

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA  
TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option: Biologie Moléculaire des Procaryotes

---

**Thème : L'effet antibactérien de l'ail (*Allium sativum*)**

---

Présenté par :

Dafer Ouahida  
Messaadia Imane

Membre de jury :

Président : Mlle. Grara N (MCA)

Examineur : Mlle. Boumaza A (MAA)

Encadreurs : Mme. Ayad Hayat (MAA)

**Juin 2013**

## Résumé :

Le regain d'intérêt aux plantes médicinales pour extraire les principes actifs qui s'accroît d'un jour à l'autre, laisse le chercheur des traitements naturels l'utilisation des plantes comme un remède efficace contre certaines maladies. Ces plantes médicinales sont devenues avec l'évolution de la science les extraits de base pour le traitement de nombreuses pathologies comme les maladies infectieuses. C'est ainsi qu'une étude de l'activité antibactérienne de plante alimentaire et médicinale: l'ail.

Le test de sensibilité par la méthode de diffusion en milieu gélose, a amené à comprendre l'effet antibactérien de l'extrait brut de cette plante par rapport à certaines souches.

**Mots clés :** Ail - Extrait brut - Activité antibactérienne.

## Abstract :

The renewal of interest to medicinal plants, in order to extract active principles which increase day after day, let the researcher of natural treatments utilisation of the plants as an effective cure of certain diseases. These medicinal plants became with the evolution of science the basic way for the treatment of several diseases even the infectious illness.

Thus, a study of the evaluation of antibacterial activity of nutritional and medicinal plant: garlic.

The sensitivity test by the method of discs diffusion essay in nutrient medium agar, brought to understand the antibacterial effect of crude extract of this plant in relation to some bacteria.

**Key words :** Garlic- Crude extract - Antibacterial activity.

## : الملخص

إن الرجوع للاستفادة من النباتات الطبية, من أجل استخلاص المواد الفعالة, الذي يتزايد من يوم إلى آخر, سمح للباحث عن العلاجات الطبيعية, استعمال الأعشاب في علاج الأمراض. ومع تطور العلوم هذه الأعشاب أصبحت مصدر رئيسي في علاج العديد من الأمراض, وخاصة المعدية منها

ولهذا فقد تمت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا لنبتة غذائية وطبية و هي :الثوم

. اختبار الحساسية بطريقة الانتشار في وسط صلب ( أغار). مكن من فهم نسبي للفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص خام لهذه النبتة

**الكلمات المفتاحية :** الثوم – المستخلص الخام – التأثير المضاد للبكتيريا

## Dédicace

Mon père qui ma toujours bien toujours traité  
comme responsable, et ma très chère mère que  
dieu me garde son grand cœur.

A mes frères: Ahmed, Mohamed, Walid.

A mes sœurs :Sabrina, Habiba.

A mes amis : Saliha, Yamina, Khadra, Boutaina,  
Sara, Ratiba, Gania.

*A tous ceux qui ont contribué de près ou loin à la  
réalisation de se modeste travail.*

*Imen*

# Dédicace

## AU NOM D'ALLAH LE TOUT PUISSANT LE MISERICORDIEUX A SON PROPHETE MOUHAMED (Paix et salut sur lui)

Je dédie ce travail à :

### **Mes parents**

Monsieur Abd-Elhak Dafer et Madame Fatiha Boudaroua

Vous m'avez donné le jour et vous m'avez accompagné dans mes premiers pas. Aujourd'hui, je suis le fruit de vos efforts et de toute votre attention. Soyez infiniment remerciés. Sachez que je vous aime profondément et que je vous suis reconnaissante. Que le Seigneur Dieu vous donne longue vie et bonne santé.

**Mon cher mari** Fouzi Mellouki que j'adore pour tout ce qui m'apporte. Je n'oublierai jamais votre présence spontanée à mes côtés dans les moments difficiles de ce travail. Merci d'être toi... Que Dieu vous donne longue vie et bonne santé.

**Mes sœurs** : Rafika, Moufida, Intissar, Amina, Khaoula, que Dieu vous donne longue vie et bonne santé.

**Mes neveux et nièces les petites** : Wissal, Hadil, Racha, Mouhamed, Maria. Je vous aime tous. Et que le Dieu vous garde.

**A la mémoire de ma grand-mère** : Rbiha Ras-elkaf

Les mots me manquent pour t'exprimer toute ma reconnaissance. Je n'oublierai jamais tes conseils, tes bénédictions, et tes privations. Ce travail t'est dédié en témoignage de mon profond respect pour ton âme et en reconnaissance de ton affection. Dors en paix Grand-mère et que le Tout Puissant t'accepte dans son paradis.

**Mes grands parents** : Abd-Arrahmen, Boumandjel (Paix aux âmes des disparus et que Dieu vous accueille dans son paradis.)

**Mes Oncles, Tantes, Cousins et Cousines.**

**A tous mes collègues et Mes amies**

**A ceux, qui me sont chers, Je dédie ce travail.**

**Wahida**

# Remerciement

Louange à Dieu qui nous avons donné l'esprit, le courage pour surmonter toutes les difficultés durant cette étude ainsi que l'endurance pour terminer ce projet.

Nos remerciements vont à tous ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail, en particulier à :

A. Mlle. Grara N, Maitre de conférence classe I (Université de Guelma), d'avoir accepté de présider ce jury.

A Mlle. Boumaza A, Maitre assistante (Université de Guelma), d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Et enfin toute notre gratitude et reconnaissance vont à notre encadreur Mme. Ayad H, Maitre assistante (Université de Guelma) qui avec sa bonté et ses efforts inépuisables N'a cessé de nous orienter et de nous offrir ces conseils et son soutien.

Sans oublier toutes les personnes qui nous ont facilité la tâche Chacun au niveau de son service et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail voie le jour.

Merci à tous

## Composition des principaux milieux de culture utilisés

### ➤ Milieu liquide

#### •Eau physiologique stérile

Composition en g/l :

Chlorure de sodium (NaCl).....9g

Eau distillée.....1000ml

pH = 7

Stérilisation à 121°C/15mn.

### ➤ Milieux solides

#### •Gélose müeller Hinton (MH)

Composition en g/l :

Extrait de viande.....3g

Hydrolysate acide de caséine.....17,5g

Agar.....18g

pH = 7,4

Stérilisation à 121°C/15mn.

Après refroidissement, 5ml de l'additif Hectoen sont rajoutés au 225ml de la gélose Hectoen.

#### •Gélose nutritive (GN)

Composition en g/l :

Peptone.....10g

Extrait de viande.....3g

Extraits de levures.....3g

Chlorure de sodium.....5g

Agar.....18g

pH = 7,3±0,2

Stérilisation à 121°C/15mn.

## **Sommaire**

## SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	01
<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. <i>Allium sativum</i></b> .....	03
I.1. Position systématique.....	03
I.2. Origine et expansion.....	03
I.3. Description.....	04
I.4. Composition chimique.....	04
I.5. Propriétés pharmacologiques et emplois.....	08
<b>II. Bactériologie</b> .....	10
II.1. La découverte du monde microbien.....	10
II.2. Morphologie et Structure fine des bactéries.....	10
II.3. Définition d'antibiotique.....	13
II.4. Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	14
<b>Deuxième partie : Etude expérimentale</b>	
1. Matériel.....	16
1.1 Matériel végétal.....	16
1.2 Microorganismes utilisés.....	16
1.2.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
1.2.2- <i>Escherichia coli</i> .....	17
1.2.3- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
2. Méthodes.....	19
2.1 Etude phytochimique.....	19
2.1.1 Tests préliminaires de la composition chimique.....	19
2.1.2 Identification de l'alliine par chromatographie sur couche mince.....	20
2.2. Les tests microbiologiques.....	21
2.2.1. Tests de confirmation des souches.....	21
2.2.2. Tests biochimiques.....	22
2.3. Etude de l'activité antibactérienne.....	24
2.3.1. Obtention d'extrait brut de l'ail.....	24
2.3.2. Test de sensibilité.....	24

**Résultats et discussion**

1. Etude phytochimique.....	27
1.1. Tests préliminaires de la composition chimique.....	27
1.2. Chromatographie sur couche mince.....	27
2. Les tests microbiologiques.....	28
2.1. Coloration de Gram.....	28
2.2. Tests biochimiques.....	28
3. Test de l'activité antibactérienne.....	29
3.1. Comportement d' <i>E. Coli</i> .....	30
3.2. Comportement de <i>Ps aeruginosa</i> .....	32
3.3. Comportement de <i>S. aureus</i> .....	33
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>37</b>

**Références bibliographiques**

**Annexes**

**Résumé**

**LISTE DES ABREVIATIONS**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ARN**: Acide ribonucléique.

**ADH** : Arginine dihydrolase.

**C**: Cytosine.

**CCM** : chromatographie sur couche mince.

**DADS** : Diallyl disulfure.

**DATS** : Diallyl trisulfure.

**G** : Guanine.

**LDC** : Lysine décarboxylase.

**ODC** : Ornithine décarboxylase.

**ORL** : Oto-rhino-laryngologie.

**PDA** : Paraphénylène diamine.

**PH** : Potentiel hydrogène.

**PLP** : Les protéines de liaison à la pénicilline.

**RF** : Facteur de rétention

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
01	Position systématique	03
02	Composition chimique de l'huile essentielle de l'ail non diluée	06
03	Screening phytochimique de l' <i>Allium sativum</i>	27
04	Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram	28
05	Résultat des tests biochimiques	28
06	Résultat avec <i>E. coli</i>	30
07	Résultat avec <i>Ps. aeruginosa</i>	32
08	Résultat avec <i>S. aureus</i>	34

## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
01	<i>Allium sativum</i>	04
02	Composé principal de l'ail coupé	05
03	Constituant majeur de l'ail intact	06
04	Structure de quelques composés de l'huile essentielle de l'ail	07
05	Structure de quelques composés de l'huile macérée de l'ail	07
06	Structure d'une bactérie avec ses différents éléments: obligatoires et facultatifs	11
07	Schéma de la paroi des bactéries à gram négatif	12
08	Schéma de la paroi des bactéries à gram positif	13
09	Coagulase négatif	23
10	Coagulase positif	23
11	Ensemencement par écouvillon	25
12	Matériel utilisé pour l'ensemencement par écouvillonnage, pince, écouvillon, disques stériles, milieu de culture en boîtes de pétri	25
13	Chromatographie sur couche mince de l' <i>Allium sativum</i>	27
14	photos des témoins	29
15	Résultat de l'antibiogramme(a)et présentation graphique(b) des testes sur <i>E. coli</i>	31
16	Résultat de l'antibiogramme(a)et présentation graphique(b) des testes sur <i>Ps. Aeruginosa</i>	33
17	Résultat de l'antibiogramme(a)et présentation graphique(b) des testes sur <i>S. aureus</i>	35

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux **(1)**.

