

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 Mai 1945 de GUELMA
FACULTE SNV STU

DEPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET GENIE DE
L'ENVIRONNEMENT



THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme de docteur en sciences

SCIENCES BIOLOGIQUES

THÈME

Etude de l'effet de la variabilité génétique de l'espèce
Allium cepa L. et *Allium sativum* L. sur la production et
l'accumulation des huiles essentielles et sur leurs effets
antibactériens

Présenté par : M^{eme} : Boukeria Sabah

Membres de jury:

Président	:	Mr. Benouareth.D.E.	(Pr)	Université de Guelma.
Encadreur	:	Mr. Yahia. A.	(Pr)	Centre universitaire de Mila.
Co -Encadreur	:	M ^{eme} .Bendjedou.D.	(Pr)	Université de Guelma.
Examineurs	:	Mr.Bouzarzour.A.	(Pr)	Université de Sétif.
		M ^{eme} .Souiki.L.	(Pr)	Université de Guelma.

Année : 2016/ 2017

Remerciements

*Tout d'abord, je remercie **Allah**, le tout puissant pour m'avoir donné la force, le courage, la santé et les moyens afin d'accomplir ce modeste travail.*

*A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue qu'elle est loin d'être un travail solitaire. Ainsi, le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt *manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate.*

*En premier lieu, je tiens à remercier mon **directeur** de thèse, monsieur **YAHIA Abdelouahab**, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Je souhaiterais exprimer ma gratitude à mon **Co- encadreur** de thèse, le Professeur **Bendjedou Dallila**, pour m'avoir donné l'envie, la confiance et la chance de réaliser cette thèse. Je le remercie aussi pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide, pour ses conseils, ses encouragements et ses participations actives aux corrections, qui m'ont permis de mener à bon escient cette étude.*

*Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail, et plus particulièrement, M^r le Professeur **Benouereth Djamel Elddin** qui m'a fait honneur d'avoir accepté de présider le jury de thèse. Je suis très reconnaissante envers M^{eme} le professeur **Linda Souiki** d'avoir accepté d'examiner ce travail, sans oublier M^r le Professeur **Bouzerzour Ahamanna**, auquel j'aimerais exprimer ma gratitude, mes sincères remerciements et mon grand respect.*

*Je voudrai ensuite exprimer toute ma gratitude à M^r le directeur de la BNG, le professeur **Mebarek Bennaceur** qui m'a donné la chance de mener ma recherche de thèse de doctorat au sein du laboratoire d'arboriculture fruitière de la Banque*

*Nationale de Gènes de Tunisie ou j'ai découvert un champ de recherche passionnant. J'aimerais encore exprimer ma gratitude et mes remerciements au D^r M^{me} **Mennasri sameh** (Co-encadreur de la partie moléculaire réalisée en Tunisie) pour le temps qu'elle a consacré à ma thèse, ses participations actives aux expérimentations et pour nos nombreuses discussions autour des questions de caractérisation moléculaire et de conservation de la biodiversité végétale.*

Les analyses, la caractérisation biochimique et l'identification des différentes molécules ainsi que l'étude du pouvoir anti bactérien ont été réalisées aux Laboratoires :

- *Lacipe groupe d'Ain Mlila,*
- *Ghouat, Contrôle de qualité et de conformité, d'Ain Mlila,*
- *Pédagogiques et de recherches du C. universitaire Boussouf Abdelhafid de MILA.*
- *Pédagogiques et de recherches de l'université de Jijel.*

À ce titre, je tiens à remercier tous les responsables de m'avoir autorisé à accéder à ces laboratoires afin de mener toutes mes recherches.

*Je tiens particulièrement à remercier les enseignants, M^r **Smara Lounis**, M^r **Kellab Rabah**, M^{me} **Kadi Kenza** pour leur aides précieuses et enfin M^r le directeur de l'ITCMI d'Om El Boughi d'avoir mis à ma disposition tous les moyens du matériel végétal permettant la réussite de mon projet de thèse.*

*Enfin je remercie particulièrement mes très **chers parents***

*Également en premier lieux mon mari **Kamal** pour sa patience, son aide, son soutien moral ..., mes **frères** et mes **sœurs** pour leurs encouragements et leur soutien permanent.*

Merci à toutes et à tous...Amis(es) et collègues

Dédicace

À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de

ma vie à tous mes enfants

Je dédie cette trace de ma vie

المخلص

في إطار حماية التنوع البيولوجي و الوراثة للبصل و الثوم با لجزائر قمنا بالتوصيف المورفولوجي، والبيوكيميائي و الجيني لثلاثة أصناف من البصل و أربعة أصناف من الثوم، مع إظهار التأثير الضد البكتيري لزيوتها الأساسية. أظهرت النتائج وجود تنوع مورفولوجي(مظهري) مهم للنوعين (البصل و الثوم).حيث أن الوصف المورفولوجي النوعي اظهر أهمية الصفات النوعية : سمك الحراشف، وشدة تماسكها بعد الجني وسمك عنق الثمرة (البصلة) في التمييز ما بين أصناف البصل، في حين أن الدراسة المورفولوجية للصفات الكمية لنبات البصل أظهرت وجود اختلاف كبير ما بين أصناف هذا النوع وذلك من حيث المردود من البصلات عدد الكيلوغرام الواحد ووزن البصلية الواحد، عدد البراعم (النقاط) الخضرية وعدد الحراشف الجافة.

كما هو الحال بالنسبة لنبات الثوم حيث كان للصفات النوعية المتمثلة في : تموضع الفصوص في الجهة العلوية للثمرات (المبة) و تماسكها وتوزعها بالإضافة إلى لون البشرة دورا هاما في التمييز بين أصناف الثوم كما أظهرت الدراسة المورفولوجية للصفات الكمية لنبات الثوم، وجود تنوع كبير يخص المردود من اللمبات (لمبة) وعددها في الكيلوغرام الواحد ووزن اللمبة الواحدة .

وفي إطار مزيد التثبيت من التنوع البيولوجي لهذه الأصناف قمنا بدراسة البصمة الجينية للنوعين باعتماد التقنية الجينية (SSR) (س س ر) التي أكدت أهمية التنوع الجيني لهذه الأصناف بنسبة 33 % الى 100 % عند أصناف البصل وبنسبة 75 % إلى 100 % بالنسبة لأصناف الثوم.

أما دراسة الخصائص البيوكيميائية للزيوت الأساسية لهذه الأصناف قد بينت وجود تنوع طفيف من حيث المردود و من حيث الزيوت الأساسية وكذلك خصائصها الحسية، في حين أن الدراسة الكيميائية النباتية والتحليل الكمي والنوعي (الكروماتوغرافي) للزيوت الأساسية اظهرا وجود تنوع مهم ما بين الأصناف النباتية للنوعين المدروسين.

كما أدت دراسات التصنيف الإحصائي حسب المواصفات الجينية إلى تقسيم النوعين إلى مجموعات فالنسبة للنوع *Allium cepa* قسم إلى مجموعتين واحدة منها تطابقت فيها البصمات الجينية بنسبة عالية حيث لوحظ أن في هذه المجموعة يتطابق نسبيا تصنيفها الجيني مع التصنيف المورفولوجي لبعض الصفات النوعية لهذه الأصناف حسب خاصيات الحراشف الجافة : كثافة لونها، تماسكها بعد الجني، اللون الداخلي لها، ولون البشرة الداخلية لها. في حين أن التصنيف الجيني لهذه الأصناف لا يشابه ولا يتطابق نهائيا مع التصنيف البيوكيميائي لها. في حين النوع *Allium sativum* قسم إلى ثلاث مجموعات واحدة منها كذلك تطابقت فيها البصمات الجينية بنسبة عالية وهو ما يثبت أنها عبارة عن أصناف مختلفة يتطابق فيها نسبيا تصنيفها الجيني مع التصنيف البيوكيميائي لهذه الأصناف وخاصة حسب الخاصيات الحسية والتركييب الكمي والنوعي والخصائص الفيزيوكيميائية للزيوت الأساسية

دراسة النشاط الضد البكتيري أظهرت أن جميع المجموعات البكتيرية كانت جد حساسة للمضادات الحيوية المستعملة أما بالنسبة للزيوت الأساسية لأصناف البصل RA و JE كان لها تأثير ضد بكتيري

ضعيف مع *S.aureus* لكنها لم تظهر أي تأثير مع المجموعات الأخرى في حين أن الصنف RL لم يبدي أي تأثير ضد بكتيري مع جميع المجموعات البكتيرية المدروسة . بالنسبة لأصناف الثوم أظهرت جميعها نشاط ضد بكتيري مع جميع المجموعات البكتيرية ما عدا الصنف Mess الذي لم يكن له أي نشاط ضد بكتيري إلا مع *E.coli* لكن الصنفين *RL و MB كان لهما نشاط ضد بكتيري معتبر مقارنة مع الأصناف الأخرى. وهذا راجع طبعا إلى التركيب الكيميائي لزيوتها الأساسية.

الكلمات المفتاحية: الثوم، البصل، التنوع البيولوجي، التباين الوراثي، الوصف المورفولوجي، الوصف الجيني، الوصف البيوكيميائي، التنشيط البكتيري، التقنية الجينية، SSR، الزيوت الأساسية.

Résumé

Dans le cadre de la préservation de la biodiversité de l'espèce *Allium sativum* et *Allium cepa* en Algérie ; Nous avons réalisés une étude comparative entre quatre variétés de la première espèce et entre trois variétés de la deuxième espèce par la caractérisation morphologique, biochimique ainsi que moléculaire et enfin l'évaluation de leurs pouvoir antibactérien vis-à-vis de quatre souches bactériennes. Les résultats ont dévoilé une importante variabilité phénotypique du patrimoine génétique des cultivars des deux espèces. La caractérisation morphologique basée sur les descripteurs morphologiques a révélé l'importance des descripteurs : épaisseur des écailles sèches, adhérence des écailles après récoltes, épaisseur du collet de bulbe et la couleur des écailles sèches dans la discrimination des variétés d'oignon, comme elle montre l'importance de certaines catégories telles que la position des caïeux à l'extrémité supérieure du bulbe, compacité des caïeux, distribution des caïeux et couleur de la chair pour discriminer les variétés d'ail. L'étude morphologique portant sur les caractères quantitatifs a montré une importante fluctuation du rendement en bulbe, du nombre de bulbe par kilogramme et du poids d'un Bulbe chez les variétés de l'ail et une importante variabilité du rendement en bulbe, du nombre de bulbe par kilogramme, du poids d'un Bulbe, nombre de points végétatifs par kg et le nombre des écailles sèches chez les variétés de l'oignon.

L'analyse moléculaire de la diversité génétique des variétés de l'espèce *Allium cepa* sur la base de huit couples d'amorces SSR nous a permis de compter au total 48 fragments d'ADN amplifiés avec des démentions variant entre 90 et 296 pb pour les variétés d'oignon et 48 fragments d'ADN amplifiés avec des démentions variant entre 169 et 410 pb pour les variétés de l'ail .Le taux moyen de polymorphisme varie de 33% à 100 % chez les cultivars de l'oignon et de 75% à 100% pour les variétés d'ail ;Ce qui montre l'importante diversité génétique du patrimoine génétique de ces deux espèces. Les résultats de l'extraction ont révélé une légère variation de la teneur et des paramètres organoleptiques de l'huile essentielle dans les deux espèces étudiées. Cependant, l'étude phytochimique , la caractérisation physico chimique et l'analyse chimique des huiles essentielles testées ont confirmé une variation considérable entre les variétés de chaque espèce.

