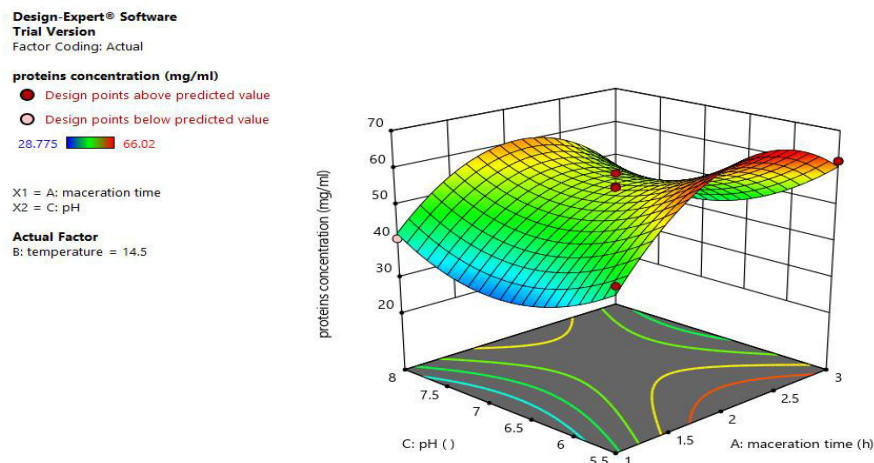


Fig 20 : Surface de réponse montrant l’effet du temps de macération et du pH sur le taux de protéines.

c) Influence du pH et du température

L'effet de la variation du couple pH/ temps de macération a été aussi étudié avec l'obtention d'une surface de réponse sous forme plus ou moins concave et des concentrations maximales en protéines à pH voisin de 6,5 et 7 et une température culminant à 20 et 25 C°.

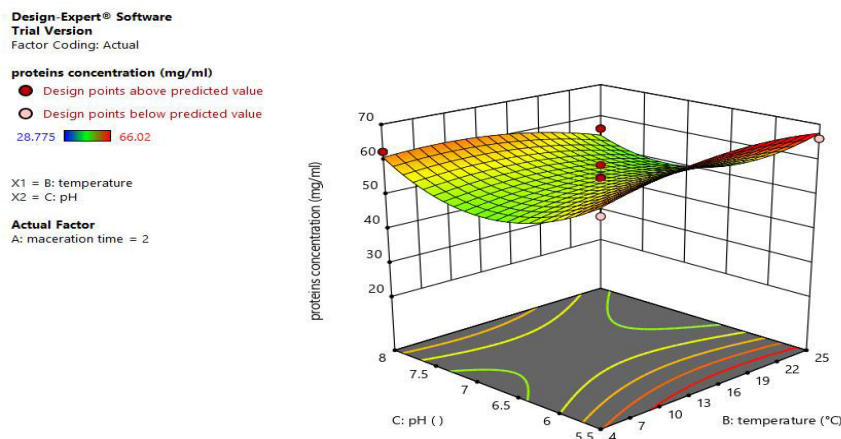


Fig 21 : Surface de réponse montrant l'effet de température et le pH sur le taux des protéines.

2.2.3 Conclusion de l'étude d'optimisation

Le modèle ainsi postulé a été validé statistiquement et expérimentalement ce qui lui confère la qualité à la fois descriptive et prédictive du phénomène étudié.

• L'obtention d'un taux de protéines optimal de 46,57 mg /ml sera possible avec le procédé d'extraction adopté dans ce travail, en utilisant les paramètres suivant et qui sont décrits dans la figure 22:

- PH d'extraction égale à 6,22
- Un temps de macération proche à 1h 42 min
- Une température de 24,53 C°
- Il n'y a pas une grande différence entre la concentration expérimentale obtenu en conditions optimales (45 ,82 mg/ml) et celle prédite (46,57 mg /ml) concernant le taux protéique de l'extrait.

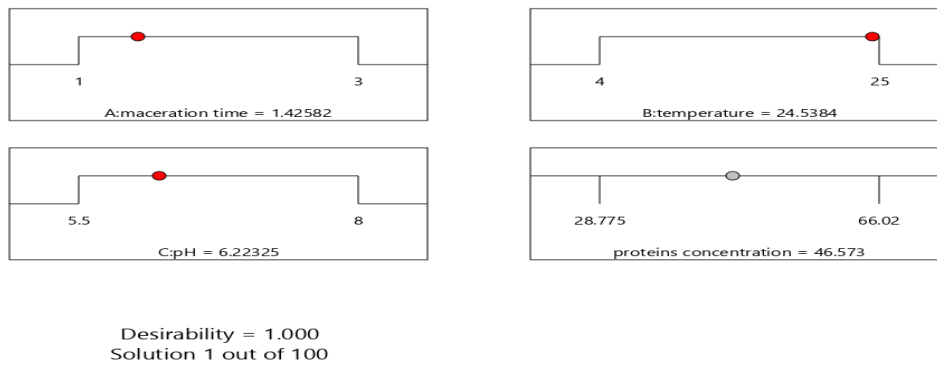


Fig 22 : les conditions optimales d'extraction de la fraction protéique de l'ail.

2.3 Essai de séparation électrophorétique sur PAGE-SDS.

Un traitement électrophorétique de l'isolat protéique optimisé de l'Ail a été réalisé. La photo de la figure 28 illustre le résultat obtenue dont la concentration de l'échantillon (**Ex**) été de 37,45 mg/ml et en utilisant un marqueur de taille (MT) qui a été utilisé dans le but de l'identification approximative des poids moléculaire des protéines présentes dans l'isolat.

La migration a été effectuée selon les paramètres suivants : 80V, 40mA et 10W. Le traitement du gel obtenu après l'électrophorèse a permis l'observation de l'apparition principalement de deux bandes A et B (figure 23) et cela a été due à l'inadéquation du support de migration.

Le poids moléculaire de la bande A (fig26) a été au voisinage de 116 KDa, d'après le travail réalisé par Tchemychev, Rabinkov, Mirelman , and Wilchek (1995) et **Smeets, Damme, Leuven, and Peumans (1997)**, c'est possible qu'elle corresponde à l'enzyme Alliinase (110 kDa) qui a plus ou moins conservé sa structure tridimensionnelle et qui n'a pas été soumise aux conditions dénaturantes (utilisation du SDS et de la chaleur), vue que la majorité des travaux réalisés sur les protéines de source végétale, le traitement en conditions dénaturantes de l'échantillon à analyser par électrophorèse SDS-PAGE nécessite l'utilisation des agent dénaturants puissants, ce qui a été le cas pour l'étude de la dépolymérisation des fractions de protéines de Soja, de Féverole et de Colza réalisé par **Simard, Dupont, and Boulet (1979)** dont les meilleures résultats de dépolymérisation ont été obtenus lors de la combinaison des traitements à la guanidine-HCl et au dodecylsulfate de sodium (SDS) . Des travaux similaires ont été réalisés par (**SaÂnchez-Vioque, Clemente , Vioque, Bautista, & MillaÂn, 1999; SILVA & SOUZA, 2009**) dans le même secteur (protéines végétales) en particulièrement le travail réalisé par (**M. G. Parisi, Moreno, & Fernandez,**

2008) sur une protéine de l'ail dont le β -mercaptoetanol été l'agent dénaturant le plus utilisé pour cet effet . D'autres travaux du même contexte appuient notre hypothèse affirmant ainsi que la bande A correspond à l'alliinase, une protéine majoritaire de l'ail et qui est capable de cliver la liaison Cb-Sc du sulfoxyde des dérivés de l'acide aminé cystéine donnant ainsi naissance à tous les composés de soufre à l'ail qui sont responsables de la plupart des propriétés de l'ail, comme l'odeur et la saveur spécifiques (Bartholomeus Kuettnner, Hilgenfeld, & Weiss, 2002) .

La présence d'une autre bande, B (fig23) de faible intensité et située à des PM bas, signifie que d'autres protéines sont contenues dans l'échantillon dans une moindre mesure et qui sont inférieures à 20 KDa (entre 20 ,15 et 14 KDa). D'ailleurs, d'importants travaux scientifiques ont été consacrés aux petites protéines de l'ail dont le PM est inférieur à 20 KDa. D'après une étude réalisée par Tooba Naz Shamsi et al. (2018) et T. N. Shamsi et al. (2016) sur les protéines de l'Ail par SDS PAGE, il a été montré que la protéine de 15 kDa correspond à une protéine inhibitrice de protéase (ASPI). D'autre part, Wang, Liu, Lu, and Cui (2010) et Hadji et al. (2007) avaient montré à travers l'analyse par SDS-PAGE d'un extrait d'ail frais, la présence d'une bande de 14 kDa, selon les mêmes auteurs elle correspond aux sous-unités de SOD (superoxyde dismutase) qui est une métalloenzymes qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde (O_2^-) en oxygène moléculaire. La masse moléculaire native de SOD dimérique était estimée par 28 kDa.