La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne. Actuellement Dans le domaine des anti-infectieux, la recherche des nouvelles substances à partir des plantes attire tous les flashes et constitue une étape substantielle dans le développement des nouveaux médicaments, car la plus part les agents anti-infectieux (tels que les antibiotiques) ne répondent pas aux besoins des patients en tant qu'un traitement efficace et éventuellement, plusieurs accidents risquent d'être à l'origine d'un état indésirable [1].

L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement des maladies infectieuses nécessite d'abord, des étapes à suivre afin de préparer ces plantes. Ces étapes concernent le choix de la plante, la partie et la méthode de la récolte ainsi que la conservation.

L'extraction des principes actifs des plantes constitue une opération très importante. Plusieurs méthodes en été décrites par les expérimentateurs, mais aucune méthode ne permet l'extraction de tous ces derniers.

L'ail est une panacée utilisée dans l'alimentation et les préparations médicinales depuis l'antiquité. Ses molécules naturelles bioactives lui confèrent plusieurs vertus thérapeutiques **(1)**.

Le travail présent concerne : étudier et évaluer le pouvoir antibactérien de l'extraits de la plante alimentaire et médicinale d'ail sur la croissance in vitro de quelques bactéries impliquées dans des déférentes pathologies : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Ce manuscrit est structuré comme suivante :

- Une synthèse bibliographique traite des différentes caractéristiques, sur la plante employée, les bactéries ainsi que les antibiotiques.
- une partie expérimentale consiste à déterminer l'étude phytochimique, des tests microbiologiques ainsi que les essais antibactériens de l'extrait brut de l'ail.
- Enfin une partie englobant les résultats obtenus, la discussion de ces résultats avec une conclusion et des perspective de recherche.

## II. Bactériologie :

L'homme vit dans un environnement peuplé d'un grand nombre de microorganismes qui sont présents dans l'air, dans le sol, dans les eaux douces, dans les eaux marines, à la surface de la peau et les muqueuses ainsi qu'au niveau du tube digestif, de l'arbre respiratoire et de l'appareil urinaire. Ces microorganismes sont constitués par les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. Ils sont soit des hôtes naturels de l'homme et donc saprophytes (flore digestive par exemple), soit ils déterminent une infection et donc pathogènes.

Le monde bactérien est très vaste et les bactéries peuplent notre environnement. Elles assurent à la surface du globe, sur le sol et dans les eaux d'innombrables fonctions; elles exercent des actions bénéfiques (ex: bactéries fertilisantes du sol), mais d'autres peuvent provoquer des infections chez les plantes, les animaux et également chez l'homme (30).

### II.1. La découverte du monde microbien:

C'est au cours du XVII<sup>e</sup> siècle qu'Antony van Leeuwenhoek révèle au monde scientifique la prodigieuse diversité des microorganismes et l'incroyable richesse des milieux naturels en protozoaires, algues, levures et bactéries. Ses observations et ses magnifiques descriptions sont d'une précision telle qu'aujourd'hui encore elles forcent l'admiration et permettent l'identification (31). Entre-temps, les médecins continuent d'attribuer les maladies à des "miasmes" ou à des causes mystiques, et ils demeurent à peu près imperméables à la notion de contagion. C'est par dizaines de milliers que se comptent les victimes de cette ignorance, fondée sur des croyances philosophiques (29). Il faut attendre pourtant le XIX<sup>e</sup> siècle et les expériences de Pasteur pour que ce monde microbien soit exploré et que les différents caractères des microorganismes inventoriés apparaissent dans leur immense variété (32).

### II.2. Morphologie et Structure fine des bactéries:

Durant de longues années, la bactérie a été considérée comme "un sac d'enzymes" car le pouvoir de résolution du microscope optique était insuffisant pour révéler les détails de structure. L'observation des bactéries, alors, permet seulement de reconnaître la forme des cellules (sphérique ou coccoïde, cylindrique ou bâtonnet, spiralée ou hélicoïdale), leurs dimensions (qui varient selon les espèces de 0.1µm à 600µm; les *Entérobactéries* 2 à 3 µm de long, certaines *Spirochaeta* entre 30 et 500 µm) et les arrangements ou les groupements qu'elles constituent entre elles (en grappe, en chaînette, en paire ou diplocoque, en

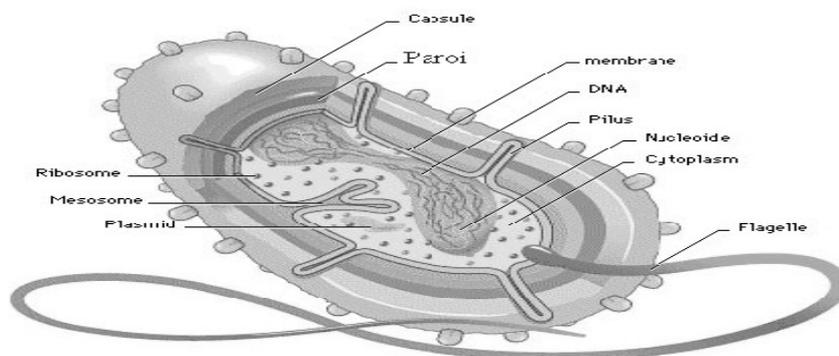
palissade ou paquet d'épingles chez les Corynébactéries...). Ce sont les caractéristiques qui définissent la morphologie bactérienne, et qui étaient les critères essentiels de reconnaissance et d'identification, et qui ont un rôle très important dans le diagnostic **(33)**.

Les caractères morphologiques sont une stratégie d'adaptation et de survie; dans l'environnement aquatique ou tellurique il existe des bactéries qui sont amorphes, ovoïdes, cubiques, étoilées, filamenteuses; elles peuvent être groupées en amas, en paires, et aussi en rosettes en réseau, en cubes, en corps fructifiants, ... **(31)**.

Pour distinguer entre les bactéries au microscope optique, une méthode importante et largement utilisée en bactériologie, c'est "*la coloration de Gram*". Elle consiste à traiter des bactéries fixées à la chaleur, par un colorant basique (violet de gentiane) puis une solution iodoiodurée (mordantage), toutes les cellules se colorent en violet. Soumises ensuite à l'action de l'alcool éthylique elles se répartissent en: cellules qui conservent la coloration violette dites à gram positif et qui sont décolorées, appelées à gram négatif. Pour mieux distinguer ces deux catégories, le frottis bactérien est finalement traité par de la fuchsine basique, les bactéries à gram négatif sont roses et celles à gram positif restent violettes **(31)**.

Après leur réaction avec les différents colorants utilisés par cette méthode, les bactéries se divisent en deux groupes majeurs: *bactéries à gram positif* (colorées en violet), *bactéries à gram négatif* (colorées en rose). Cette distinction de réponse à la coloration de gram est due à la différence qui existe dans la composition des parois bactériennes, celles des bactéries à gram négatif laissent passer la solution alcoolique, tandis que celles des bactéries à gram positif représentent une véritable barrière que la solution alcoolique ne peut franchir **(33)**.

C'est la microscopie électronique avec ses différents modes d'exploitation qui a mis en lumière l'architecture interne de la bactérie telle qu'elle est représentée ci-dessous:



**Figure 6:** Structure d'une bactérie avec ses différents éléments: obligatoires et facultatifs **(33)**

La cellule est enveloppée par une *paroi* rigide, qui lui donne sa forme et sa résistance. Epaisse chez les bactéries à gram positif et plus mince chez les bactéries à gram négatif; la paroi entoure une *membrane cytoplasmique*, plus fine et plus délicate. Les bactéries à gram négatif possèdent une seconde membrane, qui est la *membrane externe* pour la distinguer de la *membrane cytoplasmique*, dite *interne*. Le *cytoplasme* sous-jacent contient essentiellement des granulations *d'acide ribonucléique*, les *ribosomes* ainsi que des substances de réserve comme le *glycogène*. *L'appareil nucléaire* se distingue par son aspect fibrillaire, finement réticulé, et qui occupe une grande partie de l'espace cellulaire, et il n'est pas entouré d'une membrane. Il existe des structures membranaires intra-cytoplasmiques appelées *mésosomes* qui sont le plus souvent étroitement associés à *l'appareil nucléaire* (rôle de fixation). D'autres composants peuvent être présents (éléments facultatifs), comme le *glycocalyx* (polymère de surface polysaccharidique), la *capsule*, les *flagelles* (mobilité), les *fimbriae* (fixation sur d'autres cellules), les *pili sexuels* (interviennent au cours des processus de conjugaison). Enfin, certaines bactéries peuvent contenir des éléments *d'ADN circulaires* extra chromosomique ou *ADN mobile*, qui sont les *plasmides* et qui portent des informations génétiques spécifiques (exemple résistance à certains antibiotiques) (31).