La classification hiérarchique des génotypes d'oignon, selon les paramètres biochimiques se trouve controverser à celles qui sont s'effectuées selon, les paramètres moléculaire et l'analyse en coordonnée principale. Alors que, la séparation de ces accessions selon les paramètres morphologiques descriptifs des écailles sèches (adhérence après récolte,

couleur de fond, intensité de la couleur et couleur de l'épiderme) montre que ces variables constituent les éléments les plus stables et les plus significatifs pour caractériser et distinguer entre les variétés de cette espèce. Par ailleurs, la structuration génétique des génotypes d'ail selon les paramètres physico-chimiques et organoleptiques ainsi que la composition chimique de l'huile essentielle montre que ces paramètres constituent les éléments les plus significatifs pour caractériser et distinguer entre les variétés de cette espèce. L'évaluation de l'effet antibactérienne montre que la plupart des souches bactériennes utilisées sont très sensible aux antibiotiques utilisés. Les HEs des variétés d'oignon : Rouge d'Amposta et Jaune d'Espagne ont exercé une faible activité antibactérienne à l'encontre de *S. aureus*, mais aucune activité antibactérienne à l'HE de Rouge locale n'a été observée. Les quatre variétés de l'ail sont révélées actives contre toutes les bactéries étudiées à l'exception de la variété Messidrom qui n'a aucun effet avec toutes les bactéries sauf l'*E.Coli*. L'extrait brut de l'HE de la variété Rouge Locale et de la variété Mocpta Bulguar était les plus actifs parmi les autres extraits; ce qui est bien sûr expliqué par leur composition chimique.

Mots clés : *Allium cepa*, *Allium sativum*, diversité génétique, caractérisation morphologique, caractérisation biochimique, caractérisation moléculaire, Marqueurs SSR, Huiles essentielles, activité antibactérienne.

Abstract

Within the framework of the preservation of the biodiversity of the species *Allium sativum* and *Allium cepa* in Algeria; we carried out a comparative study of four varieties of the first species and three varieties of the second species by morphological, biochemical and molecular characterization and finally the evaluation of their antibacterial properties with respect to four bacterial strains.

The results revealed an important phenotypic variability of the genetic heritage of the cultivars of the two species. The morphological characterization based on the morphological descriptors revealed the importance of the descriptors: thickness of the dry scales, adhesion of the scales after harvest, thickness of the bulb collar and the color of the dry scales in the discrimination of the onion varieties, as it shows the importance of certain categories such as the position of the calyxes at the upper extremity of the bulb, the compactness of the branches, the distribution of the branches and the color of the flesh to discriminate the varieties of garlic.

The morphological study of quantitative traits showed a significant fluctuation in bulb yield, bulb per kilogram and bulb weight in garlic varieties, and significant variability in bulb yield, Bulb per kilogram, weight of bulb, number of vegetative points per kg and number of dry scales in onion varieties.

Molecular analysis of the genetic diversity of the *Allium cepa* species on the basis of eight pairs of SSR primers allowed us to count a total of 48 DNA fragments amplified with defects varying between 90 and 296 bp for Varieties of onion and 48 DNA fragments amplified with dementitions varying between 169 and 410 bp for the varieties of garlic.

The average rate of polymorphism varies from 33% to 100% in onion cultivars and from 75% to 100% in garlic varieties, which shows the large genetic diversity of the genetic inheritance of these two species. The extraction results revealed a slight variation in the content and organoleptic parameters of the essential oil in the two species studied.

However, the phytochemical study, the physico-chemical characterization and the chemical analysis of the essential oils tested confirmed a considerable variation between the varieties of each species.

The hierarchical classification of onion genotypes according to the biochemical parameters is controversial to those carried out according to the molecular parameters and the

principal coordinate analysis. The separation of these accessions according to the morphological parameters descriptive of the dry scales (adhesion after harvest, background color, intensity of color and color of the epidermis) shows that these variables constitute the most stable and significant elements To characterize and distinguish between varieties of this species. Moreover, the genetic structure of the genotypes of garlic according to the physico-chemical and organoleptic parameters as well as the chemical composition of the essential oil shows that these parameters constitute the most significant elements to characterize and distinguish between the varieties of this species. The evaluation of the antibacterial effect shows that most of the bacterial strains used are very sensitive to the antibiotics used.

The essential oil of onion varieties: RA and Yellow of Spain had low antibacterial activity against *S. aureus*, but no antibacterial activity at local Red Heat was observed. The four varieties of garlic are shown to be active against all the bacteria studied with the exception of the Messidrom variety which has no effect with all the bacteria except *E. coli*. The raw extract of the HE of the RL variety and of the MB variety was the most active among the other extracts with a growth inhibition diameter of 10 mm for the *E. coli* and *K. pneumoniae* bacteria; which is of course explained by their chemical composition.

Key words: *Allium cepa*, *Allium sativum*, Genetic diversity, Morphological variability, Biochemical variability, SSR markers, Essential oils, antibacterial activity.

Liste des figures

N°	Titre	page
Figure 1	L'unité de base de terpènes.	14
Figure 2	Exemple de structures de monoterpènes acycliques et cycliques rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 2009).	15
Figure 3	Exemple de structures de sesquiterpènes rencontrées dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999).	16
Figure 4	exemple de structures de composés aromatiques rencontrées dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999).	17
Figure 5	Schéma représentant les étapes de la technique AFLP de Vos <i>et al.</i> (1995).	29
Figure 6	Technique d'utilisation de SSR.	31
Figure 7	Description morphologique de l'oignon.	36
Figure 8	Description morphologique de l'ail.	45
Figure 9	Les variétés de l'espèce <i>Allium cepa</i> L.	56
Figure 10	Les variétés de l'espèce <i>Allium sativum</i> L.	57
Figure 11	Notation du nombre de points végétatifs par bulbe.	59
Figure 12	Notation du degré de séparation en bulbilles.	60
Figure 13	position du diamètre maximal de Bulbe.	61
Figure 14	Notation de la forme en section longitudinale de bulbe.	61
Figure 15	Notation de l'épaisseur du collet de Bulbe.	62
Figure 16	description de la forme du collet de Bulbe.	62
Figure 17	description de la forme de la base de Bulbe d'oignon.	62
Figure 18	Notation de la forme en section longitudinale du bulbe d'ail.	63
Figure 19	Description de la Forme de la base du bulbe d'ail.	63
Figure 20	Notation de la Position des caïeux à l'extrémité supérieure du bulbe d'ail.	64
Figure 21	Notation de la Distribution des caïeux.	64
Figure 22	Notation des Caïeux externes.	65
Figure 23	Les étapes de l'extraction de l'HE des variétés des deux espèces par la méthode d'hydrodistillation.	73
Figure 24	Carte factorielle des paramètres quantitatives de l' <i>Allium cepa</i> .	93
Figure 25	Carte factorielle des paramètres quantitatives de l' <i>Allium sativum</i> .	94
Figure 26	Projection factorielle et classification des variétés d'oignon.	95

Figure 27	Projection factorielle et classification des variétés d'ail.	96
Figure 28	Notation sur les bulbes et les écailles sèches des trois variétés d'oignon.	98
Figure 29	Notations sur les bulbes et les caïeux des quatre variétés d'ail.	102
Figure 30	Quantification de l'ADN sur gel d'agarose à 1.5%.	106
Figure 31	Résultats d'amplification en se basant sur des amorces ASM.	108
Figure 32	Dendrogramme de similarité génétique des cultivars d' <i>Allium sativum</i> UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) fondée sur la distance de Nei & Li (1979).	110
Figure 33	Résultats d'amplification en se basant sur des amorces ACM.	113
Figure 34	Dendrogramme de similarité génétique des cultivars d' <i>Allium cepa</i> UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) fondée sur la distance de Nei & Li (1979).	114
Figure 35	Rendement en H.E des variétés de l' <i>Allium sativum</i>	118
Figure 36	Rendement en H.E des variétés d' <i>Allium cepa</i> .	118
Figure 37	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'ail, basé sur les résultats du screenig phytochimique.	125
Figure 38	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon, basé sur le paramètre du screenig phytochimique.	126
Figure 39	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon, basé sur le paramètre du rendement en HE.	127
Figure 40	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'ail, basé sur le paramètre du rendement en HE.	128
Figure 41	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'ail, basé sur les caractéristiques organoleptiques des HEs.	129
Figure 42	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon, basé sur les caractéristiques organoleptiques des HEs.	130
Figure 43	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'ail, basé sur les paramètres physico-chimiques.	132
Figure 44	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon, basé sur les paramètres physico-chimiques.	133
Figure 45	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'ail, Classification en fonction de la composition chimique de leurs HEs.	134
Figure 46	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'ail, Classification en fonction de tous les paramètres étudiés.	136
Figure 47	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon,	

	Classification en fonction de tous les paramètres.	137
Figure 48	Effet des antibiotiques sur les bactéries étudiées.	144
Figure 49	zones d'inhibition des huiles essentielles des trois variétés d'oignon vis-à-vis les souches testées.	146
Figure 50	Effet de l'huile de Rouge Locale sur les bactéries testées.	148
Figure 51	effet de l'huile de Messidrom sur les bactéries étudiées.	149
Figure 52	effet de l'huile de Mocpta Bulgarsur les bactéries étudiées.	150
Figure 53	Effet de l'huile de Germidour sur les bactéries testées.	151
Figure 54	Effet de l'huile diluée de l'HE de Rouge d'Amposta et Jaune d'Espagne	152
Figure 55	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les géotypes d'ail, Classification en fonction de leurs pouvoirs anti bactériens.	154
Figure 56	Dendrogramme de disimilarité génétique entre les géotypes d'oignon, Classification en fonction de leurs pouvoirs anti bactériens.	155

Liste des tableaux

N°	Titre	page
Tableau 1	Liste de génotypes étudiés, origine, et caractéristiques morphologiques des bulbes.	56
Tableau 2	liste, abréviation et unité des caractères morphologiques quantitatifs de bulbes utilisés pour l'analyse de la variabilité entre et à l'intérieur des génotypes étudiés.	58
Tableau 3	Le mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN par PCR.	67
Tableau 4	Groupes chimiques, réactions d'identification et indicateurs utilisés.	70
Tableau 5	Liste des souches bactériennes étudiées.	79
Tableau 6	Evaluation de l'effet antibactérien selon le diamètre d'inhibition.	81
Tableau 7	Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer la CMI.	82
Tableau 8	Analyse descriptive des paramètres morphologiques.	84
Tableau 9	Effet variétal sur les paramètres morphologiques.	85
Tableau 10	Effet variété sur le poids d'un bulbe.	86
Tableau 11	Effet variété sur le nombre de Bulbe.	86
Tableau 12	Effet variété sur le rendement.	87
Tableau 13	Effet variété sur le nombre des écailles sèches.	87
Tableau 14	Effet variété sur le nombre de points végétatifs.	88
Tableau 15	Analyse descriptive de l'espèce <i>Allium sativum</i> .	88
Tableau 16	Effet variété sur les paramètres morphologiques.	89
Tableau 17	Effet variété sur le poids d'un bulbe.	89
Tableau 18	Effet variété sur le nombre de bulbe /kg.	90
Tableau 19	Effet variété sur le rendement en bulbe.	90
Tableau 20	Matrice de corrélation entre les paramètres quantitatifs de l' <i>Allium cepa</i> .	91
Tableau 21	Matrice de corrélation entre les paramètres quantitatifs de L' <i>Allium sativum</i> .	92
Tableau 22	Éléments du modèle de L'ACP sur les paramètres quantitatifs de L' <i>Allium cepa</i> .	92
Tableau 23	Éléments du modèle de L'ACP sur les paramètres quantitatifs de l'espèce <i>Allium sativum</i> .	94
Tableau 24	Notations descriptives des écailles sèches d'oignon.	97
Tableau 25	Notations descriptives des Bulbes d'oignon.	97