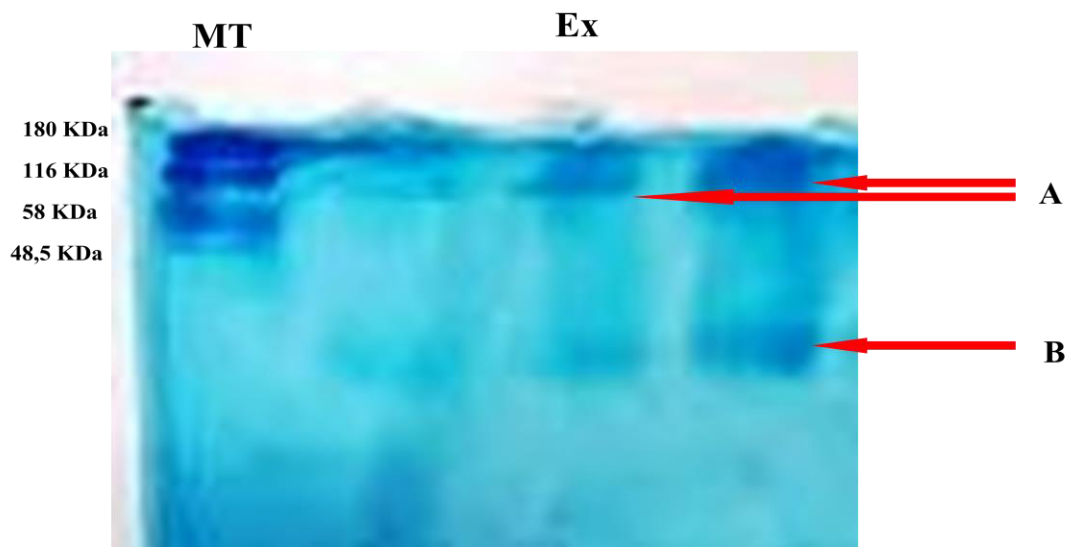


Figure 23: Profile protéique SDS-PAGE des extraits précipités à 60% de sulfate d'ammonium. Avec : **A** : Protéines de grand PM (dont les enzymes) ; **B** : Peptides de PM < 20 Kda ; **MT** : Marqueur de taille (Protéines standard) ; **Ex** : Extraits protéiques d'*Allium Sativum*, précipités à 60% d'ammonium sulfate.

2.4 Tests de l'activité antibactérienne

L'activité bactérienne des protéines de l'Ail (*Allium sativum*) a été évaluée sur deux souches de référence : *Staphylococcus aureus* (FRI 137) et *Entérocooccus faecalis* (ATCC 49452).

2.4.1 Test d'inhibition par la méthode de diffusion des puits et sensibilité aux protéases.

Cette activité a été évaluée par la méthode de diffusion des puits. Le pouvoir inhibiteur des protéines a été obtenu par la mesure du diamètre des zones d'inhibition en mm.

Les résultats de sensibilité des deux souches bactériennes vis-à-vis de l'extrait protéique testé avec une concentration de 37,45 mg/ml ont été présentés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition

Souches	Témoin (T)	Extrait (Ex)	Ex+trypsine(Tr)	Ex+Pepsine(P)
Staph	–	20 ±0,5 mm	–	–
E-Feac	–	20 ±0,5 mm	–	20±0,5 mm

-Staph : *Staphylococcus aureus*

-E-Feac : *Entérocooccus faecalis*

(-) : pas d'activité inhibition

Les deux souches bactériennes étudiées ont exprimé une sensibilité plus ou moins importante vis-à-vis de l'extrait protéique, dont la zone d'inhibition a été de l'ordre de 20 mm pour les deux souches (fig 27 et 28), ce qui confirme l'effet inhibiteur de la fraction protéique de l'ail sur les deux souches étudiées. Plusieurs études ont été réalisées sur différentes fractions de l'ail et qui ont montré un effet antibactérien en particulier sur les souches proches à celles utilisés dans notre travail. Une zone d'inhibition de 19,75 mm a été exprimée par l'extrait aqueux de l'ail selon les travaux réalisés par **Gull et al. (2012); (Iwalokun, Ogunledun, Ogbolu, Bamiro, & Jimi-Omojola, 2004)** testé sur *Staphylococcus aureus*. Une autre étude a été effectuée dans le même secteur (extrait aqueux) sur *Entérocooccus faecalis* qui a été réalisé par **Yousufi (2012)** a montré une activité inhibitrice identique (20 mm) à celle exprimée par notre l'extrait protéique.

Cependant, aucun effet inhibiteur n'a été remarqué autour de point de dépôt du mélange Ex+(Tr), cela peut être expliqué par l'effet de la trypsine sur les protéines responsables de l'inhibition, c'est-à-dire, il est possible que la coupure provoqué par l'enzyme a lieu au niveau du site actif de la protéine ou le peptide responsable de l'inhibition des deux souches, et ça confirme aussi que les protéines intervenant dans cette activité se caractérisent par la présence des acides aminés de type basique vue que la trypsine a une activité spécifique comme les autres enzymes ,elle coupe à la droite des acides aminés basiques (Ghasemi, 2007) .

Une zone d'inhibition a été mesurée à 20 mm autour du puits contenant le mélange Ex+(P). Cette sensibilité a été exprimée seulement par la souche *Entérocooccus faecalis* (fig 24), cela peut être expliquer par le fait que les protéines responsables de l'activité inhibitrice de cette souche n'ont pas été touchées par la pepsine qui coupe à gauche des acides aminés neutres (BENYAHIA, 2013), c'est-à-dire que la pepsine n'a pas coupé au niveau de cite actif des protéines inhibitrices vue l'absence des acide aminés cibles à ce niveau, ce qui a réservé l'effet inhibiteur de la protéine active.

L'absence totale de zone d'inhibition a été observée chez la souche de *Staphylococcus aureus* autour de puits contenant le mélange Ex+ (P) (fig 25), cela peut être interprété par l'effet positif (présence de coupure) de la pepsine qui a une activité protéolytique élevée ,sur les protéines actives sur cette souche, et cela confirme la présence des acides aminés neutres au niveau des ces protéines(Abdellaoui 2007) .

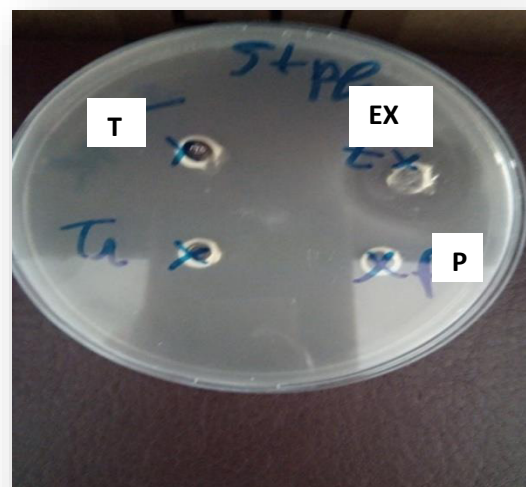
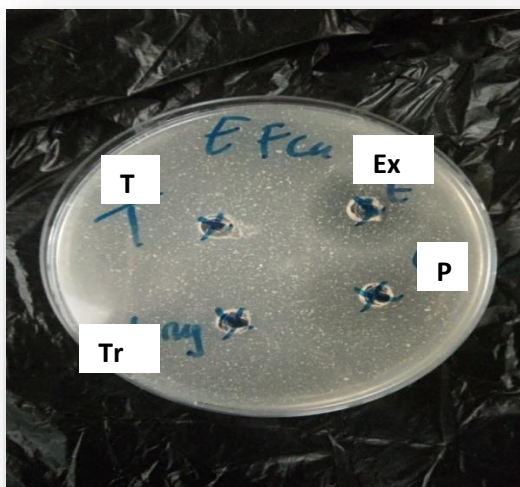


Fig 24: Photo de l'effet de l'extrait protéique sur les bactéries de *staphylococcus aureus*.

Fig 25: Photo de l'effet de l'extrait protéique sur les bactéries d'*Entérocooccus faecalis*

Avec :

- tr = trypsine + extrait
- p= pepsine + extrait
- T = témoins
- Ex = extrait

2.4.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion des puits nous ont conduit à confirmer quantitativement l'activité antibactérienne de l'extrait protéique de l'Ail vis-à-vis les deux souches étudiés et qui ont exprimé une zone d'inhibition. L'évaluation quantitative de l'activité antibactérienne a été effectuée par la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats obtenus ont été présentés dans le tableau X.

Tableau X : La concentration minimale inhibitrice des protéines de l'ail.

Dilution	0	1 /2	1/4	1/6	1/8	1/10
[c] mg/ml	37 ,45	18,72	9 ,36	4,62	2, 34	1,17
Stph	-	-	±	+	+	+
E-Faec	-	-	-	±	+	+

(-) : pas de formation de trouble bactérien

(±) : début de formation de trouble bactérien

(+) : formation de trouble bactérien

Ces résultats ont montrés que la (CMI) de l'extrait sur *Staphylococcus aureus* a été exprimée à partir de la dilution 1/2 et qui correspond à la concentration de 18,72 mg/ml alors que la CMI sur *Entérocooccus faecalis* été exprimé à partir de la dilution 1/4 et qui correspond à la concentration de 9, 36 mg/ml, au delà de ces concentrations, la croissance des bactéries a été remarquables avec une intensité de troubles croissante (fig : 26 et 27). La CMI de l'extrait protéique sur *Staphylococcus aureus* été beaucoup moins importante par rapport à celle exprimé par l'extrait brut (32 mg/ml) de l'ail selon une etude réalisé par

Grosso, Ramacciato, Motta, Ferraresi, and Sartoratto (2007) et ça confirme mieux l'effet antibactérien des la fraction protéique de l'ail.