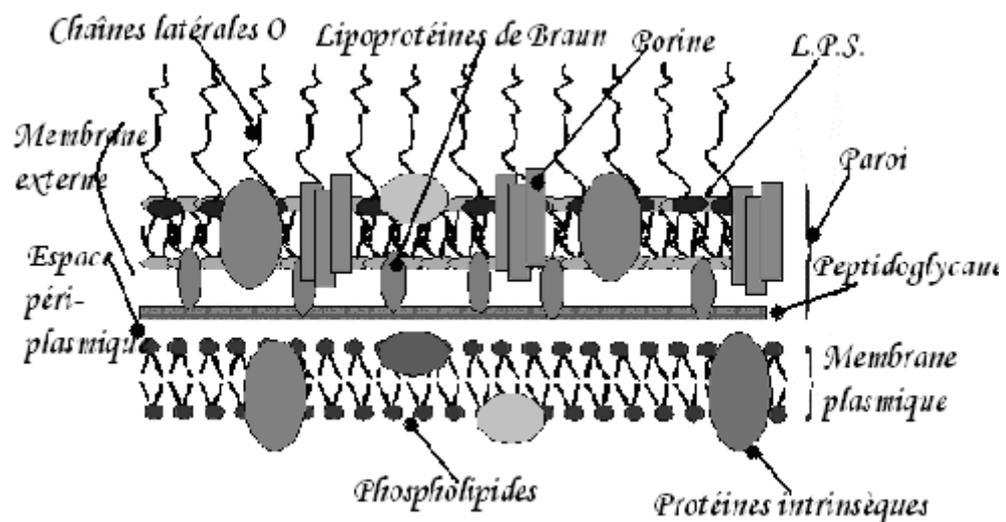
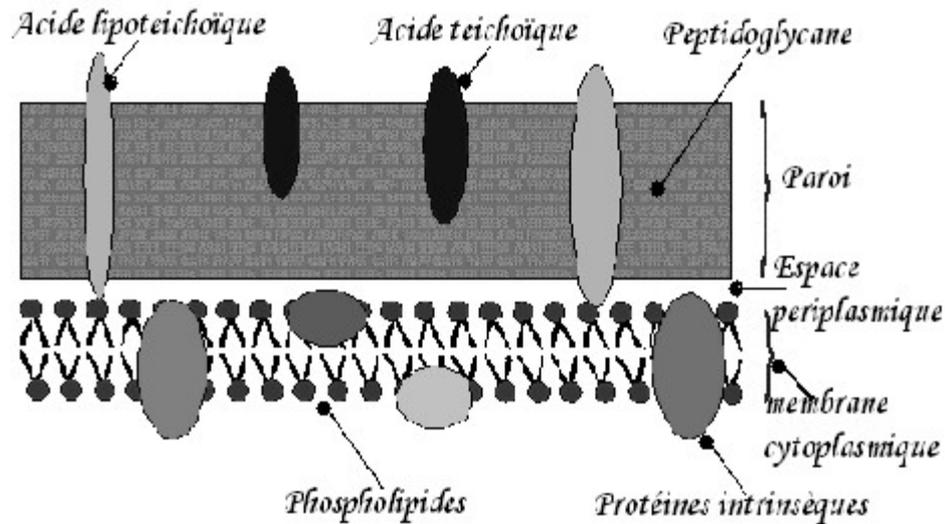


Figure 7: Schéma de la paroi des bactéries à gram négatif (31).



**Figure 8:** Schéma de la paroi des bactéries à gram positif (31).

Les différentes enveloppes bactériennes, parois et membranes, ou autres structures tels les antigènes somatiques, capsulaires, flagellaires..., représentent une architecture essentielle pour s'adapter aux situations de l'environnement, température, osmose, pH; pour se fixer sur des supports (cellules), se nourrir, coloniser et infecter; pour résister aux substances antibactériennes etc. (31).

### II.3. DEFINITION D'ANTIBIOTIQUE :

Qui s'oppose à la vie, terme créé par Waksman (34). Ce sont des substances chimiques élaborées par des microorganismes; ces substances possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance ou le développement d'autres microorganismes (bactéries) (30), dans lesquelles elles pénètrent en perturbant le métabolisme (35) ou en agissant spécifiquement sur une étape essentielle de ce dernier (34), mais qui sont dépourvus de toxicité pour les autres cellules humaines ou animales (31). Le cadre des antibiotiques était limité d'abord à des substances d'origine biologique produites par des champignons, s'est élargi plus tard et comprend actuellement d'autres produits possédant la même action antibactérienne, mais obtenus par synthèse (35).

Selon leur formule chimique, la manière dont-ils agissent sur les microorganismes et leurs effets cliniques, les antibiotiques sont groupés en dix familles (suivant les références): les bêtalactamines, les aminosides (ou oligosaccharides), les phénicol, les

tétracyclines, les polypeptides, les macrolides, les antituberculeux, les antifongiques, les antimétabolites et les antibiostatiques (31).

Le mode d'action des antibiotiques est, soit bactériostatique (empêche le développement microbien) essentiellement tétracyclines, phénicolés, macrolides; soit bactéricide (qui détruit les germes) les bêta-lactamines, les aminoglycosides, les polypeptides (30). Chaque antibiotique possède un spectre d'action, qui est la flore microbienne sur laquelle il exerce son activité bactéricide ou bactériostatique, il est d'autant plus large, ou étendu, que le nombre des espèces microbiennes sensibles est grand. Le spectre d'action varie d'un antibiotique à l'autre (35).

#### **II.4. Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques :**

Des docteurs dans un hôpital en Australie rapportèrent en 1948 que certaines bactéries semblaient être plus puissantes que la pénicilline. Une nouvelle question s'est imposée désormais: comment ces bactéries pouvaient-elles échapper à l'action destructive de la pénicilline? (36).

A la différence des antiseptiques, les antibiotiques agissent sur des cibles bactériennes précises, à des concentrations mille à dix mille fois plus faibles que les antiseptiques. Chaque famille d'antibiotiques regroupe un nombre de molécules très variable, ayant une structure de base identique. Certaines molécules altèrent la structure des bactéries en inhibant la formation de leur paroi: cas des  $\beta$ -lactamines, des glycopeptides et de la fosfomycine, qui bloquent différentes étapes de la voie de synthèse du peptidoglycane; ou en désorganisant leurs membranes (cas des polymyxines). D'autres, comme les aminoglycosides, les tétracyclines, les phénicolés, les macrolides, les lincosamides et les streptogramines, qui se fixent sur le ribosome bactérien inhibant différentes étapes de la synthèse protéique. La synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN) peut aussi être perturbée par les antibiotiques: cas des sulfamides, du triméthoprime, des quinolones, des rifamycines et des nitro-imidazoles (34).

En revanche, les bactéries avaient trouvé les moyens pour résister et par conséquent, éviter l'action des antibiotiques, et se développer en présence d'une concentration en antibiotique significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce. Il faut distinguer la résistance innée ou naturelle, de la résistance acquise apparaissant chez des bactéries sensibles aux antibiotiques. Celle-ci, correspond à une adaptation des bactéries aux antibiotiques, qui est due soit à des mutations, soit à la présence de nouveaux gènes portés par des plasmides ou des transposons. La résistance par

mutation chromosomique ne concerne qu'un faible pourcentage des souches isolées en clinique; par contre la résistance d'origine plasmidique est beaucoup plus fréquente, découverte à la fin des années 50, au Japon à la suite d'une épidémie de dysenterie bacillaire (31).

Schématiquement, les mécanismes généraux qui permettent aux bactéries de résister à un antibiotique:

- Par **imperméabilité** des bactéries, aux  $\beta$ -lactamines qui concerne uniquement les bactéries à gram négatif (principalement les *Pseudomonas*) peut être due à une diminution quantitative des canaux de transport hydrophiles (porines) ou une modification de la structure de ces porines ou des LPS (lipopolysaccharide), ces altérations sont consécutives à une mutation dans le génome bactérien, et elles affectent assez souvent le passage d'autres antibiotiques, chloramphénicol, quinolones, tétracyclines: c'est une résistance croisée.

- Par **inactivation de l'antibiotique**, action enzymatique sur les  $\beta$ -lactamines par ouverture du cycle  $\beta$ -lactame, qui est le mécanisme principal de résistance des bactéries à ces antibiotiques, ce sont des  $\beta$ -lactamases. Parfois leur synthèse est augmentée en présence de  $\beta$ -lactamines, l'enzyme alors est inductible (cas de la pénicillinase de *Staphylococcus aureus*).

- Par **altération de la cible cellulaire de l'antibiotique**, ou modification de la cible sur laquelle se fixe l'antibiotique cas des  $\beta$ -lactamines se fixant sur les PLPs (protéines de liaison aux pénicillines), essentiellement observée chez les bactéries à gram positif, ou la synthèse de molécules ayant une faible affinité pour les antibiotiques. (34)

## I. *Allium sativum*

*Allium sativum* est une plante aromatique connue depuis l'antiquité. Bien que de nos jours elle soit principalement utilisée pour ses vertus culinaires, en prêtant sa saveur piquante à divers mets, on lui a attribué diverses fonctions au cours du temps. Considérée aussi bien comme sacrée, magique ou protectrice selon certains, elle a aussi été méprisée à cause de sa forte odeur. Bon nombre de propriétés pharmacologiques et thérapeutiques lui sont encore aujourd'hui attribuées. Il est intéressant de revenir sur son histoire pour comprendre l'origine de ces croyances, mais aussi d'observer ce que la science a pu mettre en évidence (1).

### I.1. Position systématique :

Tableau 1: Position systématique (2)

Classification classique		Classification phylogénétique	
<b>Règne</b>	Plantae	<b>Ordre</b>	Asparagales
<b>Sous- Règne</b>	Tracheobionta	<b>Famille</b>	Alliaceae
<b>Division</b>	Magnoliophyta		
<b>Classe</b>	Liliopsida		
<b>Sous- Classe</b>	Liliidae		
<b>Ordre</b>	Liliales		
<b>Famille</b>	Liliaceae		
<b>Genre</b>	<i>Allium</i>		
<b>Espèce</b>	<i>sativum L</i>		

**Non scientifique :** *Allium sativum L*

**Nom commun :** Ail

**Nom arabe :** ثوم

**Parties utilisés :** Bulbes.

### I.2. Origine et expansion :

Cette plante est cultivée mondialement comme épice, dans les zones chaudes et tempérées, originaire d'Asie Centrale. Elle est surtout importé des pays méditerranés, mais aussi plus récemment de Chine. Sa culture est facile, puisque l'ail croit sur tous les sols, mais de préférence sur les terrains meubles ou même les sables, où les bulbes peuvent atteindre une grosseur considérable. Il était cultivé par les anciens Egyptiens. L'on rapporte

que les bâtisseurs des pyramides en faisaient usage pour rester en bonne santé et éviter les maladies infectieuses (3).

### I.3. Description:

*Allium sativum* est une plante vivace herbacée, de 20 à 40 cm de haut (4), il se compose d'un bulbe à nombreux caïeux (gousses) souterrains, rassemblés dans une même enveloppe. De feuilles planes linéaires (0.5 à 1.5 cm de largeur (5)) partant du bulbe, et à gaines embarrassantes.

D'une tige sortant du bulbe et se terminant en ombelle globuleuse (6), elle peut atteindre 1.2 m de haut (5). Avec des fleurs blanches ou rougeâtres entourées – avant la floraison (7) – d'une longue spathe membraneuse caduque, terminée en pointe (8).

L'odeur, faible, se développe – forte et soufrée – dès que les tissus sont lésés (8).

Parmi les "*Alliums*", il possède la plus puissante et pénétrable odeur (9).

La partie utilisée est le bulbe frais ou déshydraté, l'huile essentielle ainsi que son jus frais.