Tableau 26	Notations descriptives des bulbes d'ail.	100
Tableau 27	Notations descriptives des caïeux d'ail.	101
Tableau 28	Concentration estimée, facteur de dilution et concentration finale de l'ADN extrait des génotypes étudiés.	107
Tableau 29	Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci.	107
Tableau 30	Nombre de fragments générés par chaque marqueur SSR .	108
Tableau 31	Matrice des distances génétiques basée sur.	111
Tableau 32	Summary of Genic Variation Statistics for All Loci.	113
Tableau 33	Nombre de fragments générés par chaque marqueur SSR (ACM).	114
Tableau 34	Matrice de similarité génétique entre les génotypes d'oignon.	115
Tableau 35	Résultats de l'analyse phytochimique des deux espèces.	117
Tableau 36	Caractéristiques organoleptiques des extraits des huiles essentielles.	119
Tableau 37	Caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle.	119
Tableau 38	Composition chimique de l'huile essentielle de la variété RA.	120
Tableau 39	Composition chimique de l'huile essentielle de la variété RL.	121
Tableau 40	Composition chimique de l'huile essentielle de la variété Germ.	122
Tableau 41	Composition chimique de l'huile essentielle de la variété Mess.	123
Tableau 42	Composition chimique de l'huile essentielle de la variété MB.	124
Tableau 43	Composition chimique de l'huile essentielle de la variété RL.	124
Tableau 44	Matrice de dissimilarité des variétés d'ail en fonction de résultats de screening phytochimique.	125
Tableau 45	Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction de résultats de screening phytochimique.	126
Tableau 46	Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction du rendement en HE.	127
Tableau 47	Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction du rendement en HE.	128
Tableau 48	Matrice de dissimilarité des variétés d'ail en fonction.	129
Tableau 49	Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction.	130
Tableau 50	Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction du rendement en HE.	131
Tableau 51	Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon selon les paramètres physico- chimiques.	132
Tableau 52	Matrice de proximité des variétés de l'ail en fonction de la composition chimique des Hes.	134

Tableau 53	Matrice de proximité des variétés d'ail en fonction de tous les paramètres biochimiques.	135
Tableau 54	Matrice de proximité des variétés d'oignon en fonction de tous les paramètres étudiés.	137
Tableau 55	Diamètres des zones d'inhibition des deux antibiotiques testés.	142
Tableau 56	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'extrait brut des HEs des variétés d'ail.	145
Tableau 57	Diamètres (mm) des zones d'inhibition des H.Es des variétés d'oignon.	147
Tableau 58	Valeurs des CMI de l'huile de l'ail RL*	147
Tableau 59	Les valeurs des CMI de l'huile de Messidrom.	149
Tableau 60	Valeurs de CMI de l'huile de MB.	150
Tableau 61	Valeurs des CMI de l'huile de Germidour.	151
Tableau 62	Les valeurs des CMI des H.Es testées sur <i>S. aureus</i> .	152
Tableau 63	Matrice de proximité des variétés d'ail selon leur pouvoir antibactérien.	153
Tableau 64	Matrice de proximité des variétés d'oignon selon leur pouvoir antibactérien.	154

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AFNOR : Association française de normalisation
ATCC : American type culture collection
BN : Bouillon nutritive
°C : Degré celsius
CHU: Centre hôpital universitaire
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CN10 : Gentamicine
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
DMSO : Dimethylsulfoxyde
DO: Densité optique.
g : Gramme (unité de mesure de poids)
Germ: Germidour
ha : hectare (unité de surface agricole)
HE : Huile essentielle
ITCMI: Institut technique des cultures maraichères et industrielles
MB: Mocpta Bulgar
Mess: Messidrom
mg : Milligramme (sous-unité du gramme = 10^{-3} g)
MH: Gélose mueller-hinton
mm : Millimètre (sous-unité du mètre = 10^{-3} m)
MS : Matière sèche.
OEB : Oum el Bouaghi
RL : Rouge locale oignon
ARNase : Enzyme qui digère l'ARN
cm : Centimètre
dNTP : Désoxyribonucleide triphosphate
H : Heure
kb : Kilo base
M : Molaire
Mg : Milligramme
Min : Minute

ml : Millilitre

mM : Millimolaire

ng : Nano gramme

pb : Paire de base

SM : Spectrométrie de masse

Sxt25 : Cotrimoxazol

T : Température (en °C)

RA : Rouge d'Amposta

RL* : Rouge locale ail

S : Seconde

Taq : De *Thermusaquaticus* (bactérie qui vit dans les sources chaudes)

TR : Temps de rétention

V/V : Volume par volume

% : Pourcentage

µm : Micromètre

µl : Microlitre

µg : Microgramme (sous-unité du gramme = 10^{-6} g)

U : Unité

UV : Ultra violet

V : Volt

Mg : Microgramme

µl : Microlitre

Mmol : Micromole

Table des matières

	page
Remerciement	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Table des matières	
Introduction générale	
Partie bibliographique	
Chapitre I : Les plantes médicinales	5-10
I.1. Principes actifs des plantes	5
I.1.1. Les alcaloïdes	6
I.1.2. Les saponosides	7
I.1.3. Les phénols	7
I.1.4. Les flavonoïdes	7
I.1.5. Les tannins	8
I.1.6. Les glucosides	8
I.1.6.1. Les glycosides cardiotoniques	8
I.1.6.2. Les glycosides cyanogènes	9
I.1.6.3. Les glucosinolates	9
I.1.8. Les polysaccharides	9
I.1.9. Les anthocyanes	9
I.1.10. Les éléments minéraux	9
I.1.11. Les huiles essentielles	10
Chapitre II : Huiles essentielles et méthodes d'évaluation de leur activité antibactérienne	12-22
II.1. Les huiles essentielles	12
II.1.1. Définition	12
II.1.2. Localisation dans la plante	12
II.1.3. Rôle physiologique	13

II. 1 .4 . Propriétés physico-chimiques	13
II.1.5. Composition chimique	13
A-Terpénoïdes	14
A-1-les monoterpènes	14
A-2-les sesquiterpènes	16
B-composés aromatiques	16
C -les composés d'origine diverses	16
II.1.6. Méthodes d'analyse de la composition chimique	17
II.1.7.Facteurs de variabilité des huiles essentielles	18
II.1.7.1. Facteurs intrinsèques	18
II.1.7.2. Facteurs extrinsèques	18
II.1.8.Méthodes d'extraction des huiles essentielles	19
II.1.8.1.Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	19
II.1.8.1.1. Hydrodistillation simple	19
II.1.8.1.2. Entraînement à la vapeur saturée	20
II.1.8.1.3.Hydrodiffusion	20
II.1.8.2.Extraction par expression	20
✓ Autres procédés	20
II.2. Activité antibactérienne	21
II.2.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne	21
II.2.1.1. Méthode de l'aromatogramme	21
II.2.1.2.Méthode de diffusion en puits	22
II.2.1.3. Méthode de dilution	22
II.2.1.4.Méthode de micro-atmosphère	22
II.2.3.Mode d'action des huiles essentielles	22

Chapitre III

Méthodes d'évaluation de la diversité génétique	26-31
III. Méthodes d'évaluation de la biodiversité	26
III.1. Méthodes de description variétale	26
III.1. 1. Marqueurs morphologiques	26
III.1. 2. Marqueurs iso enzymatiques (Biochimiques)	27
III.1.3. Marqueurs moléculaires	27
III.1.3.1.Les marqueurs AFLP (Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification)	28

III. 1. 3.2. Les marqueurs microsatellites SSR (Répétition de séquences simples)	30
III.2. Technique de marquage moléculaire	31
• La technique PCR	31
Chapitre IV : Généralités sur les deux plantes étudiées	34-51
IV.1. L'espèce <i>Allium cépa</i>	34
1. Classification	34
2. Origine	34
3. Utilisation et production	35
4. Description	35
5. Etude de variabilité chez L'oignon	37
5.1. Variabilité morphologique	37
5.2. Marqueurs biochimiques	37
5.3. Marqueurs moléculaires	38
6. Les différentes variétés d'oignon	39
7. Composition chimique	40
8. Propriétés pharmacologiques et emplois	41
9. Récolte et conservation	42
IV.2. <i>Allium sativum L</i>	42
1. Classification.	42
2. Origine	43
3. Utilisations et production	43
4. Description	44
5. Espèces et variétés	45
6. Composition chimique	48
7. Propriétés pharmacologiques et emplois	49
8. Récolte et Conservation	50
9. Etude de variabilité chez l'ail	50
9.1 .Variabilité morphologique	50
9.2. Variabilité génétique	51
Partie expérimentale	
Chapitre I : matériel et méthodes	
I. Matériel et Méthodes	55
I.1. Matériel végétal	55
I.2. Méthodes	57

I.2.1. Caractérisation morphologique	57
I.2.1.1. Description morphologique des bulbes des génotypes	57
I.2.1.1.1. Critères de caractérisation quantitative	58
I.2.1.1.2. Critères de caractérisation qualitative	59
✚ Critères de caractérisation qualitative des bulbes des variétés d'oignon	59
✚ Critères de caractérisation qualitative des bulbes des variétés d'Ail	63
I.2.1.2. Analyse statistique	65
I.2.2. Caractérisation moléculaire	65
I.2.2.1. Extraction de l'ADN total	66
I. 2. 2.2. Quantification des acides nucléiques	67
I. 2. 2.3. Procédure de la technique microsatellites ou SSR (Simple Séquence Repeat)	67
I. 2. 2.4. Séparation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose	68
I. 2. 2.5. Analyse statistique	69
I.2.3. Caractérisation Biochimique	69
I.2. 3.1. Screening phytochimique	69
I.2. 3.2. Extraction des huiles essentielles	71
I .2.3.3. Etude analytique des huiles essentielles	73
I .2.3.3.1. Propriétés organoleptiques	73
I .2.3.3.2. Mesure de quelques paramètres physico-chimiques	74
I .2.3.4. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles	78
I.2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	79
I.2.4. 1. Matériel du test de l'activité antibactérienne	79
I.2.4. 2. Activité antibactérienne	79

Chapitre II : Résultats et discussion

84-158

II. 1. Caractérisation morphologique	84
II. 1.1. Analyse de la diversité des caractères morphologiques quantitatifs	84
II. 1.1.1. Effet variété sur les paramètres morphologiques	84
✚ <i>Allium cepa</i>	84
• Effet variété sur le poids d'un bulbe	85
• Effet variété sur le nombre de Bulbe	86
• Effet variété sur le rendement	86
• Effet variété sur le nombre des écailles sèches.	87
• Effet variété sur le nombre de points végétatifs.	87
✚ <i>Allium sativum</i>	88