La CMI de l'extrait a été un peu importante pour les deux souches (9,36 mg/ml, 18,72 mg/ml) mais il reste que la méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne (dilution an milieu liquide), l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs, le type des microorganismes ciblés sont des facteurs pouvant largement influencer la CMI de l'extra protéique.

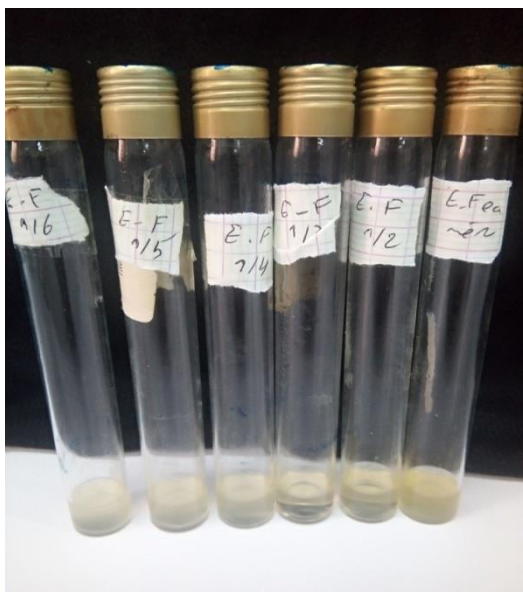


Fig 26 : photo de résultats la CMI de l'extrait sur d'*Enterooccus faecalis* (photo originale)



Fig 27 : photo de résultats la CMI de l'extrait sur *Staphylococcus aureus* (photo

2.4.3 Détermination de la CMB

La CMB correspond à la plus petite concentration qui laisse survivre au plus 0,01 % des germes de la suspension de départ après une incubation de 24 heures à 37°C (El Amri et al., 2014). L'effet antibactérien a été jugé bactéricide ou bactériostatique en fonction du rapport R: CMB/CMI. En effet, si $R = 1$ à 2, l'effet est bactéricide, si il est compris entre 2 et 4 l'effet est moyennement bactéricides et si $R = 4$ à 16, l'effet est bactériostatique (Bouharb et al., 2014). Les résultats obtenus ont été illustré dans le tableau suivant :

Tableau XI : Nature de l'activité antibactérienne

Souches	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/ CMI	Jugement
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,72	18,72	1	bactéricide
<i>Entérocooccus faecalis</i>	9 ,36	37 ,45	4,0012	moyennement bactéricide

L'effet de l'extrait protéique est bactéricide sur la souche de *staphylococcus aureus* vu l'absence totale des colonies bactériennes sur les boîtes ensemencées (figure29) en plus le R calculé a été égale à 1 ce qui confirme encore plus l'effet bactéricide de l'extrait sur la souche.

Contrairement a celui observé sur *Entérocooccus faecalis* dont, un faible nombre de colonies bactériennes ont été observées sur les boîtes incubées (figure28) avec un rapport MBC/MIC qui été de l'ordre de 4,0012. D'après ces résultats, l'effet de l'extrait sur la souche peut être confirmé comme étant un effet moyennement bactéricide .

La CMB de l'extrait protéique sur *Staphylococcus aureus* a été de 9,36 mg / ml, une valeur assez faible par rapport aux résultats trouvés dans un travail réalisé par **EL-mahmood (2009)** sur l'extrait aqueux de l'ail dont la valeur de CMB trouvée a été de 75 mg / ml. Ces résultats obtenus indiquent la capacité des protéines de l'ail non seulement à inhiber les *Staphylococcus aureus* mais aussi de les éliminer mais avec des faibles concentrations de l'extrait.

Une CMB beaucoup moins importante a été exprimée par *Entérocooccus faecalis* vis-à-vis l'extrait brut de *Allium sativum* (9 375 µg/ml) selon un travail réalisé par PerccaH, Palomino, and Champi (2014). En comparaison avec la CMB trouvée dans notre étude, cela confirme encore une autre fois l'effet antibactérien de l'ail avec une importance différente selon la fraction cible utilisée de l'ail et qui exprime un mode d'action antibactérienne propre à elle.

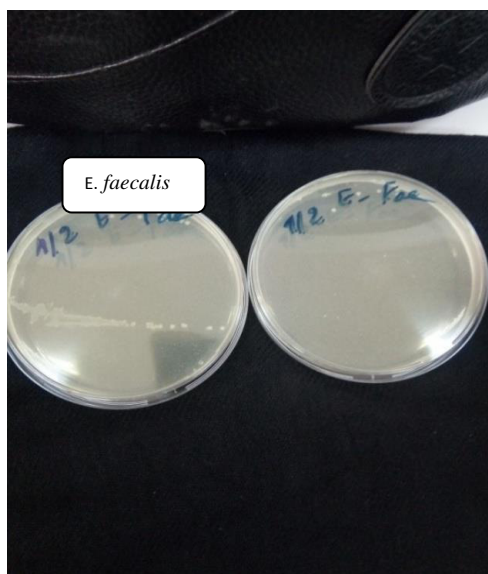


Fig 28 : photo de l'effet bactériostatique de l'extrait sur *Entérocooccus faecalis* (photo originale)

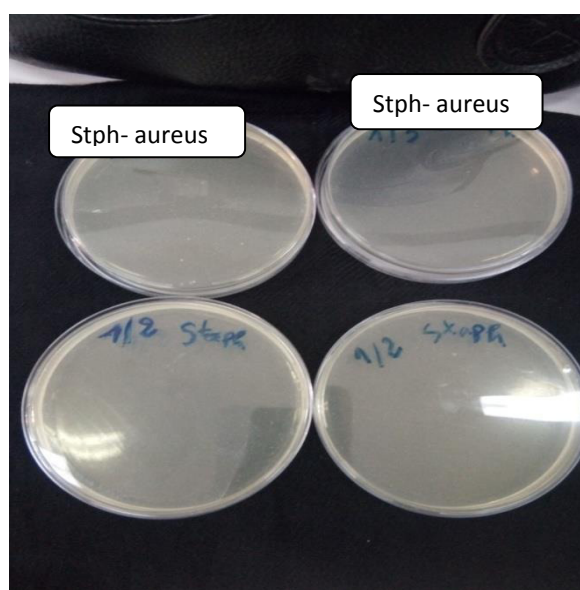


Fig 29 : photo de l'effet bactéricide de l'extrait sur *Staphylococcus aureus* (photo originale)

2.5 Activité anti-hémolytique sur des cellules sanguines humaines

L'activité anti-hémolytique a été évaluée en utilisant des concentrations différentes de l'extrait protéique, le pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse a été présenté dans le tableau suivant :

Tableau XII : Pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse

Tubes	Contrôle	0	1	2	3	4	5
[c]mg /ml	0	24	12	6	1	0,5	0,25
Do	0,748±0,02	0,652±0,06	0,404±0,061	0,250±0,014	0,109±0,004	0,081±0,008	0,043±0,02
%inhibition	0	13,58±0,28	27,95±0,77	55,34±0,96	85,33±0,46	88,83±0,55	94,24±0,83

La gamme de la variation du pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse en fonction de la concentration de l'extrait était de 13,58 % à 94,24 %.

Pour les faibles concentrations en extrait, le pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse a été très important en comparaison avec le contrôle: de 85,33% - 88,83 % et 94,24 % respectivement pour : 1-0,5 et 0,25 mg/ml de l'extrait. Une autre opération du même genre et cela avec le standard acide ascorbique qui a exprimé une gamme d'inhibition de 84,36% à 94,65% (Annexe 8) a révélé que l'activité anti hémolytique a été un peu élevée (85,33% et 88,83%) respectivement pour (24-12-6 mg/ml) de l'extrait par rapport à ce témoin. Cependant pour les concentrations élevées de l'échantillon (24-12-6 mg/ml), les pourcentages de l'inhibition d'hémolyse enregistrés étaient moins importants (13,58 % -27,95%-55,34%).

Dans cette étude, l'inhibition de l'hémolyse s'est avérée variable en fonction des concentrations de l'extrait utilisées (figure 30) quand des globules rouges ont été traités avec H₂O₂ à des concentrations plus ou moins faibles (1-0,5 et 0,25 mg/ml), le pourcentage d'inhibition d'hémolyse a été remarquable et très important alors que pour les concentrations dites élevées en extrait, le pourcentage d'inhibition a été moins important.