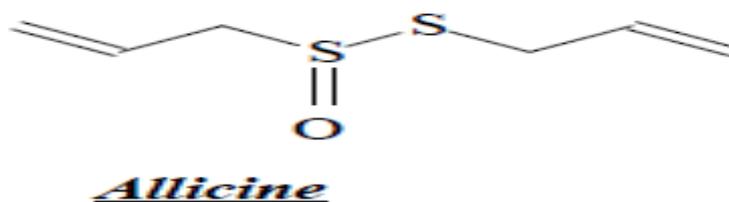
Figure 1 : *Allium sativum*

### I.4. Composition chimique:

La chimie de l'ail est tout à fait complexe (12). Les études sur cette plante ont commencé en 1844 avec Wertheim qui a extrait, examiné l'huile essentielle puis a établi le terme "*allyl*" pour le radical  $C_3H_5$  (13). Son travail a été repris, continué et corrigé par Semmler en 1892, qui a publié plus de détails sur les constituants soufrés que contient l'huile de l'ail, il a trouvé des di- et trisulfures, dont le *diallyl disulfure*, comme constituant majeur (14), à la place du *diallyl sulfure* qu'a identifié Wertheim en 1844 (11). En 1909, Rundqvist

avance une théorie (plus tard réfutée) que le précurseur des disulfures était un glucoside qu'il a nommé "*alliine*" mais n'a pas pu l'isoler sous une forme pure (14).

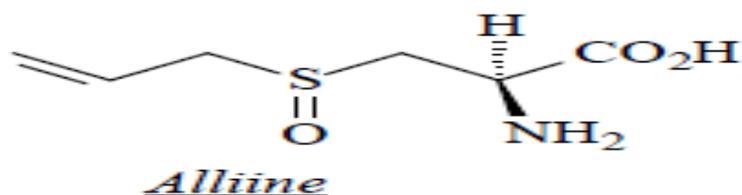
Les premiers exposés sur les propriétés physiques et la structure chimique du principal composé odorifiant et antibactérien de l'ail écrasé, étaient donnés par Cavallito et al. en 1944. Il a suggéré la structure:  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ , et a introduit le terme "*Allicine*" pour ce composant (13). D'autres investigations par Stoll et Seebeck montraient que l'allicine est formée par une réaction enzymatique d'un amino acide, appelé "*Alliine*" (13).



**Figure 2 :** Composé principal de l'ail coupé

L'ail est un végétal relativement peu hydraté : il renferme en moyenne 64 % d'eau (contre 85 à 90 % et plus dans la plupart des légumes frais). Il contient approximativement entre 0.1 à 0.36 % d'huile volatile (peut aller jusqu'à 0.2-0.5% (12)), des enzymes exp: alliinase peroxydase, des protéines 16.8% du poids sec, des minéraux (L'apport en minéraux est très diversifié, avec une dominante de potassium et de soufre, et la présence de très nombreux oligo-éléments : zinc, manganèse, bore, cuivre, nickel, iode, etc., qui interviennent dans de multiples métabolismes cellulaires. A noter la présence de sélénium, relativement rare dans les aliments, dont on connaît aujourd'hui les propriétés anti-oxydantes et l'action bénéfique contre le vieillissement cellulaire prématuré.), des vitamines: thiamine – riboflavine – niacine ..., des amino acides (5). Il renferme également des sucres: fructanes, des saponosides (hétérosides de furostanol) mais connu surtout pour ses composés soufrés.

Le constituant principal de l'ail frais non contusé est *l'alliine* ou *sulfoxyde de S-allyl-L-(+) cystéine* (8), il y a aussi le S-(E)-1-propenyl cysteine sulfoxyde et le S-methyl-cysteine sulfoxyde. Ces trois composés sont des amino acides non protéiniques du métabolisme secondaire de l'ail (11).



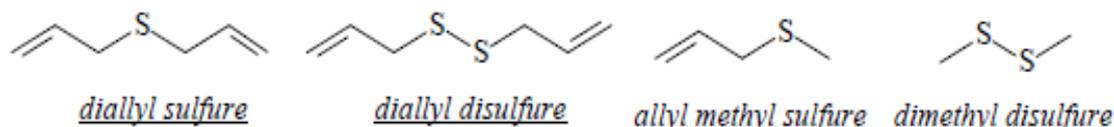
**Figure 3 :** Constituant majeur de l'ail intact

Lorsque les tissus sont coupés ou broyés, l'alliine est dégradée par l'enzyme l'alliinase (S-alkyl-L-cystéine sulfoxyde lyase), en acide pyruvique et acide 2-propènesulfénique, ce dernier étant aussitôt transformé en allicine (0.3 % de la masse fraîche) (8), qui est un diallyl thiosulfinate (9), d'autres thiosulfinate sont présents: méthane thiosulfinate, allyl méthane thiosulfinate, propyl propanethiosulfinate, et autres (11).

L'huile essentielle, qui est obtenue par entraînement à la vapeur et sous pression, contient une variété de sulfures: diallyl disulfure (DADS), diallyl trisulfure (DATS) (12). Ses caractéristiques: liquide claire, jaune pâle à rouge-orange (4), piquant, acide et odeur aromatique de l'ail (15). Les disulfures et les polysulfures sont moins volatils que les sulfures, mais possèdent une odeur plus offensive. Ils surviennent à travers des transformations secondaires provoquées par des enzymes de la plante et la chaleur de distillation (16).

**Tableau 2:** Composition chimique de l'huile essentielle de l'ail non diluée (17).

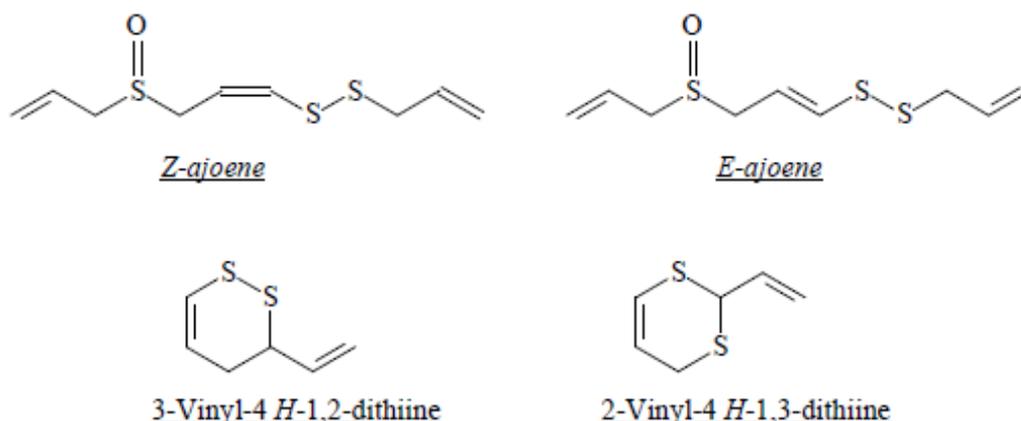
Constituants	Concentrations (mg / g)	Pourcentages (%) (
Diallyl monosulfure	106 ± 7	10.6
D.A. disulfure	530 ± 7	53.0
D.A. trisulfure	115 ± 4	11.5
D.A. tetrasulfure	43 ± 2	4.3
D.A. pentasulfure	10.5 ± 0.4	1.1
D.A. hexasulfure	0.14 ± 0.01	0.01
Méthyle allyl disulfure	44.1 ± 2	4.4
M.A. trisulfure	69.9 ± 2.2	7
M.A. tetrasulfure	24.6 ± 2.0	2.5
M.A. pentasulfure	6.3 ± 0.6	0.6
M.A. hexasulfure	1.5 ± 0.1	0.2
Diméthyl trisulfure	12.0 ± 1.3	1.2
D.M. tetrasulfure	4.3 ± 0.6	0.2
D.M. pentasulfure	2.0 ± 0.4	0.2



**Figure 4 :** Structure de quelques composés de l'huile essentielle de l'ail

Les huiles macérées issues de l'ail, sont développées pour leur usage comme condiment (12), mais trouvent aussi d'autres utilisations comme antimicrobiens (18) et comme anticancéreux (19).

Durant le processus de la fabrication de cette huile (macération de l'ail dans une huile végétale), peu d'alliine est converti en allicine. Mais puisque cette dernière est instable, et se décompose facilement, la préparation de l'huile macérée contient les constituants de la décomposition de l'allicine (20): vinylthiines, composés majeurs des préparations à l'huile de l'ail (21), ajoenes (12), diallyl disulfure (22) et différents dialk(en)yl sulfures (20), qui sont liposolubles (20).



**Figure 5:** Structure de quelques composés de l'huile macérée de l'ail.

L'apport énergétique de l'ail atteint 135 kcalories (564 kJoules) aux 100 g, mais étant donné les portions habituellement consommées - de l'ordre de quelques grammes pour une «gousse»-cela ne prête pas à conséquence.

A noter : D'autres substances ont été identifiées dans l'ail, où on les trouve à très faibles doses : des prostaglandines, des acides-phénols, des stéroïdes, des polyphénols, des flavonoïdes.

### I.5. Propriétés pharmacologiques et emplois:

C'est l'une des plantes les plus étudiées et utilisées hier et aujourd'hui. Il possède des applications traditionnelles alimentaires et médicinales **(23)**. Durant plusieurs siècles l'ail était un principal régime alimentaire, un condiment mais aussi un médicament, et dans plusieurs cultures contre le mauvais œil **(15)**.

Utilisé par les Egyptiens pour éviter les maladies **(6)**, sur le Papyrus (1500 av. J.C.) il est inscrit que l'ail était un remède contre plusieurs maladies. Dans la Grèce antique et dans l'île de Cos, où la 8e conférence internationale sur les saveurs s'est tenue, Hippocrate a recommandé plusieurs préparations à l'ail **(15)**. Les Romains l'utilisaient dans tous les potages et en distribuaient à leurs légionnaires avant chaque combat. Preuve qu'ils lui attribuaient déjà des vertus stimulantes **(10)**. Le naturaliste romain, Pline l'ancien a inscrit plusieurs usages de l'ail: pour éloigner les scorpions, désinfecter les morsures de chiens, guérir la lèpre, asthme et épilepsie **(15)**.

Dans la médecine chinoise il était utilisé contre la diarrhée, dysenterie (bactérienne ou parasitaire), tuberculose pulmonaire, hématurie (sang dans les urines), diphtérie, coqueluche, typhoïde, hépatite, trachome, teigne du cuir chevelu ... **(5)**. Les Irlandais, les Danois et les Russes utilisaient l'ail, il y a des centaines d'années pour traiter la toux et le froid **(15)**.

L'ail était considéré comme *une panacée* (remède à tous), et ce jusqu'au Moyen Age, quand les grandes épidémies de peste mirent alors ses vertus à rude épreuve. Il était utilisé comme remède sous forme de vinaigre à l'ail, ou encore avec d'autres aromates et épices pour combattre la contagion. Les gens pensaient que son odeur puissante éloignait les puces et autres parasites vecteurs de maladies **(10)**. Il était aussi utilisé pour traiter la bronchite chronique, mal de dents, douleurs d'oreille, pellicules, hypertension, artériosclérose, hystérie **(5)**.