• Effet variété sur le poids d'un bulbe, le nombre de Bulbe/k et le rendement	89
II.1.1.2. Analyse de la matrice de corrélation	91
✚ <i>Allium cepa</i>	91
✚ <i>Allium sativum</i>	91
II.1.1.3. Analyse en composant principale (ACP)	92
II.1.1.3. 1. Modèle de L'ACP sur les paramètres quantitatifs	92
✚ <i>Allium cepa</i>	92
✚ <i>Allium sativum</i>	93
II.1.1.3. 2. Projection des variétés sur le plan factoriel et classification	94
✚ <i>Allium cepa</i>	94
✚ <i>Allium sativum</i>	95
II.1.2. Descripteurs qualitatifs	96
✚ <i>Allium cepa</i>	96
✚ <i>Allium sativum</i>	99
Discussion	103
Conclusion	104
II. 2. Caractérisation moléculaire	106
II. 2. 1. Purification et quantification de l'ADN	106
II.2.2. Diversité génétique de l'espèce <i>Allium sativum</i> utilisant les marqueurs microsatellites (SSR)	107
II.2.2.1. Le dendrogramme	109
II.2.2.2. Discussion du dendrogramme	111
II.2.3. Diversité génétique de l'espèce <i>Allium cepa</i> utilisant les marqueurs microsatellites (SSR)	112
II.2.3.1. Le dendrogramme	112
II.2.3.2. Discussion du dendrogramme	115
Conclusion	116
II.3. Analyses Biochimiques	117
II.3.1. Screening phytochimique	117
II.3.2. Rendement en huiles essentielles	118
II.3.3. Etude analytique de l'huile essentielle	119
II.3.3.1 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites	119
II.3.3.2. Caractéristiques physico-chimiques	119
II.3.3.3. Analyse chimique des huiles essentielles	120
✚ <i>Allium cepa</i>	120

✚ <i>Allium sativum</i>	122
II.3.4. Classification hiérarchique	124
II.3.4.1. Classification en fonction de résultats de screening phytochimique	125
✚ <i>Allium sativum</i>	125
✚ <i>Allium cepa</i>	126
II.3.4.2. Classification en fonction du rendement en HE	126
✚ <i>Allium cepa</i>	126
✚ <i>Allium sativum</i>	128
II.3.4.3. Classification en fonction des caractéristiques organoleptique des HEs	129
✚ <i>Allium sativum</i>	129
✚ <i>Allium cepa</i>	130
II.3.4.4. Classification en fonction des paramètres physico chimiques	131
✚ <i>Allium sativum</i>	131
✚ <i>Allium cepa</i>	132
II.3.4.5. Classification en fonction de la composition chimique des HEs	133
✚ <i>Allium sativum</i>	133
II.3.4.6. Classification en fonction de tous les paramètres biochimiques étudiés	134
✚ <i>Allium sativum</i>	135
II.3.4.7. Classification en fonction de tous les paramètres sauf la composition chimique des HEs	136
✚ <i>Allium cepa</i>	136
Discussion	137
Conclusion	141
II.4. Résultats de l'activité antibactérienne	142
II.4.1. Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques	142
II.4.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut des HEs des variétés de l'ail et de l'oignon	144
✚ <i>Allium sativum</i>	144
• Effet de l'extrait brut des HEs de la variété RL* sur les souches testées	145
• Effet de l'huile brute de la variété Mess sur les souches testées	145
• Effet de l'huile brute de la variété MB sur les souches testées	145
• Effet de l'huile brute de la variété Germ sur les souches testées	145
✚ <i>Allium cepa</i>	146
II.4.3. Résultats de l'activité antibactérienne des HEs diluées des variétés de l'ail et de l'oignon	147

✚ <i>Allium sativum</i>	147
• Effet de différentes dilutions de l'HE de la variété RL* sur les souches testées	147
• Effet de différentes dilutions de l'HE de la variété Mess sur les souches testées	148
• Effet de différentes dilutions de l'HE de la variété MB sur les souches testées	149
• Effet de différentes dilutions de l'HE de la variété Germ sur les souches testées	150
✚ <i>Allium cepa</i>	151
II.4.4. Classification hiérarchique	152
✚ <i>Allium sativum</i>	152
✚ <i>Allium cepa</i>	154
Discussion	155
Conclusion	158
Conclusion générale et perspectives.	160
Références bibliographiques.	164
Annexes	

Introduction générale

Introduction Générale

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. À travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées et plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes. La phytothérapie est l'art de se soigner par les plantes. C'est une médecine très ancienne. Actuellement, de nombreux médicaments tirent leur origine des plantes médicinales. Cette forme de médecine ne s'oppose pas aux autres thérapies, elle augmente l'efficacité d'un traitement ou atténue ses effets secondaires (Larousse, 2001).

Les espèces alimentaires, oignon (*Allium cepa* L.), oignon multipliant (*Allium fistulosum* L.), ail (*Allium sativum* L.) et poireau (*Allium ampeloprasum* L.) sont des monocotylédones herbacées appartenant à la famille des Alliaceae. Sur la liste des légumes les plus cultivés au monde, les oignons sont classés deuxième, précédés par les tomates. Les oignons sont produits partout dans le monde, à différentes latitudes entre 10°S et 65°N (Foury et al., 1992). L'ail, *Allium sativum* L. est une plante existante approximativement depuis de 5000 à 7000 ans, utilisée comme légumes, épices ou plantes médicinales, mais son centre d'origine a été longuement inconnu.

Concernant l'ancêtre de l'ail cultivé, plusieurs travaux proposent que *Allium longicuspis* Regel est son progéniteur car les deux espèces sont morphologiquement et caryologiquement similaires et que *A. longicuspis* peut être rencontrée dans la partie ouest de la montagne Tien Shan qui est le centre d'origine de l'ail (Etoh et Ogura, 1984). Ces deux espèces furent d'abord exploitées comme plante médicinale avant de devenir un condiment ou légume.

En médecines traditionnelles, le recours à l'utilisation des plantes et/ou de leurs extraits est une approche biologique sans effets négatifs sur l'écologie (Soković et Van Griensven, 2006). Les essences semblent être suffisamment efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques (Buchbauer et Jirovetz, 1994). Le pouvoir antimicrobien des plantes médicinales serait dû en totalité et/ou en partie aux essences qu'elles contiennent (Akgül et Kivanc, 1988). L'oignon est antispasmodique, carminatif, diurétique, expectorant, anthelminthique, hypoglycémiant, anti-hypercholestérolémiant et antiagrégant plaquettaire

Introduction Générale

(Bruneton, 2009). Les extraits de l'oignon ont également une activité anti-asthmatique et antiallergique cutanée et pulmonaire (Cowan, 1999). Divers composés chimiques soufrés et non soufrés ont été isolés du bulbe d'oignon. En 1910, Kooper a examiné le jus frais de l'oignon commun, il a identifié l'acide thiocyanique et l'allylthiocyanate (Shankaranarayana et al, 1982). Les composés soufrés sont les plus caractéristiques de l'huile essentielle de l'oignon et de l'ail tels que dimethyldisulfide, dimethyltrisulfide et allylmethyltrisulfide (Liu et al, 2014 ; Ye et al, 2013). Parmi les alliums, l'ail possède l'odeur la plus puissante et pénétrable. Les premiers exposés sur les propriétés physiques et la structure chimique du principal composé odoriférant et antibactérien de l'ail, étaient donnés par (Cavallito et al., 1944). L'analyse de la diversité génétique du genre *Allium*, a actuellement recours aux techniques de la biologie moléculaire. Ces dernières constituent un outil puissant et fiable pour l'amélioration des plantes; elles permettent de comprendre les différences et les similitudes qui existent entre ces lignées au niveau de leurs gènes. Cela peut aider à une meilleure gestion des ressources génétiques sur la base d'une évaluation moléculaire complémentaire à l'évaluation agronomique (Forster *et al.*, 2000).

Il y a une grande diversité au sein des espèces d'*Allium* qui étend du bassin méditerranéen à l'Asie central et Pakistan (Fritsh and Frisen, 2002). Simon (2001) assume que la diversité génétique chez l'ail cultivé est due aux variations générées par sa multiplication végétative. On peut distinguer les clones non seulement au niveau morphologique et enzymatique (Lallemand, 1997) mais le développement de nouvelles technologie d'amélioration a permis son étude au niveau d'ADN grâce aux marqueurs moléculaires.

Il existe une très grande diversité variétale, classée selon la couleur, la forme et la taille des bulbes ; leur mode de culture ; leur destination pour la vente ; la longueur du jour minimale nécessaire à la formation du bulbe (Ricroh et al., 1996). Le goût et l'aptitude des bulbes à la conservation sont aussi des variantes qui permettent de caractériser les oignons de l'Afrique (Moumouni, 2006). En Algérie, de nombreuses variétés sont cultivées: doux, blanc ou jaune, rouge fort, hâtif, extra hâtif.

Il est donc très primordial de connaître le matériel végétal de notre espèce afin de pouvoir classer les variétés et de récupérer les génotypes en raison du risque d'érosion génétique due à la mise au point de nouvelles variétés par la voie des programmes de l'amélioration génétique.

Introduction Générale

C'est dans ce cadre que se situe notre travail qui consiste en une caractérisation morphologique, biochimique et moléculaire de trois variétés d'oignon et quatre variétés d'ail (locales et introduites).

- Les analyses de la variabilité morphologique n'ont concerné que les bulbes des variétés des deux espèces étudiées. Cette description a été réalisée sur les paramètres morphologiques quantitatifs et qualitatifs.
- Une analyse moléculaire sur la base de 8 couples d'amorces SSR a été réalisé pour vérifier la biodiversité morphologique et biochimique des cultivars d'oignon et d'ail.
- Une analyse de synthèse a été menée pour vérifier la contribution des paramètres morphologiques, biochimiques et moléculaire dans la classification des cultivars des deux espèces.
- Enfin, une étude comparative entre les activités anti bactériennes des huiles essentielles des variétés étudiées pour chaque espèce vis –a –vis quatre souches bactériennes.

Par conséquent, le plan de la thèse est structuré en deux parties :

Partie 1 : Données bibliographique sur les plantes médicinales et ses métabolites secondaires et notamment les huiles essentielles, ensuite en présentant les deux espèces étudiées, leurs biodiversité et enfin les différents moyens utilisés pour leur conservation et l'analyse de leur variabilité morphologique, biochimique et moléculaire.

Partie 2 : organisation du travail expérimental tout en présentant le matériel végétal étudié et les différentes techniques utilisées ainsi que la présentation et l'interprétation des résultats obtenus et enfin une conclusion générale et perspectives.

Partie bibliographique

Chapitre I :

Les plantes médicinales

Une plante est dite médicinale lorsqu'au moins une partie possède des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies avec ou sans principes actifs déterminés. En fait, il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux (Bruneton, 1999).

La plante est le siège d'une intense activité métabolique. Par son organisation bien structurée, elle constitue un élément très riche en principes actifs les plus divers.

Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante, et pour cela la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit: prédateurs, microorganismes pathogènes, etc... Elle peut donc développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre, il s'agit des métabolites secondaires.

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997). La feuille est le site de toutes les synthèses chimiques et la partie la plus utilisée en thérapeutique. Aussi, la tige et surtout la partie externe de la tige, notamment l'écorce, sont souvent utilisés. La fleur renferme dans ses différentes parties un bon nombre de composés appréciables (Wichtl et Anton, 2003). Si les fruits et les graines fournissent des réserves nutritionnelles et une grande quantité de substances actives, les racines peuvent aussi stocker certains principes actifs comme les alcaloïdes, sans oublier les tubercules rhizomes et bulbes qui contiennent un grand nombre de principes essentiels.

I.1. Principes actifs des plantes

Les principes actifs des plantes sont de nature organique: polysaccharides, acides aminés, acides gras (Al-Achi, 2005), flavonoïdes, saponosides, alcaloïdes (Marles et Farnsworth, 1994 ; Dey *et al.*, 2002) ou de nature minérale, tel que le chrome organique qui potentialise l'effet de l'insuline (Aharonson *et al.*, 1969 ; Evans et Bowman, 1992).