L'action de H₂O₂ sur les érythrocytes provoque l'épuisement des protéines membranaires, la déformation leur membrane et la perturbation des micro-constituants ce qui conduit à leur lyse et libération de l'hémoglobine (**Yasmeen & Hassnain, 2016**). Une étude a été réalisée dans le même contexte par **van der Zee, Dubbelman, and van Steveninck (1985)** qui ont montré que l'exposition des érythrocytes au H₂O₂ a provoqué une peroxydation lipidique membranaire qui ne s'est produite qu'avec la présence d'hémoglobine, ce qui indique un rôle médiateur de l'hémoglobine dans ce processus et une perméabilité passive aux cations (K⁺) qui a été causée par oxydation des groupes sulfhydriles SH libres, c'est à dire celles qui présentent de nombreux résidus cystéines, des protéines membranaires ainsi que les chaînes aliphatiques, et des cycles aromatiques (**van der Zee et al., 1985**).

En effet, l'interaction entre les protéines de l'extrait avec celle des érythrocytes qui ont des fonctions biologiques importantes: elles contrôlent la morphologie de la cellule, les mécanismes de transfert et les activités enzymatiques (**PLA 2000**), probablement a été la cause de la protection contre l'hémolyse. Cette interaction peut être à lieu au niveau des acides aminés érythrocytaires qui ont le groupe SH ce qui empêche leur oxydation donc à l'inhibition de la perte passive des cations telle que les ions K⁺ avec le maintien de structure et l'intégrité membranaire. Comme il est possible que la protection des érythrocytes se fait d'une manière indirecte en présence des protéines de l'extrait qui entrent en compétition

avec les protéines membranaires pour le piégeage des radicaux libérés par H₂O₂ ce qui a permis la protection des érythrocytes contre l'hémolyse car les agents radicalaires qui attaquent les protéines en particulier les acides aminés : l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine provoquent l'oxydation de certains résidus avec, par conséquent, l'apparition de groupements carbonyles, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes, et certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats (**Haleng, Pincemail, Defraigne, Charlier, & Chapelle, 2007**).

La présence de peroxydases qui sont de nature protéique dans l'ail peut avoir un effet protecteur sur les érythrocytes. Selon **El Ichi et al. (2008)**, l'ail possède une isoenzyme Peroxydase POX qui a été purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et Chromatographie d'échange d'anions. Deux isoformes ont été désignées : POX (1A) et POX (1B). Le POX (1B) s'est avéré fortement active à 50 et 40 ° C pendant 40 minutes et son pH optimal était d'environ 5. Selon le même auteur, le mode d'action de ces POX est basé sur la réduction de l'eau oxygénée (H₂O₂) en H₂O. La comparaison de ces paramètres avec ceux appliqués (conditions optimales) lors d'extraction des protéines de l'ail qui ont été : temps de macérations 1 h, pH= 6 et température de 24,23 C° sont presque identiques aux nôtres, ce qui a préservé l'activité de l'enzyme, donc la réduction de (H₂O₂) dans le milieu réactionnel. Ce qui peut aboutir à la diminution de la concentration de ce dernier donc moins d'hémolyse.

L'inhibition de l'hémolyse peut être aussi due aux interactions de type hydrophobes entre les protéines de l'extrait vis-à-vis des lipides membranaires des érythrocytes en particulier avec les acides gras polyinsaturés qui sont la cible des oxydations (**Cillard & Cillard, 2006**), ce qui les protège contre la destruction et l'oxydation.

Cependant, l'évolution de l'activité anti-hémolytique a été inversement proportionnelle à la concentration de l'extrait, c'est-à-dire, plus la concentration de l'extrait diminue plus le pourcentage d'inhibition augmente et cela a été, probablement, causé par la présence des enzymes de type protéases et phospholipase dans l'extrait protéique de l'ail selon des études qui ont été réalisées et qui sont citées dans les paragraphes suivants, ces enzymes présentent une activité remarquable lorsqu'ils sont présents à des concentrations élevées (24 ; 12 et 6 mg/ml) mais au fil des dilutions de l'extrait, l'activité de ces enzymes diminue et l'effet d'inhibition d'hémolyse commence à apparaître et à augmenter.

Selon **Khatoon, Talat, and Younus (2008)**, les bulbes d'*Allium sativum* (ail) possèdent une phospholipase de type D (EC 3.1.4.4) douée d'une activité lipolytique dont la température optimale a été estimée au voisinage de 70 C° et une activité maximale observée lors de présence d'une concentration de 70 mM de calcium, mais à une température ambiante, la phospholipase présente une activité enzymatique moins importante d'où la possibilité de la confirmation de l'hypothèse citée précédemment sur l'intervention des phospholipase lorsque l'extrait protéique a été utilisé avec des concentrations plus ou moins élevées. En revanche, la même hypothèse qui explique mieux l'augmentation de l'effet anti-hémolytique avec la diminution de concentration de l'extrait utilisé.

L'ail se caractérise par la présence de protéase à cystéine qui est une enzyme protéolytique, qui présente une activité même à des températures modérées de 40 et 50 C° et pour une durée de temps allant jusqu'à 60 mn selon une étude réalisée par **M. Parisi, Moreno, and Fernández (2002)**. Une autre étude a été réalisée par Halmi et al. (2014) sur les protéases des bulbes de l'ail a montré que ces dernières ont une activité optimale à un pH de 6,0, une température à 40 C° et le temps d'incubation de 60 minutes. Les études citées précédemment confirment plus l'intervention des protéases dans l'apparition de l'hémolyse lors de l'utilisation de concentrations élevées de l'extrait, ce qui n'a pas protégé les érythrocytes.



Fig 30 : Photo présente l'activité anti-hémolytique de l'extrait protéique de l'ail.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail s'est focalisé sur l'optimisation de l'extraction de la fraction protéique d'*Allium sativum* et l'étude de l'activité anti-hémolytique et antibactérienne sur deux souches de références, *Entérocooccus faecalis* et *Staphylococcus aureus*.

Nous avons commencé par une étude préliminaire sur l'effet de la conservation sur le taux de protéines ainsi que le choix de la méthode d'extraction par rapport à deux techniques qui ont été mises en œuvres : extraction par macération et une extraction combinée entre sonication et macération dont les meilleurs résultats ont été obtenus lors de l'extraction par macération avec l'utilisation du broyat de l'ail frais ce qui a donné une concentration protéique de 51,68 mg/ml .

Par la suite, nous avons réalisé l'optimisation de l'extraction des protéines du broyat de l'ail frais par la méthode de macération dont la matrice des expériences réalisées a été obtenue via le logiciel Design Expert® version 11 et selon le plan d'expérience Box-Behnken (RSM) , les conditions optimales tirés ont été : un PH de 6,22, Un temps de macération de 1h 42 min, et une température de 24,53 C°.

L'extraction et la précipitation au sulfate d'ammonium a été une technique adopté afin d'isoler le maximum de fractions protéiques. La concentration protéique de 36 mg/ml a été le résultat final, cette fraction a été soumise à une électrophorèse de type SDS-PAGE sur gel de Polyacrylamide, deux bandes ont été révélées, une probablement correspondante à l'enzyme d'Alliinase (110 kDa) et l'autre inférieure à 20 KDa, elle correspond soit : protéine inhibitrice de protéase (ASPI) ou au superoxyde dismutase (SOD).

L'effet inhibiteur de l'extrait protéique a été étudié par la méthode de diffusion des puits vis-à-vis des deux souches, à savoir : *Entérocooccus faecalis* et *Staphylococcus aureus* qui ont exprimé une degré de sensibilité identique de $20 \pm 0,5$ mm. Ces résultats ont été complétés par la détermination de la CMI et la CMB. La CMI enregistré pour les deux souches a été identique et égale à 9 ,36 mg/ml cependant, la CMB était différente avec des valeurs de : 37 ,45 mg/ml et 9 ,36 mg/ml respectivement pour *Entérocooccus faecalis* avec un effet bactériostatique et *Staphylococcus aureus* avec un effet bactéricide.

Enfin, l'étude de l'activité anti-hémolytique de l'extrait protéique a été réalisée sur les érythrocytes humains, le pourcentage le plus significative de l'inhibition de l'hémolyse a été de 94,24% pour une concentration protéique de 0,25 mg/ml ce qui confirme le grand effet protecteur de l'extrait protéique.