Plusieurs de ces usages traditionnels ont été repris et vérifiés par des essais cliniques. Du fait que l'ail est riche en fructosanes jusqu'à 75% du poids sec, il est diurétique. C'est un hypotenseur dont l'effet est connu depuis longtemps chez l'homme, et a été confirmé chez l'animal. Egalement un antiathéromateux capable de faire diminuer triglycérides et cholestérol sanguins et d'augmenter le taux des HDL **(7)**. Une alimentation suffisamment riche en ail diminue l'agrégation plaquettaire et augmente l'activité fibrinolytique, d'où l'intérêt de la plante dans la prévention des thromboses **(24)**.

C'est aussi un expectorant, larvicide, insecticide **(5)**, hypoglycémiant **(7)**, antiviral **(20)**, et prévient de certains cancers **(7)**, dont plusieurs études sur le cancer de l'estomac **(25)**.

Ses propriétés antiseptiques ont été mises à profit depuis des siècles contre des maladies telles que la peste ou le choléra **(12)**. Louis Pasteur, en 1858, était le premier à avoir constaté que l'ail tue les bactéries. Durant la Première Guerre Mondiale, l'armée Britannique utilisait l'ail pour contrôler les infections. Les docteurs Russes traitaient leurs malades avec de l'ail à défaut de Pénicilline **(15)**. Ces activités antibactériennes et même antifongiques de l'ail ont été mises en évidence in vitro **(26)**.

L'huile essentielle possède les mêmes usages et propriétés que l'ail frais ou ses extraits **(27)**. Des études récentes montrent l'activité antimicrobienne de l'huile macérée de l'ail contre, des bactéries à gram positif et à gram négatif, des levures et même peut inhiber la croissance de la bactérie *Helicobacter pylori* responsable du cancer de l'estomac **(19)**.

Les composés soufrés volatils spécialement: allicine, diallyl disulfure, diallyl trisulfure, ajoènes, vinylthiines, sont généralement considérés responsables de la plupart des activités pharmacologiques **(28)**.

Enfin, il faut savoir que dès qu'il est cuit, l'ail perd une grande partie de ses propriétés médicinales et antiseptiques. Mieux vaut donc le consommer cru et finement haché **(29)**, dans certaines pathologies – pour ne pas nuire aux gens avec l'odeur forte – comme le cas de l'oignon, selon le livre de "*la Médecine du Prophète*" ou "*Tibb Ennabaoui*".

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire pédagogique de biochimie et de microbiologie, université 08 mai 1945 de Guelma.

## Matériel

### 1.1 Matériel végétal :

La plante : *Allium sativum*, utilisé dans ce travail se trouve sur le marché tout au long de l'année, pour leur importance majeure et leur usage quotidien dans la cuisine Algérienne. Elle a été achetée sous forme fraîche (bulbes). L'ail employées dans les expériences doit posséder une forte odeur lorsqu'il est coupé, pour sa richesse en constituants actifs.

### 1.2 Microorganismes utilisés :

Le choix des bactéries a été porté sur trois souches fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces constituant un problème majeur de la santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens. Il a été sélectionné deux groupes de bactéries :

Des bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*.

Des bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus*.

Les souches bactériennes d'*E. Coli*, de *Ps aeruginosa* et de *S.aureus* sont des souches hospitalières. Ces souches ont été fournies aimablement par les responsables de laboratoire de bactériologie de l'hôpital Ibn Zohr de Guelma. Elles proviennent de prélèvements pathologiques effectués sur des malades.

#### 1.2.1- *Pseudomonas aeruginosa*

- **Habita**

C'est une bactérie répandue dans la nature. Elle vit dans l'eau et sur le sol, on la trouve aussi dans l'environnement hospitalier, surtout dans les endroits humides de lavabos, savons liquides, humidificateur, solution d'antiseptiques (chlorhexidine chlorure de benzalkonium, cétrimide notamment). *Pseudomonas aeruginosa* se trouve dans le tube digestif et plus rarement dans la salive (37).

- **Caractères principaux**

Bacille Gram négatif, mobile à ciliature polaire monotriche, caractérisé par la pigmentation bleu-vert, sporule, température optimale: 30 à 43°C, pH optimal 6,5-8, aérobie strict, chimioorganotrophe, oxydase+, catalase+, gaz-, LDC-, ODC-, ADH+, gélatine+, psychrotrophe (37).

- **Pouvoir pathogène**

La bactérie peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries. Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques (38). Responsable d'infections cutanées, (impétigo, furoncles), d'infection de la sphère ORL (sinusites, otites...) et d'infection divers (39).

- **Sensibilité aux antibiotiques**

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie généralement multi-résistante, les antibiotiques pouvant avoir une bonne activité sont: la ticarcilline, la pipéracilline, l'azolocilline, la ceftazidime, la cefuslodime, le cefépime, l'imipénème et les aminosides.

Les souches résistantes à la colistine sont très rares. La ciprofloxacine est la plus active des quinolones. L'activité de tous ces antibiotiques n'est pas régulière et doit toujours être précisée par antibiogramme (37).

### 1.2.2- *Escherichia coli* (colibacille)

Bacille à gram négatif apparentant à la famille des Entérobactérie. *E. coli* se développe sur gélose ordinaire. Indole<sup>+</sup>, urée-fermente le lactose, gazogène, mais ne produit pas d'acétine

- **Habitat**

*E. coli* est un hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux.

Chez l'homme, il est présent à raison de 10<sup>8</sup> à 10<sup>10</sup> bactéries /g de selles, densité cependant très inférieure à celle des anaérobies qui constituent la flore dominante. La présence d'*E. Coli* dans l'environnement est le témoin d'une contamination fécale (38). Pouvoir pathogène.

- **Infection urinaire**

Plus fréquent chez la femme en raison de la brièveté, chez l'homme l'infection est généralement secondaire à un obstacle sur les voies urinaires.

- **Infection intestinale**

Responsable de gastro-entérites.

- **Infection néonatale**

Peut se traduire par une méningite ou une septicémie.

- **Infection diverses**

*Escherichia coli* est impliqué dans de nombreuses infections à point de départ digestif ou urinaire, suppuration localisées, il peut s'agir d'infections communautaires Ou nosocomiales.

- **Sensibilité aux antibiotiques**

La bactérie était initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques, mais l'acquisition de résistance est fréquente, surtout en milieu hospitalier (38). Cependant la résistance aux amino et aux carboxipénicillines par production de pénicillinase défasse 40 des souches, une partie de ces souches résistent à l'association amoxicilline-acide clavulinique pour les autres antibiotiques, les fréquences de résistance, sont faible à l'exception des sulfa- mides (50%), et tétracyclines (40 %) et du chloromphicol (25%) (37).

### 1.2.3- *Staphylococcus aureus*

- **Habitat**

C'est un germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol, l'air. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme.

On le trouve à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles au niveau du Périnée ou des aisselles (37).

- **Caractères principaux**

Cocci à gram positif, immobile, pigmenté à jaune, non sporulé en amas (grappes de raisin), G+C: 30-39%, température optimal à 37°C, PH optimal: 7.2-7.4, NaCl: 7.5%, Anaérobie facultatif, oxydase+, catalase+ (38).

- **Pouvoir pathogène**

Les manifestations dues à *Staphylococcus aureus* sont très nombreuses, elles sont suppurations, nécrotiques ou entériques:

- les suppurations localisées.
- Les manifestations digestives.
- le syndrome de choc toxique (37).

- **Sensibilité aux antibiotiques:**

Les souches communautaires sont généralement résistantes aux pénicillines G et A, mais sensibles aux pénicillines M. Elles sont souvent sensibles aux macrolides, aux synergistines, aux fluoroquinolones(37).

## 1. Méthodes de travail

### 2.1 Etude phytochimique de la plante

#### 2.1.1 Tests préliminaires de la composition chimique :

- **Les Alcaloïdes :**

5g de la poudre d'ail sont mélangés avec 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2% dans un récipient et après une demi heure de macération, le mélange est filtré sur un papier filtre. Au filtrat obtenu, on additionne quelques gouttes de réactif de Mayer (5g de KI + 1,358g de HgCl<sub>2</sub> solubilisés dans 100 ml d'eau distillé).

L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes (40).

- **Les Flavonoïdes :**

Macérer 10g de la poudre sèche dans 150 ml d'HCl dilué à 1% pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : prendre 10 ml du filtrat, le rendu basique par l'ajout du NH<sub>4</sub>OH.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai (41).

- **Les Tanins :**

10g de la plante sèche sont extraits par une solution hydro- alcoolique de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, puis le mélange est filtré et on ajoute au filtrat quelques gouttes d'une solution FeCl<sub>3</sub>.

L'apparition d'une couleur verte confirme la présence des tanins (42).

- **Les Saponosides :**

Dans une fiole renfermant 80 ml d'eau distillé bouillante on introduit 2g de poudre, on maintient l'ébullition modérée pendant 30 min, puis on filtre le mélange. Après refroidissement on agite le filtrat verticalement (42).

- **Les Stérols et les terpènes :**

Prendre 5g de la poudre, la dissoudre dans 210 ml d'éther de pétrole, filtrer puis évaporer ; le résidu obtenu est dissout dans 0,5 ml d'acide acétique et ensuite dans 0,5 ml de CHCl<sub>3</sub>. les deux solutions sont transférées dans un tube essai, puis on ajoute 1 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.

La formation d'un cercle marron ou violet indique la présence des stérols terpéniques (40).

### 2.1.2 Identification de l'alliine par chromatographie sur couche mince (CCM) :

**Le Support :** Gel de silice 60 F254 (séché à Lair) (Merk ; 5x10, feuille) (3).

**La Solution à examiner :**

Mélanger 1 g de la poudre d'ail avec 5 ml de méthanol, agiter environ 1 min et filtrer. Le filtrat obtenu sert de solution à examiner.

**La Solution de référence :**

Dissoudre en chauffant 5 mg d'alanine dans 5 ml de méthanol et avec quelques gouttes d'eau.

**Le Dépôts :**

20 µl de solution à examiner et 10 µl de solution de référence.

**Le Solvants d'élution :**

Ethanol- isopropanol- eau- acide acétique glacial (8 : 4 : 4 :4) (cuve saturée)

**Le Développement :** 8 cm Durée : 60 min environ

### **La Détection :**

Après évaporation complète du solvant (sous courant d'air chaud) pulvériser une solution à 0,2% de ninhydrine dans un mélange isopropanol – acide acétique (95 : 5) et chauffer pendant 5 min à 120°C.