A côté du chrome, le vanadium, un insulino-mimétique connu avant la découverte de l'insuline, a été utilisé pour le contrôle de la glycémie (Dey *et al.*, 2002). D'autres minéraux tels que le magnésium, le cuivre, le sélénium et le fer ont également des effets bénéfiques (Thompson et Godin, 1995 ; Ducros et Favier, 2004). C'est d'abord la chimie dite d'extraction qui a permis d'isoler des composants à partir de plantes. La chimie dite de

synthèse a permis, ensuite, de reproduire et reconstituer ces principes végétaux en prenant modèle sur la plante. Par ailleurs, les chercheurs ont réussi à déterminer comment ces substances agissent sur l'organisme (Larousse, 2001). Donc, les plantes médicinales doivent leurs actions à plusieurs éléments actifs qu'on peut analyser chimiquement (Verdrager, 1978).

I.1.1. Les alcaloïdes

Ce sont des substances d'origine biologique et le plus souvent végétale (il n'en n'existe que des rares représentants dans le règne animal), Formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent au moins un atome d'azote hétérocyclique qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Les alcaloïdes renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre).

Chez le végétal, les alcaloïdes existent sous la forme soluble, de sels (citrate, malate, tartrate, méconate, isobutyrate, benzoate) ou sous celle d'une combinaison avec les tanins. Leur nom se termine toujours par « ine ».

Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérés, c'est le cas d'un dérivé de la pervenche « Vincarosea » employé pour traiter certains cancers (Nowitz et Bottet, 2000 ; Larousse, 2001).

De plus, ils ont une action physiologique remarquable sur le système nerveux central ou sur le système nerveux autonome sympathique et parasympathique dont ils agissent en petite quantité.

Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques. On peut les classer selon leur composition chimique et surtout leur structure moléculaire en plusieurs groupes :

- Des phénylalanines : capsaïcine du piment, colchicine du colchique ;
- Des alcaloïdes isoquinoléiques : morphine, éthylmorphine, codéine et papavérine contenues dans l'opium du pavot ; et des alcaloïdes indoliques : ergométrine, ergotamine, ergotoxine de l'ergot des céréales ;
- Des alcaloïdes quinoléiques : tige feuillée de la rue commune ;
- Des alcaloïdes pyridiques et pipéridiques : ricinine du ricin, trigonelline du fenugrec, conine (poison violent) de la ciguë ;
- Des alcaloïdes dérivés du tropane : scopolamine et atropine de la belladone ;

- Des alcaloïdes stéroïdes : racine de vétrate, douce-amère ou aconite (aconitine) par exemple (Seghiri, 2005).

I.1.2. Les saponosides

Sont des métabolites secondaires hétérosidiques. Ils se divisent en saponosides à génétriterpénique et stéroïdique. Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, elles se caractérisent par propriétés moussantes émulsifiants en contact avec l'eau (Bruneton, 1999). Les saponines stéroïdiques ont une structure chimique similaire à celle de nombreuses hormones humaines (cortisol et œstrogène) et confèrent aux plantes qui les contiennent une activité hormonale. Les triterpénoïdes présents dans les racines de primevère « *Premulaveris* » sont de puissants expectorants, mais peuvent aussi faciliter l'absorption des éléments nutritifs.

Fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés également par certains animaux marins tels que les concombres de mer ou les étoiles de mer. Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre, un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immunoadjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant (Lacaille-Dubois, 2000). Les saponines hémolysent les globules rouges, irritent les muqueuses, causent un relâchement intestinales et augmentent les sécrétions muqueuses bronchiales (Larousse, 2001).

I.1.3. Les phénols

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Il existe une très grande variété de composés phénoliques, du plus simple comme l'acide salicylique au plus complexe comme les tannins. On suppose que les plantes en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages (Nowitz et Bottet, 2000). Les phénols sont surtout des antiseptiques urinaires de l'arbutine « arbutoside de la busserole » et des antalgiques. (Wichtl et Anton, 2003). Les acides phénoliques comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydantes et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (Iserin, 2001).

I.1.4. Les flavonoïdes

Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (thé, raisin, baies, agrumes). Ce sont les pigments les plus importants pour la coloration des fleurs dont le pouvoir attracteur conditionne la pollinisation entomophile (Bruneton, 1999). Les flavonoïdes présents dans de nombreuses plantes, à ce jour les chercheurs en connaissent plus de 5000 flavonoïdes dont leurs effets ne sont pas uniformes. Ils exercent une action favorable sur les capillaires « les plus petits vaisseaux sanguins » assurant une bonne circulation sanguine. La rutine présente dans plusieurs plantes telles que le citron, renforce les parois des vaisseaux capillaires (Larousse, 2001). Ce sont aussi des antiagrégants plaquettaires non toxiques et empêchent l'adhésion duthrombus à la paroi vasculaire « prévention des infarctus (Wichtl et Anton, 2003). Un autre groupe permet d'agir sur les spasmes du système gastro-intestinal, tandis qu'un troisième influence le système cardiovasculaire. Les flavonoïdes sont également connus pour souligner les effets des autres substances d'une plante (Iburg, 2007).

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées par le domaine médical, où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-radicalaires, anti-allergiques, anti-tumorales, mais aussi anti-inflammatoires et anticancéreuses (Hertoget *al.*, 1993).

1.1.5. Les tannins

Toutes les plantes contiennent les tanins à un degré plus ou moins élevé ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou les bétails. Ce sont des composés polyphénoliques que l'on trouve dans pratiquement tous les végétaux, et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.) caractérisées par leur astringence (sensation de dessèchement en bouche). Par exemple, les pépins de raisins sont très chargés en tanins (Mann, 1962). Le tanin se retrouve aussi dans le cidre, le calvados et le pommeau. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et par leur degré d'oxydation (Hemingway, 1992). Ils ont la propriété de stopper les hémorragies, de lutter contre les infections et de précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les métaux lourds. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre 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 (Pousset, 1989 ; Nowitz et Bottet, 2000).

I.1.6. Les glucosides

Se sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, ils se composent de deux parties l'une contient un sucre (glucose) qui est le plus souvent inactive, la deuxième partie à un effet thérapeutique et c'est la plus active nommée aglycone (Ravenet *al.*, 2007). On distingue plusieurs groupes de glucosides selon leur composition chimique :

I.1.6.1. Les glycosides cardiotoniques

Présents dans de nombreuses plantes médicinales telles que les digitales laineuses. Les glucosides cardiaques comme la digitoxine, la digoxme et la convallotoxine ont une action directe et puissante sur le cœur ; ils aident à maintenir le rythme cardiaque en cas d'affaiblissement et ils sont également diurétiques comme ils contribuent à transférer les liquides des tissus et du système circulatoire vers les conduits urinaires (Nowitz et Bottet, 2000 ; Larousse, 2001).

I.1.6.2. Les glycosides cyanogènes

Bien que ces substances soient à base de cyanure, un poison très violent, prises en petite doses, elles ont des effets sédatifs et relaxants sur le cœur et les muscles, l'écorce du cerisier sauvage et les feuilles sureau noir (Larousse, 2001).

I.1.6.3. Les glucosinolates

Présents uniquement dans les espèces de la famille de moutardes et des choux. Ils provoquent un effet irritant sur la peau et causant l'inflammation. Utilisés comme cataplasme sur les articulations douloureuses, ils augmentent le flux sanguin dans la zone irritée.

I.1.8. Les polysaccharides

Sont définis comme des polymères de haut poids moléculaire résultant de la condensation d'un grand nombre de molécules d'oses. On les trouve dans toutes les plantes. Ils sont responsables de la rigidité des parois cellulaires de végétaux supérieures, représentent une forme de stockage de l'énergie, et aussi protecteurs des tissus contre la déshydratation du fait de leur pouvoir hydrophile (Bruneton, 2009).

Du point de vue phytothérapie, les plus importants sont les mucilages et les gommés qui absorbent de grandes quantités d'eau, produisant une masse gélatineuse qui peut être utilisée pour protéger les tissus enflammés et calmer la douleur (Nowitz et Bottet, 2000). Un effet hypoglycémiant a été observé avec le fenugrec et le tamarin, éventuellement par ralentissement de la résorption des sucres induit par les mucilages (Teuscheret *al.*, 2005).

I.1.9. Les anthocyanes

Ils sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (flavonoïdes proches des flavones). Responsables de la coloration bleue, rouge, rose, ou pourpre de la plupart des fleurs et des fruits (Bruneton J, 2009).

Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres. Ils maintiennent une bonne circulation du sang, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux (Iserin, 2001).

I.1.10. Les éléments minéraux

Les plantes, les fruits et les légumes contiennent des vitamines indispensables que notre corps est incapable de synthétiser. Dans de nombreux cas, les plantes procurent aussi les éléments minéraux indispensables à notre organisme : azote, calcium, potassium, sodium ainsi que des oligo-éléments, zinc, fer, cobalt, cuivre, manganèse, lithium, césium, nickel, molybdène, magnésium par exemple le pissenlit « *Taraxacum officinale* » est un puissant diurétique où son effet est dû à sa concentration en potassium (Nowitz et Bottet, 2000).

Enfin, certaines plantes contiennent des composés ayant une action antibiotique : ail, oignon, moutarde, nénuphar.....

I.1.11. Les huiles essentielles

Il s'agit de mélanges de composés lipophiles, volatiles et souvent liquides, d'extraits de la plante grâce à des procédés physiques. Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (Teuscheret *al.*, 2005). Elles sont utilisées pour leurs parfums dans les préparations cosmétologiques et aussi pour leurs propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires. D'autres sont utilisées comme édulcorants (Domart et Bourneuf, 1988).

Chapitre II :

Huiles essentielles et méthodes d'évaluation de leur activité antibactérienne

II .1. Les huiles essentielles :

II.1.1. Définition

Le terme huile essentielle a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin Suisse Parascelsus Von HOHENHEIM pour désigner le composé actif d'un remède naturel (Burt, 2004). Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle convergent sur le fait que les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, de composition généralement assez complexe, isolées des plantes par hydrodistillation ou par pression mécanique. (Kalemba et Kunicka, 2003. Elles diffèrent des huiles fixes (huiles d'olive,...) et des graisses végétales par leur caractère volatil ainsi que leur composition chimique (Balz, 1986).

Cette définition a été reprise à peu de choses près par AFNOR et ISO: « l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» (ISO, 1997; AFNOR, 2000).

Pour certains auteurs comme Carette (2000), il est important de distinguer l'huile essentielle et essence. Cette dernière est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée, c'est-à-dire que l'huile essentielle est l'essence distillée. Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 1 500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques » (Bruneton, 1999; Degryse *et al.* , 2008).

II. 1. 2. Localisation dans la plante

Les huiles essentielles n'existent quasiment chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaceae ou Asteraceae) (Hazzit, 2002; Bozet *al.* , 2009).

Elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux: les fleurs, dans les cellules du mésophile de nombreux pétales, (Gehard,1993), mais aussi les feuilles (citronnelle,

eucalyptus, laurier noble), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre), les fruits (toute épice, anis, badiane), le bois (bois de rose, santal), les écorces (cannelier) ou les graines (muscade) (Bruneton, 1993; Anton et Lobstein, 2005 ; Oussalaet *al.*, 2006).