Les résultats obtenus lors de ce travail soulèvent de nouvelles questions et suggèrent ainsi certaines orientations futures de la recherche :

- optimisation d'extraction par plusieurs plans d'expérience pour trier le plus adéquat ;
- Sur la purification : l'utilisation de techniques plus performantes pour la purification et la caractérisation de ces protéines telle que la HPLC, électrophorèse native et bidimensionnelle, chromatographie d'exclusion moléculaire, chromatographie d'échange d'ions ;
- Sur les activités biologiques : élargir le spectre de l'activité antibactérienne en utilisant plusieurs souches notamment pathogènes. Etudier l'activité antifongique, voir même, l'activité antioxydante et anticoagulante.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- **Abdellaoui , R.** (2007). *optention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait d'aspergillus niger isole sur sol de la région de boumerdés* M'hemeb Bougara Boumerdés
- **Akouche , A., & Cherfa , N.** (2013). *Degommage enzymatique de l'huile brute de soja: optimisation et modélisation.* Ingenieur abderrahmane mira
- **Alinezhad, H., Baharfar, R., Zare, M., Azimi, R., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M.** (2012). Biological activities of ethyl acetate extract of different parts of hyssopus angustifolius. [comparative study]. *Pharm biol*, 50(8), 1062-1066. Doi: 10.3109/13880209.2012.655859
- **Aouati , h.** (2009). *Isolement des souches de staphylococcus aureus résistantes à la Méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles D'antibiotiques.* Magister, mentouri. Constantine.
- **Aref, M., & Heded , M.** (2015). *Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale Cleome arabica L (Région d'Oued Souf).* Master Académique, ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED.
- **Arouna, K., Elisabetsky, E., Farnsworth, N., Fong, H., Habib, A.-A. M., Hargono, D.,** (1999). *WHO Monographs On Selected Medicinal Plants* (Vol. 1).
- **Bartholomeus Kuettner, E., Hilgenfeld, R., & Weiss, M. S.** (2002). Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic. *Biochemistry and Biophysics*, 402, 192–200.
- **Beddou, F.** (2015). *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de deux plantes Médicinales Sahariennes Rumex Vesicarius L et Anvillea Radiatacoss Dur.* these doctorates, Abou Bekr Belkaid Retrieved from dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/7722/1/ABEDDOU.pdf
- **Benabedlkader, T.** (2012). *Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils des Lavandes Ailées, Lavandula stoechas Sensu Lato, un Complexe d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique.* doctorat, l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, Algérie et l'Université Jean-Monnet de Saint-Etienne, France. Retrieved from file:///C:/Users/Devil/Downloads/These-Benabedlkader-Tarek-2012.pdf

- **BENALIA, M.** (2016). *Etude de la fraction lipidique de quelques graines de cucurbitacées*. doctorat KASDI MERBAH- OUARGLA.
- **BENDIF, H.** (2017). *Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae: Ajuga iva (L.) Schreb., Teucrium polium L., Thymus munbyanus subsp. coloratus (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet et Rosmarinus eriocalyx Jord & Fourr.* Doctorat, L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE KOUBA-ALGER.
- **Benkeblia, N.** (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37(2), 263-268. doi: 10.1016/j.lwt.2003.09.001
- **Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S., & Filali-Maltouf, A.** (2000). Isolation of a bacteriocin-producing lactococcus lactis subsp. Lactis and application to control listeria monocytogenes in Moroccan jben. *Journal of applied microbiology*, 89, 960-968.
- **BENYAHIA, F. A.** (2013). *Extraction de la pepsine et utilisation dans la coagulation du lait en vue d'une valorisation des proventricules de volailles au profit de la filière lait en Algérie*. doctorat, CONSTANTINE 1.
- **Benzeggouta, N.** (2005). *Etude De l'Activité Antibactérienne Des Huiles Infusées De Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments*. Magistère, Mentouri, Constantine. Retrieved from <https://bu.umc.edu.dz/theses/chimie/BEN4319.pdf>
- **Berrechioua, A.** (2016). *Investigation Phytochimique Sur Des Extraits Bioactifs De Deux Brassicaceae Medicinales Du Sud Algerien : Moricandia Arvensis Et Zilla Macroptera*. Doctorat Abou Bakr Belkaid Tlemcen. Retrieved from <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/9360/1/INVESTIGATION-PHYTOCHIMIQUE-SUR-DES-EXTRAITS.PDF>
- **Berthet, O.** (2014). *Y A-T-Il Une Place Pour La Phytothérapie Dans La Prévention Des Maladies Cardiovasculaires ?*. Doctorat, Joseph Fourier. Retrieved from <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01025271/document>
- **Bézanger-Beauquesne, L., Pinkas, M., Torck, M., & Trotin, F.** (1996). *Plantes Médicinales Des Régions Tempérées* (2e édition ed.).
- **Birlouez, E.** (2016). Ail, Oignon, échalote Lavoisier SAS Retrieved 05.03.2018, 2018, from <http://www.graines-loras.com/>
- **Bolou, G. E. K., Attioua, B., N'guessan, A. C., Coulibaly, A., N'guessan, J. D., & Djaman, A. J.** (2011). Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de

terminalia Glaucescens planch. Sur salmonella typhi et salmonella typhimurium. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*, 80, 772 - 790.

- **Boubekri, C.** (2014). *Etude De L'activité Antioxydante Des Polyphenols Extraits De Solanum Melongena Par Des Techniques Electrochimiques*. Doctorat, Mohamed Khider, Biskra. Retrieved from <http://thesis.univ-biskra.dz/62/1/Etude%20de%20l%E2%80%99activit%C3%A9%20antioxydante%20des%20polyph%C3%A9nols%20extraits%20de%20Solanum%20melongena%20par%20des%20techniques%20%C3%A9lectrochimiques.pdf>
- **Boudjouref, M.** (2011). *Etude De L'activité Antioxydante Et Antimicrobienne D'extraits d'Artemisia Campestris L* Magister, Ferhat Abbes, Sétif. Retrieved from <http://www.univ-setif.dz/MMAGISTER/images/facultes/SNV/2011/Boudjouref%20Mourad.pdf>
- **Bouharb, H., El Badaoui, K., Zair, T., El amri, J., Chakir, S., & Alaoui, T.** (2014). Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences*, 78(1), 6685. doi: 10.4314/jab.v78i1.3
- **Boumendjel, A., Messarah, M., Benyahia, S., Ladjama Ali, A., & Bouzerna, N.** (2010). Mise au point d'une technique d'obtention de Gammaglobulines pures à partir de sang humain. *Researchgate*, 178, 07.
- **Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of Microgram quantities of protein utilizing the Principle of protein-dye binding *analytical biochemistry* 72, 248-254
- **Cardelle-Coba, A., Soria, A. C., & Villamiel, M.** (2010). comprehensive survey of garliac fractionalily. In G. k. M-pacurar (Ed.), *garliac consumption and heath* NOVA science
- **Cathro, P., Mccarthy, P., Hoffmann, P., & Zilm, P.** (2016). Isolation and identification of enterococcus faecalis membrane proteins using membrane shaving, 1d sds/page, and mass spectrometry. *Febs open bio*, 6(6), 586-593. Doi: 10.1002/2211-5463.12075
- **Cazau-Beyret, N.** (2013). *Prise en Charge des douleurs articulaires par aromatherapie et Phytotherapie* doctorat doctorat, Toulouse III Paul Sabatier. Retrieved from <http://thesesante.ups-tlse.fr/204/1/2013TOU32076.pdf>
- **Chabrier, J.-Y.** (2010). *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie*. . Doctorat doctorat Henri Poincare - Nancy 1. Retrieved from http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_T_2010_CHABRIER_JEAN_YVES.pdf

- **Chergui, A.** (2014). *Caractérisation de bactériocines anti-listeria produites par des souches lactiques isolées à partir du lait de chamelle* magister, mouloud mammeri de tizi ouzou
- **Chergui, A., Hakem, A., Meguenni, N., Iratni, G., Bouzida, S., Titouche, Y., & Houali, K.** (2016). Characterization of anti-listeria innocua. F bacteriocins produced by lactococcus lactis ssp raffinolactis isolated from algerian camel milk. *Annual research & review in biology*, 11(5), 1-9. Doi: 10.9734/arrb/2016/31767
- **Cheyrier, V.** (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought1–3. *American Society for Clinical Nutrition*, 81(1), 223S-229S.
- **Cillard, J., & Cillard, P.** (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(1), 24-29. doi: 10.1051/ocl.2006.6666
- **Clement, F., Pramod, S. N., & Venkatesh, Y. P.** (2010). Identity of the immunomodulatory proteins from garlic (*Allium sativum*) with the major garlic lectins or agglutinins. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Int Immunopharmacol*, 10(3), 316-324. doi: 10.1016/j.intimp.2009.12.002
- **Clement, F., Pramod, S. N., & Venkatesh, Y. P.** (2010). Identity of the immunomodulatory proteins from garlic (*allium sativum*) with the major garlic lectins or agglutinins. [research support, non-u.s. gov't]. *Int immunopharmacol*, 10(3), 316-324. Doi: 10.1016/j.intimp.2009.12.002
- **Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., & Slusarenko, A. J.** (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 79-89. doi: 10.1016/j.pmpp.2004.11.006
- **Dai, J., & Mumper, R. J.** (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. [Review]. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. doi: 10.3390/molecules15107313
- **Darine , S.** (2010). *Étude de l'extraction des protéines de coproduits d'abattage et de Leur valorisation comme ingrédients fonctionnels*. Docteur blaise pascal. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00719205/document>
- **Desire, A.** (2011). *Extrusion-sphéronisation de produits pharmaceutiques : Comparaison et transposition a echelle industrielle de Procédes d'extrusion par plans d'expériences*. Doctorat paris-sud 11. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00685210/document>