## **2.2. Les tests microbiologiques**

### **2.2.1. Tests d'identification des souches**

Les souches qui ont été utilisées ont été déjà au préalable identifiées par le service de laboratoire de bactériologie de l'hôpital Ibn Zohr de Guelma. Nous avons tenu de vérifier leur pureté par les caractéristiques cellulaires, par quelques tests biochimiques et culturels.

Après ensemencement des bactéries sur leurs milieux sélectifs, la coloration de Gram est réalisée après incubation à 37°C pendant 24 heures.

L'étude des caractères morphologiques sont recherchés par la coloration de Gram et l'examen microscopique au grossissement 1000X. Ils permettent l'observation le mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes, et le type de Gram.

La coloration de Gram selon la méthode décrite par DELARRAS (2007) :

- préparer un frottis de la souche test ;
- recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée ;
- verser du lugol et laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée ;
- décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
- recolorer avec le fuchsine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
- sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen ;
- observation au microscope optique à l'objectif X1000 à l'immersion.

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif(+) et les bactéries colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif(-).

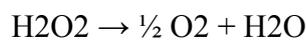
### 2.2.2. Tests biochimiques

Des tests biochimiques complémentaires ont été réalisés pour la confirmation des souches étudiées.

- **recherche de la catalase**

#### Principe

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H<sub>2</sub>O et 1/2 O<sub>2</sub>.



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la **formation de bulles [1]**.

#### Technique

- déposer sur une lame **une goutte d'eau oxygénée** (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- prélever une colonie à l'aide de l'anse
- dissocier la colonie dans la goutte **[1]**.

#### Lecture

- Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : **catalase +**
- pas de bulles : **catalase – [1]**.

- **Recherche de la coagulase :**

#### Principe :

Le principe de ce test est simple. Nous mettons en contact du [plasma](#) oxalaté, incapable de se coaguler seul, avec le germe étudié. Si le [fibrinogène](#), soluble dans le plasma, se transforme en [fibrine](#) solide, un caillot se formera au fond du tube.

Nous pouvons également réaliser ce test par une agglutination sur lame :

Sur une lame propre et sèche, nous mettons en contact une goutte de plasma sanguin oxalté avec une goutte de bouillon ensemencé par le germe étudié (ou 1 colonie). Si le germe possède le récepteur au fibrinogène, il y' aura une agglutination visible à l'œil nu [2].

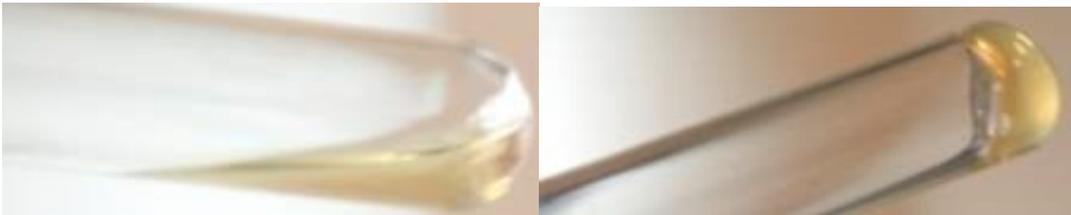
### Technique :

Dans un tube à hémolyse stérile:

- ✓ verser 0.5 ml de plasma oxalté.
- ✓ Introduire, Avec une pipette Pasteur, le germe à tester.
- ✓ Homogénéiser et incuber à 35 - 37 °C [2].

Si le test est effectué sur lame, il faut également vérifier le non autoagglutination de bouillon ou de la colonie testé [2].

#### ➤ Lecture :



**Figure 9 :** Coagulase négatif [3].

**Figure 10 :** Coagulase positif [3].

### • Recherche de l'oxydase :

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine (PDA), en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé [3].

#### ➤ Technique :

Nous utilisons le réactif de chlorhydrate ou le PDA, nous l'utilisons généralement avec des disques imprégnés de ce réactif (disques d'oxydases). Sur une lame, nous plaçons un disque imprégné du réactif, nous déposons ensuite, avec une pipette Pasteur une colonie. L'apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, signifié que la bactérie est oxydase+ et qu'elle possède le cytochrome oxydase. Et s'il n'y a rien qui apparaît ça veut

dire que la bactérie est oxydase- et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase) [4].

## 2.3. Etude de l'activité antibactérienne

### 2.3.1. Obtention d'extrait de l'ail

#### 2.3.1.1. L'extrait brut

Après avoir pelé 10 gousses d'ail soit l'équivalent de 10g, on a fait passer l'ail sous un mixeur. Puis on filtre le contenu mélangé à l'aide d'une bande gazeuse. En fin on verse notre extrait dans un flacon, le bien ferme et le conserver dans un réfrigérateur à 4C° pour éviter toute action enzymatique.

#### 2.3.2. Test de sensibilité (*L'Aromatogramme ou Méthode des Disques*):

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits de l'ail.

Ces procédés ont été réalisés suivant plusieurs références: (44), et modifiées si nécessaire selon les moyens existants.

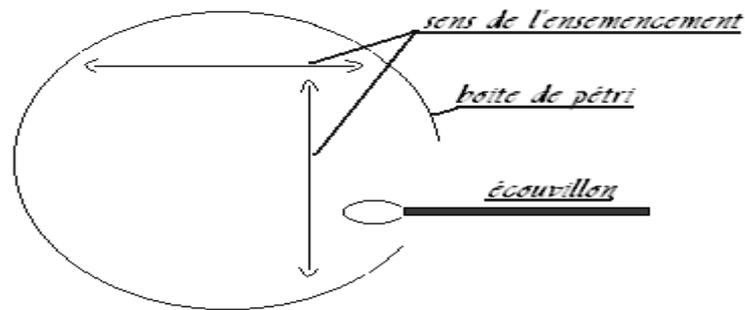
#### **L'inoculum:**

- à partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement (ayant au maximum 24h), racler à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- décharger l'anse ou la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile ;
- bien homogénéiser la suspension bactérienne,
- l'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

#### **L'ensemencement:**

- le milieu de culture utilisé est Muller – Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.
- tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse).

- frotter ou ensemercer l'écouvillon sur la totalité de la surface de MH, sèche, de haut en bas, en stries serrées.



**Figure 11:** Ensemencement par écouvillon.

### Préparation des disques

-les disques sont fabriqués à partir de papier de wattman N°01 de 6mm de diamètre, ensuite ils sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave à 120C° pendant 15minites).

- une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées, les disques imbibés par l'extrait à tester (l'extrait brut) sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. Des disques imprégnés d'eau distillée stérile seront également utilisés comme témoin négatif.



**Figure 12:** Matériel utilisé pour l'ensemencement par écouvillonnage, pince, écouvillon, disques stériles, milieu de culture en boîtes de pétri

### L'antibiogramme

Déposer dans les boites les antibiotiques suivants :

Pour *Escherichia coli*: C : chloramphénicol, FOS : Fosfomycine, CIP : Ciprofloxacine, SXT : Cotrimoxazol, NA : Acide Natidixique, PIP : Pipracycline, TBR : Tobramycine.

Pour *Staphylococcus aureus* : PIP : Pipracycline, TBR : Tobramycine, PT : Pristinomycin, RA : Rifampicine, SXT : Cotrimoxazol, FOX : Céfoxitine.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* : IPM : Imipénème, AN : Amikacine, PIP : Pipracycline, RA : Rifampicine, TBR : Tobramycine.

Les antibiotiques sont choisis en raison de leur spectre d'action assez large et de leurs utilisations fréquentes en milieu hospitalier pour le traitement des infections causées par les germes choisis dans cette étude.

**Incubation et Lecture:**

- les boîtes de pétri incubées à 37°C pendant 24 heures.
- Elle consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle l'extérieure de la boîte.

La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes purement naturelles est la préoccupation capitale de la plupart des gens et des chercheurs, actuellement.

Pour cela une évaluation de l'activité antibactérienne de la plante alimentaire et médicinale: *Allium sativum* est faite avec la méthode d'obtention d'extrait brut.

La méthode des disques ou aromatoگرامme, employée souvent dans les examens de routine (pour les antibiotiques), mais qui a donné des résultats insuffisants avec l'extrait où les diamètres des zones d'inhibition sont trop faibles (le résultat de test de sensibilité d'extrait brut avec *E. coli* donne de diamètre de zone d'inhibition faible par rapport aux diamètres d'inhibition généralement trouvées avec les antibiotiques. Et n'a aucun effet significatif, c'est-à-dire pas de zone d'inhibition avec: *Ps. aeruginos* et *S. aureus*).

Dans ces tests, plusieurs facteurs interviennent: l'instabilité des constituants actifs de l'extrait, les conditions de travail dans le laboratoire (changement des caractères des souches bactériennes). Sachant que l'environnement microbien conditionne l'activité de l'agent antibactérien, qu'il s'agisse du milieu de culture dans lequel se développe l'expérience, du tissu au niveau duquel il agit, de l'objet ou du matériel qui doit être désinfecté.

Ainsi, les méthodes *in vitro* utilisées pour confirmer l'activité antibactérienne des différents extraits sont insuffisantes et nécessitent d'autres tests supplémentaires plus avancées *in vitro* mais aussi *in vivo*. De plus, il faut des études chimiques des extraits pour pouvoir connaître leur composition chimique et comprendre leur mode d'action.

**Perspectives :**

En recommandation et pour faire obstacle à cette situation, il faut veiller à certains points dont les principaux sont :

- Déterminer les différents composants des extraits des plantes.
- Purifier le ou les principes actifs de ces plantes médicinales.
- En fin, mettre en évidence les mécanismes d'action des principes actifs des plantes.

























## **Conclusion et perspectives**

## **Synthèse bibliographique**

## 1. Etude phytochimique

### 1.1. Tests préliminaires de la composition chimique :

Les résultats du screening sont illustrés dans le tableau suivant :

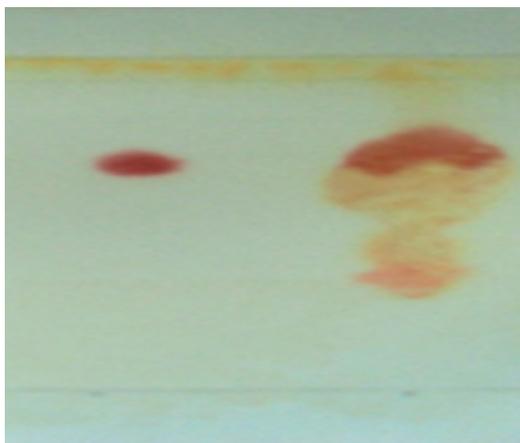
Tableau 3: Screening phytochimique de l'*Allium sativum*

Composé	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tanins	Stérols et terpènes	Saponosides
Observation	+	++	-	++	+++

(-) : absence ; (+) : présence en faible quantité ; (++) : présence en quantité moyenne ; (+++): présence en quantité importante.