II. 1. 3. Rôle physiologique

La fonction exacte des huiles essentielles dans la plante n'est pas bien définie. Il est vraisemblable qu'elles aient un rôle écologique lors des interactions végétales (agents allélopathiques : comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines ou par protection contre la flore microbienne infectieuse, mais aussi lors des interactions végétale – animale : action répulsive sur les prédateurs par leurs odeurs caractéristiques, par exemple repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation (Bakkali,2008).

II. 1 .4 . Propriétés physico-chimiques

Elles sont très inflammables et très odorantes, liquides à température ambiante. Exposées à l'air, les huiles essentielles se volatilisent, ce qui les différencie des huiles fixes (olive, tournesol ...); leur indice de réfraction est souvent élevé et la plupart dérivent la lumière polarisée (optiquement active). Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de saffran, de girofle et de cannelle. Elles ne sont que très rarement colorées.

Peu solubles ou pas du tout dans l'eau. Elles sont pour la plus part, solubles dans des solvants organiques. Entraînables à la vapeur d'eau, elles se retrouvent dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille (Bruneton, 1999 ; Rhayour, 2002; Benini, 2007; Benayad, 2008).

II.1.5. Composition chimique

Sur le plan chimique, les HEs sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et celui des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part. Elles peuvent

également renfermer les composés de la dégradation d'acide gras et des terpènes (Hellal, 2011).

A-Terpénoïdes

Dans le cas des HEs, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, c'est à- dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono-et sesquiterpènes. Ce sont des hydrocarbures ayant respectivement dix et quinze atomes de carbone. Ils peuvent être saturés ou insaturés (Bruneton ,2009).

A-1-les monoterpènes

Les carbures sont presque toujours présents, ils peuvent être acycliques (myrcène, ocimènes), monocyclique (α -et γ -terpinène,p-cymène) ou bicyclique (pinène, camphène, sabinène) (Figure 02) .Ils constituent parfois plus de 90 % de l'HE (citrus,térébenthines) (Bruneton, 2009).

Il peut exister aussi, une variété d'hydrocarbures aliphatiques à faible poids moléculaire (linéaires, ramifiés, saturés et non saturés), acides, alcools, aldéhydes, esters ou lactones acycliques et exceptionnellement des composants contenant de l'azote, du soufre ou des coumarines, et de quelques autres, dont certains indéfinis, tous en proportions variées en fonction de chaque essence, et ne contiennent ni acides gras, ni vitamines, ni sels minéraux . La caractéristique chimique commune aux terpènes réside dans leur structure: ce sont des multiples d'une unité à cinq atomes de carbone ayant pour base un diène conjugué dont le nom commun est "isoprène" (2-méthylbuta-1,3-diène) (Figure 01) (Johnson, 2003). Les terpènes sont ainsi parfois désignés sous le nom de "composés isoprénoïdes", mais de préférence "terpénoïdes" pour tous les composés constitués d'unités d'isoprène, sans prendre en considération les groupes fonctionnels présents (Robinson, 1991).

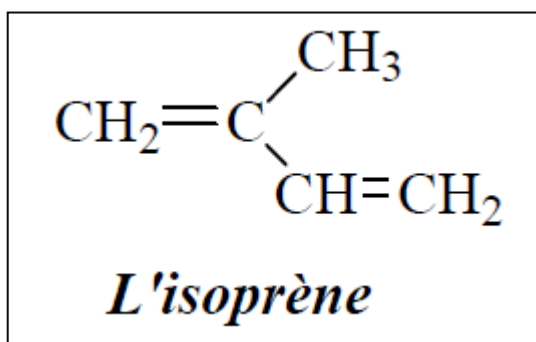


Figure 01 : Unité de base de terpènes.

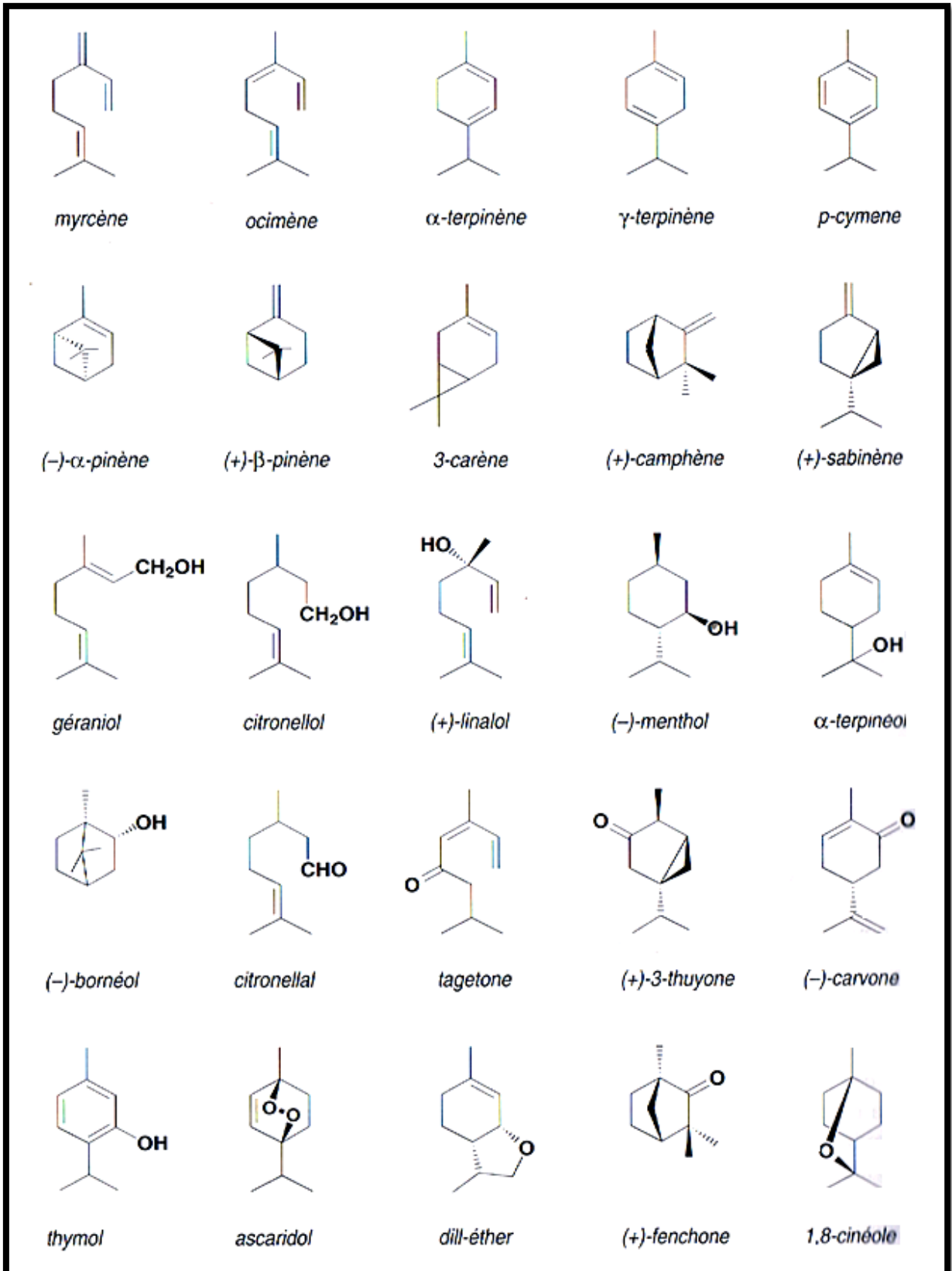


Figure 02: Exemple de structures de monoterpènes acycliques et cycliques rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 2009).

A-2-les sesquiterpènes

Un grand nombre de sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs (Figure 3). Ils peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées à ces fractions volatiles. Les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas des monoterpènes, carbures, alcools et cétones étant les plus fréquents. β

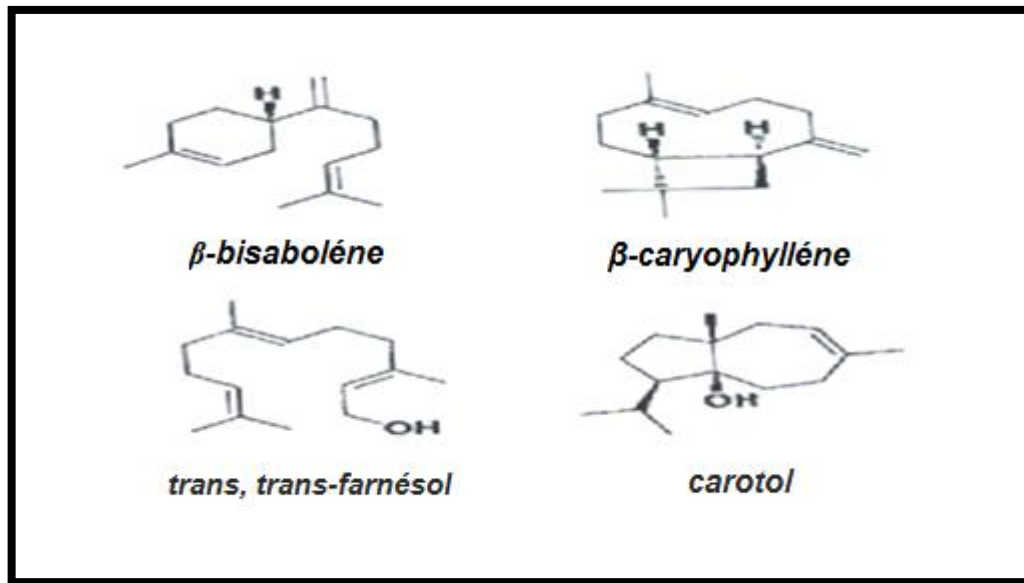


Figure 03: Exemple de structures de sesquiterpènes rencontrées dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999)

B-composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C_6-C_3) sont beaucoup moins fréquents que les dérivés terpéniques, ce sont très souvent des allyl- et des propénylphénols, parfois des aldéhydes, on peut également rencontrer dans les HEs des composés en (C_6-C_1) comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'anthranilate de méthyl (Figure 4). Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Citons par exemple l'eugénol et l'anéthole (Figure 4), qui sont responsables de l'odeur du clou du girofle et d'Anis respectivement (Kunle et okogum, 2003 ; Bruneton, 2009).

C -les composés d'origine diverses

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles. Ces produits peuvent être azotés ou soufrés et contribuent souvent aux arômes de fruits.

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation. (Inouye et al., 2003).

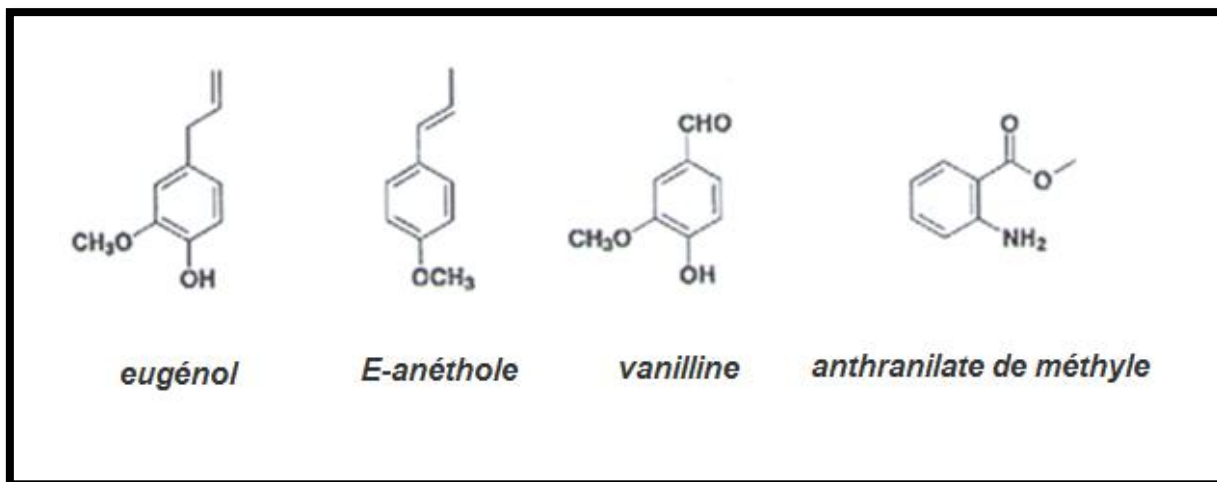


Figure 04: exemple de structures de composés aromatiques rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999).