- **Dethier, B.** (2010). *Contribution a l'étude de la synthèse de l'alliine de L'ail*. master, Liège. Retrieved from file:///C:/Users/Devil/Downloads/TFE%20B%20DETHIER.pdf
- Donald , V., Judith , G. V., & Lionel, D. (2016). Biochimie I.-I.-n. D. B. Supérieur (ed.) (pp. 1800).
- **Dorhoi , A., Dobrean , V., Zăhan , M., & Virag , P.** (2006). Modulatory effects of several herbal extracts on avian peripheral blood cell immune responses. *Phytother Res*, 20(5), 352-358.
- **Ebrahimzadeh, M., Nabavi, S., & Eslami, B.** (2010). Antihemolytic and antioxidant activities of allium paradoxum. *Open life sciences*, 5(3). Doi: 10.2478/s11535-010-0013-5
- **Eftekhari, Z., Bahmani, M., Mohsenzadeghan, A., Gholami Ahangaran, M., Abbasi, J., & Alighazi, N.** (2011). Evaluating the anti-leech (*Limnatis nilotica*) activity of methanolic extract of *Allium sativum* L. compared with levamisole and metronidazole. *Comparative Clinical Pathology*, 21(6), 1219-1222. doi: 10.1007/s00580-011-1268-6
- **El Amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., & Alaoui, T. I.** (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 82(1), 7481. doi: 10.4314/jab.v82i1.16
- **El Ichi, S., Abdelghani, A., Hadji, I., Helali, S., Limam, F., & Marzouki, M. N.** (2008). A new peroxidase from garlic (*Allium sativum*) bulb: its use in H₂O₂ biosensing. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biotechnol Appl Biochem*, 51(Pt 1), 33-41. doi: 10.1042/BA20070141
- **ET TAOUIL, A.** (2011). *Effets des ultrasons haute fréquence sur l'électrosynthèse des polymères conducteurs*. Docteur franche-comté.
- **Eyo , J., Ozougwu , J., & Echi , P.** (2011). Hypoglycaemic effects of *Allium Cepa*, *Allium Sativum* and *Zingiber officinale* aqueous extracts on alloxan-induced diabetic rattus norvegicus. . *Islamic World Academy Of Sciences*, 19(3), 121-126.
- **Fadi , Z.** (2011). *Le Romarin Rosmarinus Officinalis Le Bon Procédé D'extraction Pour Un Effet Thérapeutique Optimal* doctorat doctorat Mohammed V, RABAT. Retrieved from <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/1901/P0342011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- **Fekih , N.** (2015). *Proprietes Chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois especes du genre pinus poussant en Algerie*. Doctorat, Abou Bekr Belkaid. Retrieved from <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/7317/1/PROPRIETES-CHIMIQUES.pdf>
- **Gallouin , F., & Arvy , M.-P.** (2015). *Épices, Aromates Et Condiments* (Amazon Media EU S.à r.l. ed.).
- **Ganière, J.-P., Mangion, C., & Péridy, M.** (2004). Détermination des concentrations minimales Inhibitrices et bactéricides de la cefquinome, La marbofloxacine, la tylosine et la spiramycine En solution dans du lait vis-à-vis de bactéries Isolées de mammites bovines. *Méd. Vé.* 155, 411-416
- **Ghasemi, M.** (2007). *Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma*. doctorat, PARIS VI.
- **Ghesquiere , C.** (2016). *Les bienfaits de l'ail dans les maladies cardiovasculaires*. doctorat Picardie jules verne. Retrieved from <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01443858/document>
- **Goupy, J., & Creighton, L.** (2005). Introduction Aux plans D'expériences dunod (ed.) (pp. 336).
- **Groppo, F., Ramacciato, J., Motta, R., Ferraresi, P., & Sartoratto, A.** (2007). Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. *International journal of dental hygiene*, 5(2), 109-115.
- **Guiet, A.** (2011). *L'apport de marrubium Valgare L dans la Prévention du risque cardiovasculaire* doctorat, NANTES. Retrieved from file:///C:/Users/Devil/Downloads/guierPH11%20(3).pdf
- **Gull, I., Saeed, M., Shaukat, H., M Aslam, S., Qadir Samra , Z., & M Athar, A.** (2012). Inhibitory effect of Allium sativum and Zingiber officinale extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Gull et al. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(8), 1-6.
- **Hadji, I., Marzouki, M. N., Ferraro, D., Fasano, E., Majdoub, H., Pani, G., & Limam, F.** (2007). Purification and Characterization of a Cu,Zn-SOD from Garlic (Allium sativum L.). Antioxidant Effect on Tumoral Cell Lines. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 143(2), 129-141. doi: 10.1007/s12010-007-0042-3
- **Haleng, J., Pincemail , J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P.** (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62 (10), 628-638.

- **Halmi, M. I. E., Sakeh, N. S. M., Masdor, N. A., Baskaran, G., Wasoh, H., Syed, M. A., . . . Shukor, M. Y.** (2014). The Application of Plant Proteases from Garlic (*Allium sativum*) in the Biomonitoring of Heavy Metals in the Environment *ASIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY*, 2(3), 53-59.
- **HAMMOUDI, R.** (2015). *Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien*. Doctorat, KASDI MERBAH - OUARGLA. Retrieved from <https://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/bitstream/123456789/8978/1/HAMMOUDI-Roukia-Doctorat.pdf>
- **Iwalokun, B. A., Ogunledun, A., Ogbolu, D. O., Bamiro, S. B., & Jimi-Omojola, J.** (2004). In Vitro Antimicrobial Properties of Aqueous Garlic Extract Against Multidrug-Resistant Bacteria and Candida Species from Nigeria. *MEDICINAL FOOD*, 7 (3), 327–333.
- **Jehl, F., Chabaud, A., & Grillon, A.** (2015). L'antibiogramme : diamètres ou cmi ? *Journal des anti-infectieux*, 17(4), 125-139. Doi: 10.1016/j.antinf.2015.08.003
- **JUNG, S.** (2005). *Apport des drogues végétales dans la prévention des maladies cardiovasculaires liées à l'HYPERCHOLESTEROLEMIE*. docteur, HENRI POINCARÉ - NANCY 1.
- **JUNGMIN, L., JAMES, M., & HARNL, Y.** (2005). Free Amino Acid and Cysteine Sulfoxide Composition Of 11 Garlic (*Allium Sativum* L) Cultivars By Gas Chromatography With Flame Ionization And Mass Selective Detection. *Agricultural And Food Chemistry (J. Agric. Food Chem)*, 53, 9100-9104
- **Kahlouche-riachi, F.** (2014). *Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie*. doctorat, Constantine 1. Retrieved from <https://bu.umc.edu.dz/theses/veterinaire/KAH6514.pdf>
- **Kamanna, V., & Chandrasekhara, N.** (1982). Effect of garlic (*Allium sativum* Linn) on serum lipoproteins and lipoprotein cholesterol levels in albino rats rendered hypercholesteremic by feeding cholesterol. *Discipline of Biochemistry And Applied Nutrition, Central Food Technological Research Institute, Mysore*, 17(7), 483-488.
- **Khatoun, H., Talat, S., & Younus, H.** (2008). Phospholipase D from *Allium sativum* bulbs: A highly active and thermal stable enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(4), 380-385. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.01.007
- **Kimbaris, A. C., Siatis, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., & Polissiou, M. G.** (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction

methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*allium sativum*). [comparative study]. *Ultrason sonochem*, 13(1), 54-60. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2004.12.003

- **KRID, A.** (2008). *Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant.* . magister MENTOURI DE CONSTANTINE.
- **Krief, S.** (2003). *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en ouganda activités biologiques et étude chimique de plantes consommées.* muséum national d'histoire naturelle paris. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00006170/document>
- **Kundra, A.** (2015). *Department of Biotechnology and Medical Engineering National Institute of Technology, Rourkela.* Rourkela.
- **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227.
- **LAUGIER, F.** (2007). *Les ultrasons en procédés polyphasiques:Transfert gaz-liquide et réaction liquide-liquide.* Doctorat, institut national polytechnique de toulouse
- **Laurent herber , M.** (2008). *Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis** doctorat CAEN/BASSE-NORMANDIE Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00787051/document>
- **Laurent herber , M.** (2008). *Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis** doctorat CAEN/BASSE-NORMANDIE Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00787051/document>
- **Maamri S.** (2018). *Etude de *Pistacia Atlantica* des deux region de sud algérien : dosage des lipides,dosage des polyphenols,essais antileishmaniens.* Magister, M'HEMED Bougera.
- **Majewski , M.** (2014). *Allium sativum: facts and myths regarding human health.* *Rocz Panstw Zakl Hig.* , 65.(1), 1-8.
- **Medjdoub , H.** (2013). *Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de *Zygophyllum geslini* Coss.* . doctorat, ABOU BEKR BELKAID. Retrieved from <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/2246/1/These-MEDJDOUB.pdf>
- **Medjekane, M.** (/2017). *Prévalence de l'infection a *Helicobacter pylori* et son inhibition par des molécules bioactives* doctorat Hassiba Benbouali de Chlef. Retrieved from <file:///C:/Users/Devil/Downloads/depot%20MERIEM%20MEDJEKANE.pdf>