Les tests de la composition chimique réalisés sur la poudre d'ail révèlent la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des stérols et triterpènes avec une prédominance des saponosides. Par contre les tanins ont été absents dans l'échantillon analysé.

### 1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM) :



1- Solution à examiner.

2- Solution de référence

Figure 13: Chromatographie sur couche mince de l'*Allium sativum*

Après révélation de la plaque CCM par le biais d'une solution ninhydrinique, le chromatogramme montre pour la solution du référence (alanine) ; une tache rouge violet avec  $RF = 0,55$  alors que la solution à examiner est caractérisée par une tache rougeâtre (l'alliine) avec  $RF = 0,52$  accompagnée d'autres zones moins intenses.

## 2. Les tests microbiologiques

### 2.1. Coloration de Gram :

Tableau 4 : Résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram

Espèces bactériennes	Milieu de culture	Gram	Aspect microscopique
<i>E. coli</i>	Gélose Hecktoen	Négatif	Coccobacille en couleur rose
<i>Ps. aeruginosa.</i>	Milieu gélose kingA et king B	Négatif	Bacilles en couleur rose
<i>S. aureus</i>	Gélose Chapman	Positif	Coccus en grappe de raisin en couleur violette

Sur le milieu Gélose Hecktoen, nous avons obtenu des bactéries Coccobacille avec une couleur rose indiquant des *E. coli*.

Sur le milieu gélose kingA et king B, nous avons obtenu des bactéries Bacilles avec une couleur rose qui sont généralement des *Ps. aeruginosa*.

Sur le milieu Gélose Chapman, nous avons obtenu des bactéries Coccus en grappe de raisin avec une couleur violette indiquant des *S. aureus*.

### 2.2. Tests biochimiques :

Tableau 5 : Résultat des tests biochimiques

Espèces bactériennes	Catalase	Coagulase	Oxydase
<i>E. coli</i>	/	/	-
<i>Ps. aeruginosa.</i>	+	/	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+

(+) : Résultat positive ; (-) : Résultat négative ; (/): Analyse non effectuée.

Le test de catalase permet de différencier des bactéries à Gam positif de la famille de *Micrococcaceae* qui son catalase positif, des familles *Streptococcaceae* et

*Enterococcaceae* qui sont catalase négatif. La catalase agit en dégradant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (eau oxygénée) en H<sub>2</sub>O et oxygène qui se manifeste par un dégagement gazeux.

Le test de coagulase est réalisé pour différencier les cocci à Gram positif et catalase positif. L'espèce *S.aureus* possède une coagulase libre, l'enzyme capable de coaguler le plasma exalté.

Le test de l'oxydase permet de distinguer les bactéries à Gram négatif, la famille des *Entérobactériaceae* à oxydase négatif, des *Pseudomonadaceae* à oxydase positif.

L'enzyme oxydase ou phényl diamine oxydase intervient dans la phosphorylation oxydative. Présence de cette enzyme chez la bactérie indique la présence de cytochrome C dans la chaîne respiratoire. Sur le disque d'oxydase imprégné de N-diméthyl paraphénylène diamine (incolore). Les bactéries qui produisent l'enzyme d'oxydase oxyde le réactif en format l'indophénol un composé violet.

### 3. Test de l'activité antibactérienne

C'est avec l'application des principes de l'antibiogramme que nous avons testé le comportement des différentes espèces bactériennes vis-à-vis d'extrait de plante et des antibiotiques qui ont fait l'objet de cette étude.



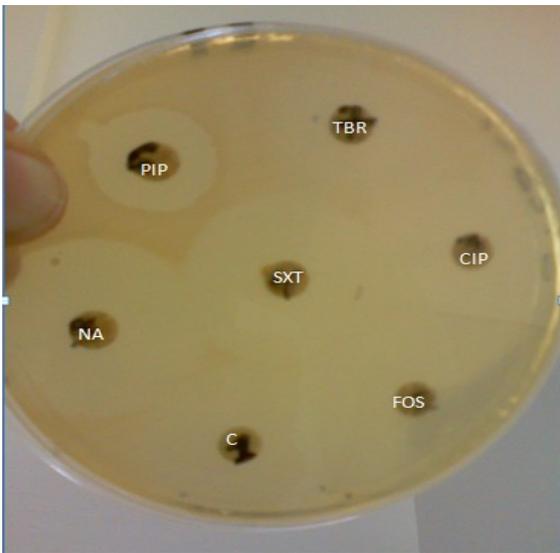
Figure 14 : photos des témoins

#### 3.1. Comportement d'*E. Coli*

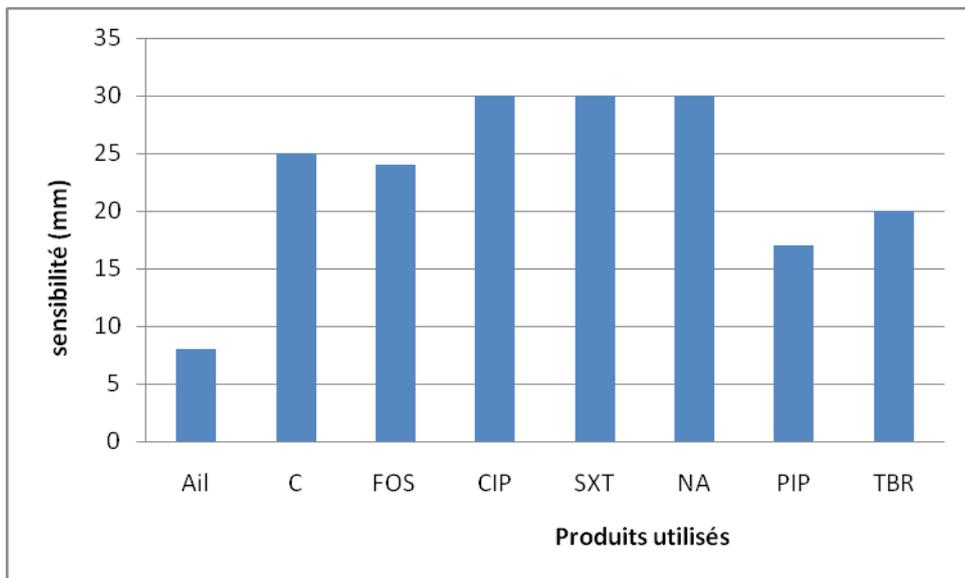
Cette bactérie souvent incriminée dans plusieurs types d'infection présente souvent une sensibilité vis-à-vis de la plus part des antibiotiques et une sensibilité vis-à-vis de l'extrait brut de l'ail (Tab5, Fig.15 : 2a et b).

**Tableau 6** : résultat avec *E. coli*

<b>L'extrait d'ail et les antibiotiques</b>	<b>Sensibilité</b>	<b>Inhibition Ø (mm)</b>
Extrait brut d'ail	Sensible	8
C : chloramphénicol	Sensible	25
FOS : Fosfomycine	Sensible	24
CIP : Ciprofloxacine	Sensible	30
SXT : Cotrimoxazol	Sensible	30
NA : Acide Natidixique	Sensible	30
PIP : Pipracycline	Sensible	17
TBR : Tobramycine	Sensible	20



(a)



(b)

**Figure 15:** Résultat de l'antibiogramme(a)et présentation graphique(b) des testes sur *E. coli*

Les résultats montrent clairement que la bactérie *E. coli* est avérée extrêmement sensible vis-à-vis de l'extrait de l'ail qui a donné une auréole d'inhibition de 8mm de diamètre.

Ces résultats sont proche des observations obtenus de Muhammad Abubakar (45), qui démontrent que l'extrait de l'ail à un pouvoir inhibiteur sur plusieurs bactéries y compris *E. coli*.

Les travaux de Cavallito (46), portant sur les effets antibactériens de certains huiles essentielle ont observés que l'ail à une activité antibactérienne importante sur de nombreuse bactéries dont *E. coli*.

Les études réalisées par Huddleson(47), Sharma (48), Abdou (49), Elnima (27), sur les activités antibactériennes et les propriétés médicinales du l'ail, montrent la sensibilité de plusieurs bactéries y compris *E. coli*, envers l'extrait de cette plante.

En ce qui concerne les antibiotiques, la totalité on un effet antibactérien contre *E. coli* avec des diamètres qui varient entre (17et30 mm).

A tire comparatif avec notre extrait, on constate que les antibiotiques donnent un effet antibactérien élevé (des diamètres des zones d'inhibition élevé) par rapport de l'extrait de l'ail (diamètre de zone d'inhibition faible).

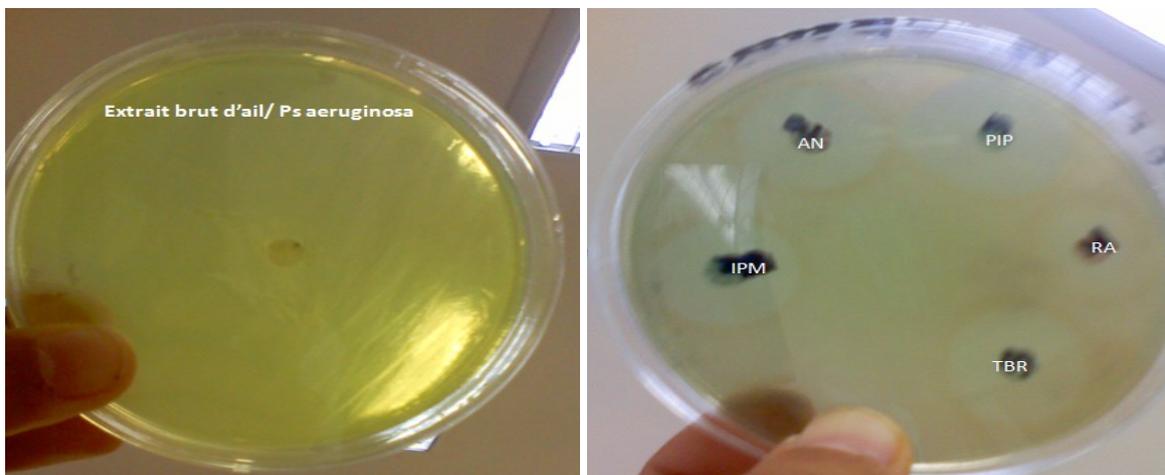
### 3.2. Comportement de *Ps. aeruginosa* :

Cette bactérie impliquée dans de nombreuses maladies nosocomiales et des infections de l'appareil respiratoire supérieur ainsi de l'oreille externe de la peau, relativement sensible a Piperacilline et la famille des Aminosite.