II.1.6. Méthodes d'analyse de la composition chimique

Il existe plusieurs types d'analyse, qui ont pour objet l'identification qualitative et quantitative des différents constituants d'une huile essentielle: (CPG, GC/MS, CG/FTIR, RMN, HPLC, IR, etc). La chromatographie en phase gazeuse est la technique la plus utilisée pour ce type d'analyse. Elle peut être couplée à différents types de détecteurs, les plus utilisés sont : le détecteur de masse (SM), le détecteur à ionisation de flamme (FID), et de plus en plus le détecteur infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). La chromatographie en phase gazeuse CPG est utilisée pour l'analyse quantitative et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse GC/MS pour l'analyse qualitative (Lamarti *et al.*, 1993; Marriott *et al.*, 2001; Lahlou, 2004; Bourkhiss *et al.*, 2007).

La GC et la GC/MS permettent de connaître très exactement la composition chimique, la recherche d'éventuelles traces de produits indésirables tels les pesticides ou les produits chimiques ajoutés (Renata *et al.*, 2006 ; Baser et Buchbauer, 2010). Les composés qui ne sont pas facilement séparés par la GC et les molécules structurellement semblables comme les composés stéréoisomériques d'huiles essentielles sont analysés par ^{13}C -NMR (Nuclear Magnetic Resonance), ^1H -NMR, etc.. (Lahlou, 2004; Baser et Buchbauer, 2010 ; Bruneton, 2009).

II.1.7. Facteurs de variabilité des huiles essentielles

De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle. Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan de rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes (Garnéro, 1991; Bruneton, 1999; Benini, 2007). Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine : intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante (de l'individu ou l'organe considéré) ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante (des conditions géographiques et climatiques, du terrain de culture de la plante, de l'année de culture (ensoleillement, hygrométrie, etc.), du mode cultural de la période de récolte,) ou encore par la méthode d'extraction, etc.

II.1.7.1. Facteurs intrinsèques

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue, pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (Bruneton, 1999). L'influence du stade végétatif (Garnéro, 1991; Bruneton, 1999; Stefanini *et al.*, 2006a; Aprotosoia *et al.*, 2010), l'organe de la plante car la composition chimique des HE peut varier d'un organe à un autre (Maffei et Sacco, 1987 ; Barry, 2001 ; Stefanini *et al.*, 2006a; Chowdhury *et al.*, 2009), les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie (Aprotosoia *et al.*, 2010) et le polymorphisme chimique « chimiotypes ou formes physiologiques » (Garnéro, 1991; Anton et Lobstein, 2005; Belyagoubi, 2006) sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

II.1.7.2. Facteurs extrinsèques

Il s'agit de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie, l'humidité relative et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (Bruneton, 1999; Mohammad *et al.*, 2009; Olle et Bender, 2010; Aprotosoia *et al.*, 2010). Il n'y a pas mal des travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (Barry, 2001; Mohammadi, 2006; Marzoukia *et al.*, 2009), les pratiques culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'apport de l'engrais et l'influence des variations

N, P, K, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (Barry, 2001; Lahlou, 2004; Stefanini *et al.*, 2006a; Benini, 2007; Aprotosoiaie *et al.*, 2010 ; Bruneton.J, 2009).

L'instabilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations, etc. (Silou, 2003; Lucches, 2005). Le stockage des matières premières avant distillation et la méthode d'extraction (Huang *et al.*, 1987; Weinreich et Nitz, 1996; Bruneton, 1999; Mohamed, 2005; Abramson *et al.*, 2007; Benini, 2007; Silano et Delbò, 2008) et l'état du matériel végétal (Pinto *et al.*, 2006; Hettiarachichi, 2008) sont également déterminants sur le rendement et la qualité des huiles essentielles (Besombes, 2008).

II.1.8. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Plusieurs méthodes sont connues pour extraire les essences aromatiques des végétaux. Parmi les divers procédés d'extraction des huiles essentielles, deux seulement sont admis par la pharmacopée française ainsi que par l'AFNOR et ISO :

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

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

Les méthodes d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau. Sous l'action de cette dernière introduite ou formée dans le vase d'entraînement, l'essence aromatique contenue dans la plante est chauffée, disloquée du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Les vapeurs sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation. Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydrodistillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion (Padma S Vankar, 2004 ; Semen et Hiziroglu, 2005).

II.1.8.1.1. Hydrodistillation simple

C'est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles. Elle consiste à immerger le matériel végétal à extraire et le mettre en contact direct avec l'eau dans un ballon

lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal sont condensées dans un réfrigérant et les huiles se séparent de l'eau par différence de densité.

II.1.8.1.2. Entraînement à la vapeur saturée

Dans ce cas, le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau est injectée à travers la masse végétale disposée sur des plaques perforées en dessus de la base de l'alambic, les constituants volatils peu solubles dans l'eau sont entraînés et après condensation, séparés du distillat refroidi par décantation.

II.1.8.1.3. Hydrodiffusion

Elle consiste à pulser un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétal du haut vers le bas. La composition des produits obtenus est sensiblement différente au plan qualitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes (Abdoul D Samat, 2002).

II.1.8.2. Extraction par expression

Le principe de cette technique consiste à rompre les poches à essence par un moyen mécanique, pression, incision ou abrasion à froid. L'huile essentielle mélangée à l'eau cellulaire est séparée par décantation ou centrifugation. Cette méthode est souvent utilisée pour recueillir les huiles essentielles d'agrumes (citrons, orange, mandarines et pamplemousses) Abdoul D Samat ,(2002).

✓ Autres procédés

D'autres procédés plus récents, d'un emploi très limité, sont utilisés le plus souvent pour les plantes délicates qui ne supportent pas la chaleur, comme l'enfleurage. L'extraction par solvants volatils, extraction au CO₂ supercritique, les micro-ondes, les fluides sous pression, etc...peuvent être utilisés (Piochon, 2008). Par exemple la distillation assistée par micro-onde fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée parce qu'elle présente beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Chiasson *et al.*, 2001; Kaufmann & Christen, 2002; Lahlou, 2004; Lucchesi *et al.*, 2004; Olivero-Verbel *et al.*, 2010).

II.2. Activité antibactérienne

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques.

II.2.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des HEs. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des H.Es dans les milieux aqueux, leur volatilité et la nécessité de les tester à de faibles concentrations. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon (Burt, 2004). Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients (Wilkinson, 2006).

II.2.1.1. Méthode de l'aromatogramme

L'aromatogramme (étymol du grec arôma et du latin signifiant ((arome)), et du grec gramma signifiant (lettre), (écriture), est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (Belaiche, 1979) ou encore l'emploi thérapeutique exclusif des huiles essentielles en usage interne par absorption ou en usage externe. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles. La signification et l'interprétation d'un aromatoigramme sont les mêmes qu'un antibiogramme. Différents types d'aromatogramme (milieu solide, liquide ou gazeux) sont exploitables (Hammer, 1990).

Cette méthode est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à

l'activité bactériostatique de l' H.E sur le germe testé. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité (Guerin et Carret, 1999).

II.2.1.2. Méthode de diffusion en puits

Méthode proposée par COOPER et WOODMAN en 1946 et reprise par SHROEDER et MESSING en 1949. Elle assure une diffusion radiale de l'H.E à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'H.E de concentration connue. L'H.E diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard, 2003).

II.2.1.3. Méthode de dilution

Les HEs à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre et le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Robert-Demuet, 1995).

II.2.1.4. Méthode de micro-atmosphère

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'H.E qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri, renversée après fixation de l'H.E sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés. Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase vapeur sont encore peu nombreux (Pibiri, 2005).

II.2.3. Mode d'action des huiles essentielles

Les mécanismes par lesquels les HEs exercent leur activité antibactérienne sont mal connus. Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des HEs. Il est probable que leur activité antibactérienne ne

soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Hellal, 2011).

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

- Leur interférence avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire grâce à leur propriété hydrophobe ce qui entraîne une perturbation de la cellule (Burt, 2004). En outre, cette réaction varie en fonction de la nature de la bicouche lipidique ce qui explique la résistance des bactéries à Gram négatif (Mahmoud *et al.*, 2004).
- Destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux (Lioliou *et al.*, 2009).
- Inactivation et destruction du matériel génétique du micro-organisme (Kim *et al.*, 1995 ; Hulin *et al.*, 1998).

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large due principalement à leur grande affinité aux lipides membranaires grâce à l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité et entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules (Dormans et Deans, 2000 ; Burt, 2004).

Le mode d'action des HEs dépend du type de microorganismes. En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (Hellal, 2011).

Chalchat *et al.*, (1997) constatent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est hautement dépendante de leur composition chimique notamment de leurs constituants majeurs. Les résultats de l'étude du pouvoir antimicrobien de 13 huiles essentielles d'origine africaine ont montré une corrélation très étroite entre la composition chimique de ces huiles et leur activité vis-à-vis de 6 microorganismes testés (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Les huiles essentielles caractérisées par une faible activité contiennent une grande quantité de composés

hydrocarbonés alors que les 3 huiles essentielles qui se sont montrées actives sont riches en composés oxygénés.

Chapitre III :

*Méthodes d'évaluation de la
diversité génétique*

III. Méthodes d'évaluation de la biodiversité

III.1. Méthodes de description variétale

La description du matériel végétal est une nécessité pour l'ensemble des activités d'amélioration génétique et de la sélection variétale des plantes. La description variétale est également la base d'identification pour la certification des variétés et des semences ainsi que pour la prévention de contrefaçons (Lombard, 2000).

Il y a différents niveaux pour observer et décrire le matériel végétal: morphologique, biochimique et moléculaire.

L'observation morphologique est la base de description du matériel végétal; elle est simple et facile à pratiquer, mais elle manque de plus en plus de précision à cause:

- de la variation importante d'expression des caractères observés due à une interaction génotype-environnement
- du manque des caractères discriminants
- du nombre croissant des nouvelles variétés
- de la base génétique utilisée de plus en plus étroite

Face aux difficultés liées à l'identification des espèces végétales et au faible niveau du polymorphisme révélé par les marqueurs morphologiques et biochimiques, les chercheurs ont eu recours à l'utilisation de marqueurs moléculaires pour compléter l'évaluation et l'étiquetage des ressources génétiques. Cependant, dans la pratique un nombre beaucoup plus élevé de marqueurs d'ADN peut être facilement détecté (Paterson *et al.*, 1991).

Les marqueurs au niveau de l'ADN (moléculaires) sont en nombre quasiment illimité et sont indépendants du stade ou de l'organe analysé, puisque l'ADN est le même dans tous les tissus. De plus ils ont l'avantage d'être plus directement utilisables pour les applications ultérieures en biologie moléculaire (Santoni *et al.*, 2000).