- **Mehani, M.** (2015). *Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Eucalyptus Camendulensis dans la région d'Ouargla.* doctorat, KASDI MERBAH. Retrieved from <https://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/bitstream/123456789/8995/1/Mehani-Mouna-Doctorat.pdf>
- **MESSAI, L.** (2011). *Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'est algerien (ARTEMISIA HERBA ALBA)* doctorat MENTOURI CONSTANTINE Retrieved from <https://bu.umc.edu.dz/theses/chimie/MES6149.pdf>
- **Mohammed, Z.** (2013). *Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud ouest de l'Algérie.* Doctorat, Abou Bakr Belkaid Tlemcen. Retrieved from <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/2393/3/These-Mohammedi-zohra-2013.pdf>
- **Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., Setzer, W. N., Nabavi, S. A., Nabavi, S. A., & Ebrahimzadeh, M. A.** (2013). Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits. *Fruits*, 68(3), 185-193.
- **Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A., & Yehudith, B.** (1975). Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *Agric. Food chem.*, 24, 1174 -1177
- **Nait achour, K.** (2012). *Etude de la composition chimique des essence de quatre espèce eucalyptus poussent dans la région de tizi ouzou.* magistère, mouloud Mammeri tizi ouzou.
- **Nesterenko, A.** (2012). *Étude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation* doctorat, Toulouse
- **Pandey, D. K., & Banik, R. M.** (2012). Optimization of extraction conditions for colchicine from *Gloriosa superba* tubers using response surface methodology. *Agricultural Technology* 8(4), 1301-1315.
- **Parisi, M. G., Moreno, S., & Fernandez, G.** (2008). Isolation and characterization of a dual function protein from *Allium sativum* bulbs which exhibits proteolytic and hemagglutinating activities. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Plant Physiol Biochem*, 46(4), 403-413. doi: 10.1016/j.plaphy.2007.11.003
- **Parisi, M., Moreno, S., & Fernández, C.** (2002). Characterization of a novel cysteine peptidase from tissue culture of garlic (*Allium sativum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(6), 608-612. doi: 10.1079/ivp2002344
- **PerccaH, e. M., Palomino, M. T., & Champi, R. G.** (2014). Antimicrobial activity of *Allium sativum* extract and chlorhexidine digluconate on clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *Endodoncia Lima-Perú*, 56, 19-24.

- **PLA , L. V.** (2000). *contribution a l'etude de l'affinite des anticorps monoclonaux par des methodes d'optique physique* doctorat nancy 1
- **Poulain, P.** (2006). *Structure et dynamique de protéines isolées : approches statistiques.* doctorat CLAUDE BERNARD - LYON I.
- **Raco, M.** (2016). *Elimination of veruses in galic (Allium sativum L) by different methodes* Brno.
- **SaÂnchez-Vioque, R., Clemente , A., Vioque, J., Bautista, J., & MillaÂn, F.** (1999). Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum L.*): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 64, 237±243.
- **Sellem, F., Brahmi, Z., Mnasser, H., Rafrafi, S., & Bouhaouala-Zahar , B.** (2017). Antimicrobial activities of coelomic fluid and body wall Extracts of the edible mediterranean sea cucumber *Holothuria tubulosa* gmelin, 1790. *Researchgate*, 58, 181-188. Doi: 10.21411/cbm.a.479839a5
- **Sendl, A.** (1995). *Allium sativum and Allium ursinum: Part 1 Chemistry, analysis, history, botany.* *Phytomedicine*, 1(4), 323-339. doi: 10.1016/s0944-7113(11)80011-5
- **Shamsi, T. N., Parveen, R., Ahmad, A., Samal, R. R., Kumar, S., & Fatima, S.** (2018). Inhibition of gut proteases and development of dengue vector, *Aedes aegypti* by *Allium sativum* protease inhibitor. *Acta Ecologica Sinica*. doi: 10.1016/j.chnaes.2018.01.002
- **Shamsi, T. N., Parveen, R., Amir, M., Baig, M. A., Qureshi, M. I., Ali, S., & Fatima, S.** (2016). *Allium sativum* Protease Inhibitor: A Novel Kunitz Trypsin Inhibitor from Garlic Is a New Comrade of the Serpin Family. *PLoS One*, 11(11), e0165572. doi: 10.1371/journal.pone.0165572
- **Si Bennasseur , A.** (2005). Référentiel pour la Conduite Technique de l'ail (*Allium sativum*). *Researchgate*, 1-9.
- **Silva .M, E., Rogez, H., & Larondelle, Y.** (2007). *Optimization of extraction of phenolics from Inga edulis leaves using response surface methodology* (Vol. 55).
- **Silva, R. D. S., & Souza, C. R. B. D.** (2009). Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum* *ACTA AMAZONICA* 39(2), 255 - 260.
- **Simard, C., Dupont, Y., & Boulet, M.** (1979). Etude de la Dépolymérisation de Fractions des Protéines de Soja, de Féverole et de Colza. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 12(2), 66-71. doi: 10.1016/s0315-5463(79)73058-6

- **Singh , G., & Chaturvedi, G. N.** (2015). Original Research Experimental Study on Anticoagulant and Fibrinolysis Activities of Garlic (*Allium sativum*). *Journal of Ayurveda Physicians & Surgeons (JAPS)*, 2(4), 85-88.
- **Singh, D. K., & Singh, V. K.** (2008). Pharmacological Effects of Garlic (*Allium sativum* L.). *Annual Review of Biomedical Sciences*, 10(0). doi: 10.5016/1806-8774.2008.v10p6
- **Smeets, K., Damme, E. J. M. V., Leuven, F. V., & Peumans, W. J.** (1997). Isolation and characterization of lectins and lectin-alliinase complexes from bulbs of garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*). *Glycoconjugate*, 14, 331—343.
- **Srinivasan, R., & Rose, G. D.** (1999). A physical basis for protein secondary structure. *PNAS*, 96 (25), 14258-14263.
- **Tchemychev, B., Rabinkov, A., Mirelman , D., & Wilchek , M.** (1995). Natural antibodies to dietary proteins: the existence of natural antibodies to alliinase (Alliin lyase) and mannose-specific lectin from garlic (*Allium sativum*) in human serum. *Immunology Letters*, 47, 53-57
- **Trudel, R.** (2005). Protéine de l’ail, *Allium sativum*, au service de la lutte contre des insectes piqueurs-suceurs (Homoptera). *Phytoprotection*, 86(2), 87. doi: 10.7202/012508ar
- **Van Der Zee, J., Dubbelman , T. M. A. R., & van Steveninck, J.** (1985). Peroxide-induced membrane damage in human erythrocytes *Biochimica et BiophysicaActa*, 818 38-44.
- **Vermerris, W., & Nicholson, R.** (2006). *Phenolic Compound Biochemistry* Springer.
- **VIEU , G.** (2014). *Diversité génétique des isolats de Staphylococcus aureus producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Etude de 37 cas de patients à l’hôpital des enfants.* doctorat TOULOUSE III – PAUL SABATIER Retrieved from <http://thesesante.ups-tlse.fr/556/1/2014TOU32073.pdf>
- **Vilmorin , A.** (1855). *Description Des Plantes Potagères.* paris Librairie Agricole.
- **Visioli, F., Borsani , L., & Galli , C.** (2000). Diet And Prevention Of Coronary Heart Disease: The Potential Role Of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* 47, 419–425.
- **Waksmundzka-Hajnos , M., & Sherma , J.** (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Ience. *Chromatographic Science Series*, , 477-478.
- **Wang, J., Liu, J., Lu, J., & Cui, Z.** (2010). Isolation and purification of superoxide dismutase from garlic using two-stage ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 352(1-2), 231-238. doi: 10.1016/j.memsci.2010.02.025

- **Yasmeen, H., & Hassnain, S.** (2016). Comparative analysis of different bioactivities of *Curcuma longa*, *Nigella sativa* seeds, and *Camellia sinensis* extracted by four different methods: A green way to reduce oxidative stress. *Food Science and Biotechnology*, 25(3), 811-819. doi: 10.1007/s10068-016-0136-1
- **Yobouet , B. A.** (2016). *Contamination du lait cru et de l'attiéké vendus sur les marchés informels à Abidjan (Côte d'Ivoire) par le groupe Bacillus cereus et analyse des risques.* doctorat Nangui Abrogoua. Retrieved from <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/75995/Bassa%20thesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- **Yousufi, M. K.** (2012). To Study Antibacterial Activity of *Allium Sativum*, *Zingiber Officinale* and *Allium Cepa* by Kirby-Bauer Method. *Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 4(5), 06-08.

ANNEXES

Liste des annexes

Annexe 1 : listes du Matériel et réactifs utilisés.

1. Verrerie

- Béchers,
- Boite pétri
- Entonnoirs
- Eprouvettes de 100 ml ,50 ml, 10 ml
- Erlen-meyer.
- Fioles graduée : 100ml, 250 ml, 300ml et 1L
- Flacons en verre.
- Micropipettes : 10 μ L ,100 μ l et 1000 μ l
- Mortier
- Papier whatman N° 1
- Tubes en verre à vice

2. Réactifs et colorants

- Acide acétique
- Acide ascorbique
- Acide phosphorique à 80%
- Bleu de bromophénol
- Bleu de Coomassie G250
- Bouillon nutritif
- Eau distillée
- Ethanol pur
- Gelose nutritive semi-solide
- Gelose nutritive solide
- Glycérol
- Glycine
- HCl 1 N
- KCl
- KH_2PO_4
- Marqueur de taille SDS-PAGE SIGMA Aldreich (MW : 26600 – 180000).
- Na_2HPO_4
- NaCl
- Pepsine

- Polyacrylamide 30%.
- Protogel acryl 30%
- SDS.
- Solution de sérum albumine bovine (BSA) à 0,1mg/ml.
- Sulfate d'ammonium.
- Tetraméthyl Ethylène Diamine TEMED
- Tris 0,1 M
- Trypsine.