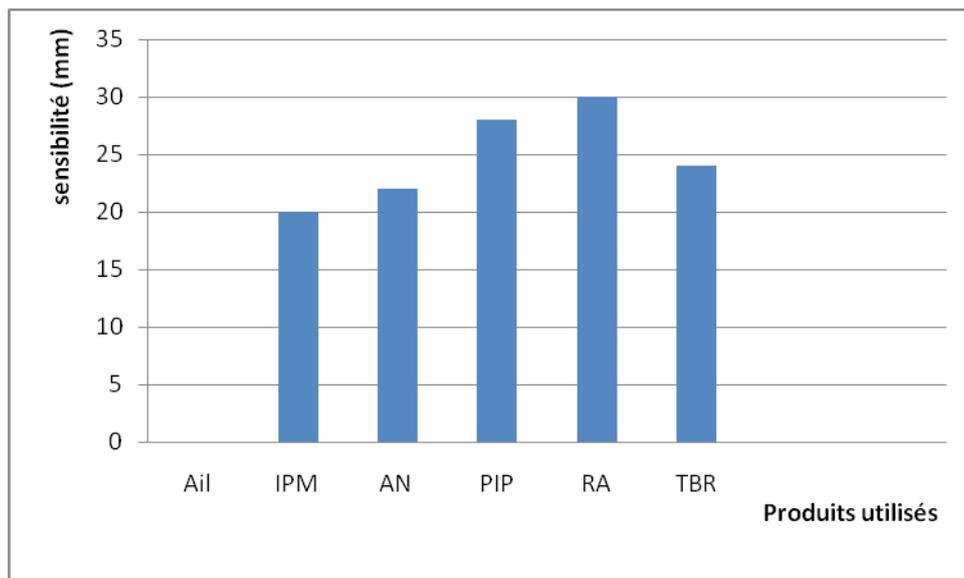
Cette bactérie a présenté une résistance a l'extrait brut de l'ail mais elle est révélée sensible vis-à-vis des antibiotiques (Tab 6, Fig.16 : 2a et b).

Tableau 7 : résultat avec *Ps aeruginosa*

L'extrait d'ail et les antibiotiques	Sensibilité	Inhibition Ø (mm)
Extrait brut d'ail	Résistante	/
IPM : Imipénème	Sensible	20
AN : Amikacine	Sensible	22
PIP : Pipracycline	Sensible	28
RA : Rifampicine	Sensible	30
TBR : Tobramycine	Sensible	24



(a)



(b)

**Figure 16:** Résultat de l'antibiogramme(a)et présentation graphique(b) des testes sur *Ps aeruginosa*

Les résultats obtenus avec cette expérience montre que l'extrait brut n'a pas un pouvoir antibactérien, c'est-à-dire pas de zone d'inhibition avec cette bactérie. Alors que la totalité des antibiotiques on un effet antibactérien contre *Ps aeruginosa* avec des diamètres qui varient entre (20et30 mm).

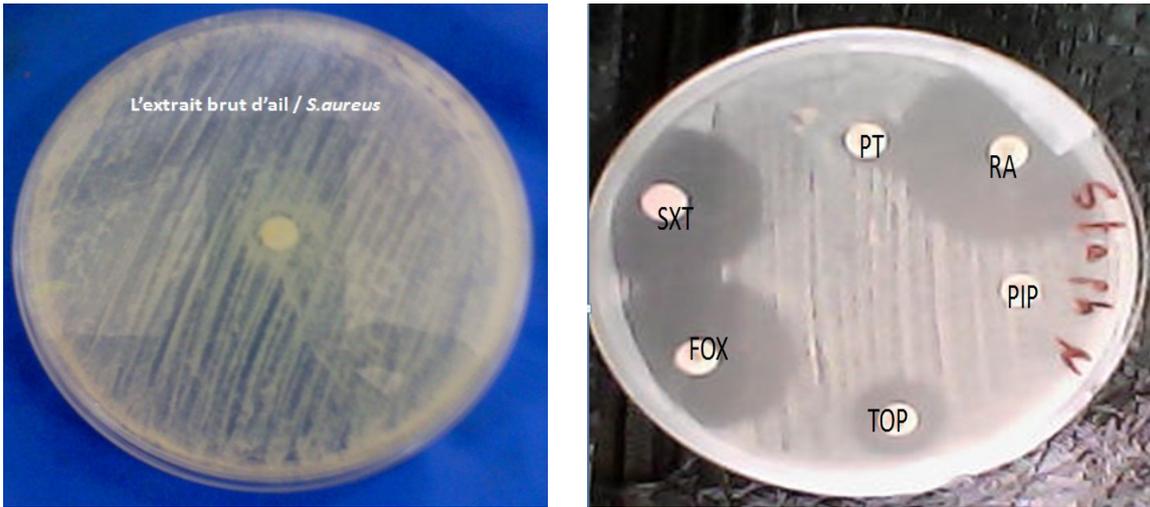
### 3.3. Comportement de *S. aureus*:

Bactérie cocci à Gram positif pathogène opportuniste de la flore normal productrices d'exotoxine se trouve impliqué dans de nombreuse pathologie, tel que les intoxications Alimentaires, infection nosocomiale et les infections générales superficielle ou profondes comme les abcès ou les endocardites, sensibles dans la plus part des cas à la méthicilline et la vancomycine.

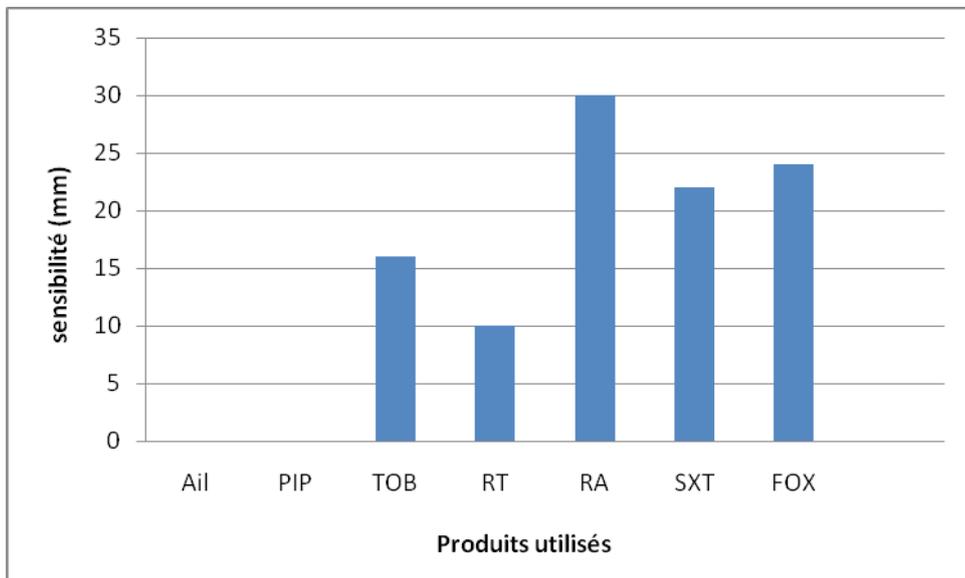
Cette bactérie a présenté une résistance a l'extrait brut de l'ail mais elle est révélée sensible vis-à-vis des antibiotiques (Tab 7, Fig.17 : 2a et b).

**Tableau 8 :** résultat avec *S. aureus*

L'extrait d'ail et les antibiotiques	Sensibilité	Inhibition Ø (mm)
Extrait brut d'ail	Résistante	/
PIP : Pipracycline	Résistante	/
TBR : Tobramycine	Sensible	16
PT : Pristinomycin	Sensible	10
RA : Rifampicine	Sensible	30
SXT : Cotrimoxazol	Sensible	22
FOX : Céfoxitine	Sensible	24



(a)



(b)

**Figure 17:** Résultat de l'antibiogramme(a)et présentation graphique(b) des testes sur *S. aureus*

Les résultats montrent clairement que l'extract de l'ail n'a pas aussi un effet visible sur la bactérie *S. aureus* à cause de leur résistance.

En ce qui concerne les antibiotiques, la totalité ont un effet antibactérien contre *S. aureus* avec des diamètres qui varient entre (10et30 mm), à l'exception de l'antibiotique Pipracycline qui n'a aucun effet sur cette bactérie.

Par la comparaison de nos résultats obtenus avec d'autres résultats des travaux réalisés par les chercheurs sur l'activité antibactérienne, on montre que les huiles essentielles de l'ail ont un effet antibactérien élevé que celle de l'extrait brut qui perd son efficacité.

La raison pour laquelle cet extrait n'a pas présenté un effet antibactérien est due probablement à l'instabilité des constituants actifs de l'ail **(31)**.

Ainsi, l'extrait brut est insuffisant pour exercer un effet antibactérien *in vitro*. Et pour prouver le pouvoir antibactérien il faut une étude supplémentaire *in vivo* **(45)**.

Les résultats obtenus jusque là d'extrait brut de l'ail, affirment que l'activité antibactérienne *in vitro*, se manifeste faiblement vis-à-vis des souches sensibles, malgré le pouvoir puissant *in vivo* (préparées traditionnellement) **(48)**.

Le pouvoir antibactérien des constituants actifs de l'ail est puissant sur plusieurs bactéries à gram négatif et intermédiaire ou faible sur les bactéries à gram positif, à cause de la différence de la composition chimique de la paroi de deux groupes bactériens. Les bactéries à gram négatif ont une paroi qui permet la pénétration des molécules lipophiles à cause de la présence des LPS (lipopolysaccharides), tandis que celles à gram positif ont une paroi constituée essentiellement de peptidoglycane qui laisse passer les molécules hydrophiles **(31)**.

L'extrait brut, malgré leur pouvoir faible *in vitro* par rapport aux huiles essentielles, ont servi autrefois pour lutter contre diverses maladies. Des tests plus approfondis concernant l'activité antibactérienne *in vivo*, et des études chimiques sont nécessaires, pour mieux comprendre cet extrait ou l'utiliser en thérapeutique **(48)**.

Enfin, aucune méthode ne permet l'extraction de tous les principes actifs. et le mode et le mécanisme d'action des molécules naturelles bioactifs des plantes ne sont pas totalement compris et les recherches se poursuivent **(47)**.



## **Résultats et discussion**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**