Annexe 2 : préparation du tampon tris-HCl à 0,1 M

- Faire dissoudre 0,6 g de la poudre tris dans 50 ml de l'eau distillée.
- Ajuster le pH de la solution qui est au départ basique (PH = 10, 8) par l'addition de solution HCl à 1 N jusqu'à PH = 7, 4.

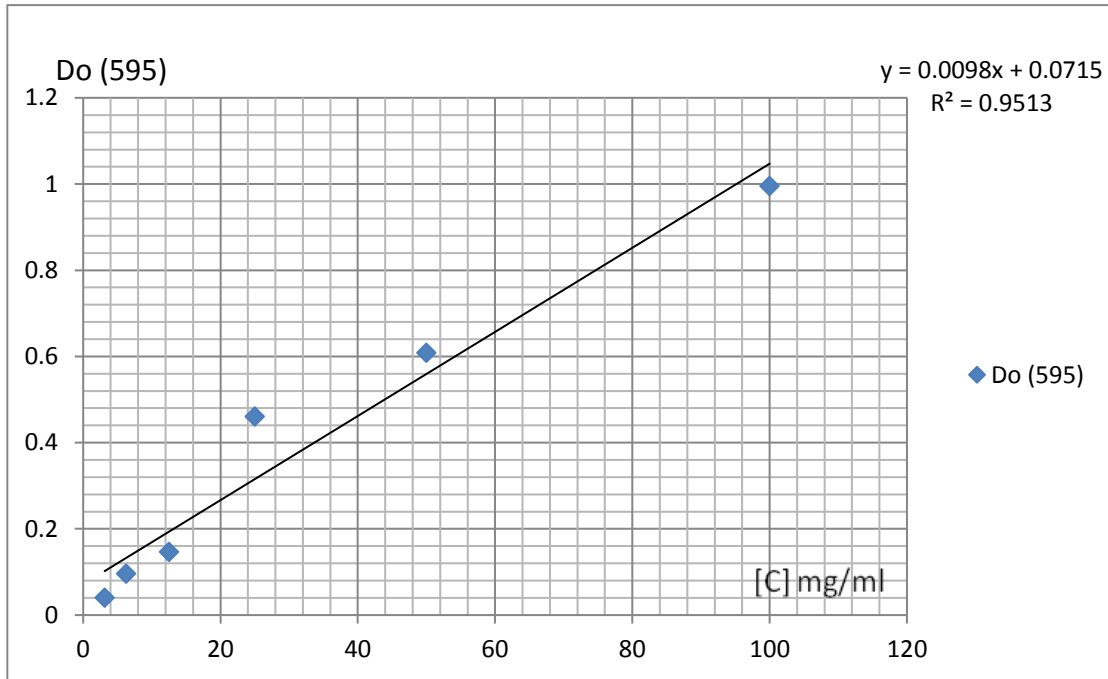
Annexe 3 : Préparation du réactif de Bradford (200 ml)

- Faire dissoudre 0,02 g de bleu de coomassie G 250 dans 10 ml de l'éthanol à 95 % (l'obtention d'éthanol à 95 % est effectuée par l'ajout de 2,03 ml de l'eau distillée à 9,6 d'éthanol pur).
- Ajouter 20 ml de l'acide phosphorique à 85 %.
- Compléter par l'eau distillée jusqu'à 200 ml.

Annexe 4 : courbe d'étalonnage à base de BSA

- Faire dissoudre 0,2 g de BSA dans 2 ml de l'eau distillée.
- Réalisation d'une série de dilutions (tableau ci-dessous).

Tubes	Absorbances	[C] en mg/ml
1	0,998	100
2	0,789	50
3	0,645	25
4	0,522	12,5
5	0,495	6,25
6	0,391	3,125



Courbe d'étalonnage à base de BSA

Annexe 5 : Les tampons d'électrophorèse PAGE-SDS.

- **Tampon de migration 5X + SDS**

-Tris	15g.
-Glycine	72g.
-SDS	6g
-Eau distillée	1L.

- **Solution de Bleu de Bromophénol (Tampon d'échantillon)**

-Bleu de bromophénol	2mg
-Glycérol 50%	10g.
-Tris/HCl 0,5M pH6, 8	1, 25ml.
-SDS 20%	4ml.
-Eau distillée.	10ml

- **Gel Buffer (tampon de gel 3X)**

-Tris-base 3M pH 8,45.

-SDS 0,3%

-Dans un volume total de 20ml.

- **Composition des gels**

Compositions	Gel de séparation (12%)	Gel de concentration (4%)
Protogel acryl 30%	2,75ml	0,80 ml
Eau distillée	/	2,17ml
Gel Buffer 3X	1,67ml	0,99ml
Glycérol 80%	0,83ml	/
TEMED	2,5µl	3,0 µl
Ammonium persulfate (APS) 10%.	25 µl	32 µl

- **Solution de fixation et de décoloration :**

Acide acétique	5%.
Éthanol.	40%
Eau distillée	100%

- **Solution de coloration :**

Bleu de Coomassie R 250	0,5g.
Acide acétique.	50ml.
Éthanol	100ml
H2O	100ml

- **Fabrication des gels de polyacrylamide**

Le gel de polyacrylamide a été préparé à une concentration de 30% d'acrylamide. Le gel de séparation de 12%, a été préparé en premier suivant l'annexe 5, est coulé dans l'espace entre les deux plaques de verre. Une fois la polymérisation à lieu, une couche du gel de concentration de 4% a été rajoutée, le peigne est placé pour former les puits. Ce dernier est retiré délicatement une fois la polymérisation terminée.

Annexe 6 : Solutions enzymatiques

- *Trypsine*

Tampon phosphate (ou tris) 0,1M pH6,0

20mg de trypsine dans 10ml du tampon.

Filtrer avec microfiltre de 0,22 μ et conserver à 4°C.

- *Pepsine*

Tampon HCl 0,02M pH2.

20mg de pepsine à dissoudre dans 10ml du tampon.

Filtrer et garder à 4°C.

- *Solution HCl 0,02M pH2* : 110 μ l de HCl concentré (32%).Ajuster à 50ml par de l'eau distillée. Le pH sera à 2.

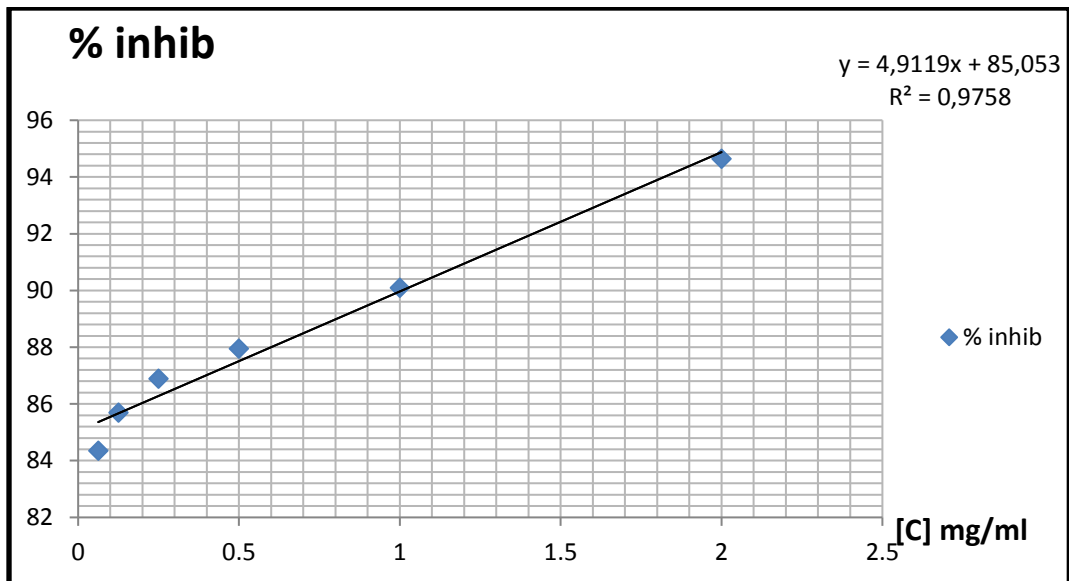
Annexe 7 : Tampon PBS

- 8 g de NaCl
- 0,2 g de KCl
- 1,44 g de Na₂HPO₄
- Faire dissoudre dans 800 ml de l'eau distillée
- Ajuster le pH à 7,4 par HCl à 1 N
- Compléter par l'eau distillée jusqu'à 1000 ml

Annexe 8 : la courbe de l'acide ascorbique

- Faire dissoudre 4 mg de l'acide ascorbique dans 2 ml PBS.
- Réalisation d'une série de dilutions (tableau ci-dessous).

[c] mg/ml	% inhibition d'hémolyse
2	94,65
1	90,1
0,5	87,96
0,25	86,89
0,125	85,7
0,0625	84,36



Courbe de l'acide ascorbique