III.1. 1. Marqueurs morphologiques

Les caractères morphologiques contrôlés par un seul locus peuvent être considérés comme marqueurs génétiques si leurs expressions sont reproductibles sous des conditions environnementales différentes (Staub *et al.*, 1996). Ces caractères ont l'avantage d'être immédiatement disponibles, ne nécessitant pas d'équipements sophistiqués et d'être la mesure la plus directe du phénotype. Cependant, ils peuvent être influencés par des facteurs génétiques (épistasie), environnementaux (facteurs édaphiques et biotiques, climatiques), et peuvent varier selon les stades de développement de la plante.

III.1. 2. Marqueurs iso enzymatiques (Biochimiques)

Ils traduisent directement l'activité des gènes et sont généralement, des isozymes ou des protéines de réserve. Les isozymes ont été largement utilisés dans plusieurs domaines de la biologie végétale mais en cas d'analyse de la diversité génétique, leur pouvoir discriminant n'est pas très élevé. Les protéines enzymatiques constituent un matériel de choix pour les généticiens du fait, qu'elles sont codées par des gènes présentant deux propriétés importantes. D'une part, la plupart des gènes sont polymorphes à deux ou plusieurs allèles, d'autre part, les allèles sont généralement co-dominants, ce qui induit l'expression de chacun de ces allèles chez l'hétérozygote. Cette technique nous permet de tester un nombre élevé de plantes, et d'essayer plusieurs systèmes enzymatiques à partir d'un gel unique. Elle nous permet aussi d'examiner les variations génétiques au sein de taxons très proches (Belghouthi, 2006).

Vu le faible niveau du polymorphisme révélé par les marqueurs biochimiques et sa variabilité en fonction des conditions environnementales, il est souvent nécessaire d'utiliser les marqueurs moléculaires pour compléter l'évaluation et l'étiquetage des ressources génétiques. En effet, de nouvelles alternatives, comme le marquage moléculaire, sont désormais possibles pour analyser la diversité génétique.

III.1.3. Marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont un ensemble d'outils permettant de caractériser un génome de manière fiable, spécifique et rapide vu qu'ils s'adressent à l'ensemble du génome et qu'ils sont indépendants des conditions de l'environnement (Najimi *et al.*, 2003). Ces marqueurs sont d'une grande importance dans l'amélioration des plantes et dans l'identification des gènes d'intérêt agronomique.

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Un bon marqueur doit être à hérédité simple, multi-allélique et co-dominant. Les marqueurs moléculaires correspondent donc au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines, et est indépendante des conditions de l'environnement. En outre, le nombre de marqueurs observables est théoriquement illimité et le génotype d'une plante peut être déterminé à un stade très précoce, aussitôt que le matériel est disponible pour l'extraction de l'ADN. Ces marqueurs seront d'une grande importance dans l'amélioration des cultures à valeur agronomique et dans les programmes de sélection assistée par marqueurs.

Un bon marqueur moléculaire doit être :

- a. **Neutre** : ses différents allèles ne sont pas soumis à la sélection naturelle.
- b. **Polymorphe** : possédant de nombreux allèles permettant de caractériser les différents individus.
- c. **Co-dominant** : l'individu hétérozygote peut être distingué des homozygotes.
- d. **Insensible au milieu**: reproductible quel que soit l'endroit ou il est utilisé.
- e. **Non épistatique** : le locus n'agit pas sur l'expression d'autres gènes (Najimi *et al.*, 2003).

Les marqueurs idéals pour le génotypage doivent être en grand nombre et bien répartis dans le génome, locus-spécifiques et codominants, robustes, automatisables, accessibles, et doivent avoir un faible coût d'analyse (Santoni, 1996). A ce jour, les SSR peuvent être considérés de ce type.

Deux types de marqueurs moléculaires sont distingués : les marqueurs dominants bi-alléliques qui sont basés sur la présence ou l'absence d'amplification, tels que les marqueurs AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism). Ces marqueurs ne permettent pas de distinguer les hétérozygotes des homozygotes possédant l'allèle dominant. Par contre, les marqueurs co-dominants permettent de distinguer les homozygotes des hétérozygotes présentant simultanément les caractères des deux parents, cas des marqueurs SSR (Simple Sequence Repeats).

III.1.3.1. Les marqueurs AFLP (Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification)

Les marqueurs AFLP ont été développés par Vos *et al.* (1995). Ils font partie de la troisième génération des marqueurs moléculaires et représentent une sorte de combinaison entre les marqueurs RFLP et les marqueurs RAPD. Ils assurent la digestion enzymatique et la détection par autoradiographie tels que les marqueurs RFLP et l'amplification moyennant des amorces aléatoires tels que les marqueurs RAPD (figure 5).

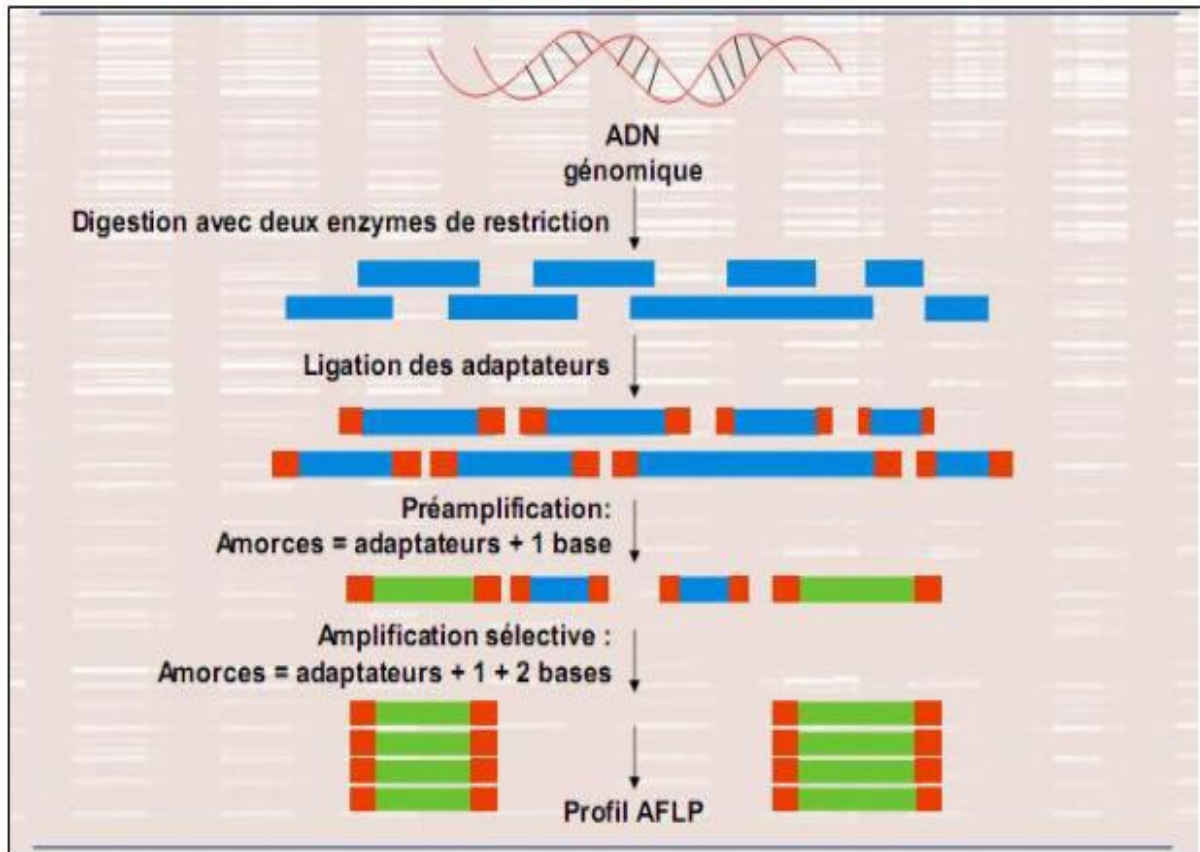


Figure 05 : Schéma représentant les étapes de la technique AFLP de Vos *et al.* (1995).

Un marqueur AFLP se caractérise par un ensemble spécifique de fragments de restriction amplifiés, il est défini par la combinaison des deux enzymes de restriction et des amorces arbitrairement utilisées. Cette technique est puissante, stable et rapide (De vienne, 1998 ; Najimi *et al.*, 2003 ; Samouelian *et al.*, 2009). L'AFLP révèle le plus de bandes en se basant conjointement sur la mise en évidence de polymorphisme de site de restriction et d'hybridation d'amorces. Elle repose sur la digestion de l'ADN par deux enzymes de restriction l'une à 6 bases (EcorI) et l'autre à 4 bases (MseI). Cette digestion est suivie par la ligation des bouts cohésifs obtenus avec des adaptateurs des deux enzymes de séquence connues, qui ajoutent une vingtaine de bases de part et d'autres des fragments générant ainsi une sorte de matrice pour l'amplification. Les fragments générés sont amplifiés en deux temps, de telle sorte que le nombre de fragments amplifiés au final et qui révéleront le polymorphisme sera réduit à une centaine. Les fragments amplifiés sont séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant puis visualisés par coloration au nitrate d'argent ou révélés grâce à un marquage radioactif ou fluorescent réalisé lors de la deuxième amplification dite sélective.

III. 1. 3.2. Les marqueurs microsatellites SSR (Répétition de séquences simples)

Les marqueurs SSR ont été développés par Tautz (1989). Ils sont spécifiques d'un locus, et constitués de répétition en tandem de motifs variables entre 1 et 6 nucléotides, qui sont dispersées sur tout le génome. Les microsatellites les plus fréquents sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n, et (GATA)_n. Les microsatellites sont extrêmement polymorphes et très nombreux. En effet, un microsatellite peut être présent en milliers d'exemplaires; à titre d'exemple, chez les plantes supérieures on estime qu'un microsatellite di-nucléotidique est présent tous les 30 à 100 kb, la même densité est observée pour les tri- et les tétra-nucléotidiques. Dans le cas des SSR, il s'agit d'un polymorphisme de nombre d'unités de répétitions. La mise en évidence de ces marqueurs est assurée par une réaction d'amplification PCR utilisant des amorces désignées à partir des séquences spécifique et flanquant du locus. La connaissance des séquences génomiques de l'espèce étudiée est indispensable pour le choix des marqueurs.

(De vienne, 1998 ; Samouelian *et al.*, 2009 ; Morgante et Olivieri, 1993).

Nous distinguons deux types de microsatellites:

- Les STRs, microsatellites des vertébrés.
- Les SSRs, microsatellites des plantes.

La technique (SSR) consiste en une première étape d'extraction de l'ADN génomique à partir de n'importe quel organe de la plante. Elle est suivie par le séquençage de l'ADN pour l'identification des SSRs et construction de banques génomiques (figure 6).

L'amplification *in-vitro* des séquences microsatellites par PCR nécessite la présence de l'enzyme (Taq polymérase), de deux amorces opérant dans deux sens opposés et de l'ADN, permettant ainsi, une amplification de certains loci microsatellites. La séparation des produits d'amplification par électrophorèse se fait, fréquemment en gel de polyacrylamide et la révélation des fragments d'ADN dans le gel se fait par coloration au nitrate d'argent.

Les bandes obtenues et leur emplacement sur le gel correspondent à la taille d'un SSR qui, est à son tour, défini par le nombre d'unités de répétition.

Un individu B, possédant plus d'unités de répétition qu'A, a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A. C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur (Erdogan *et al.*, 2002).

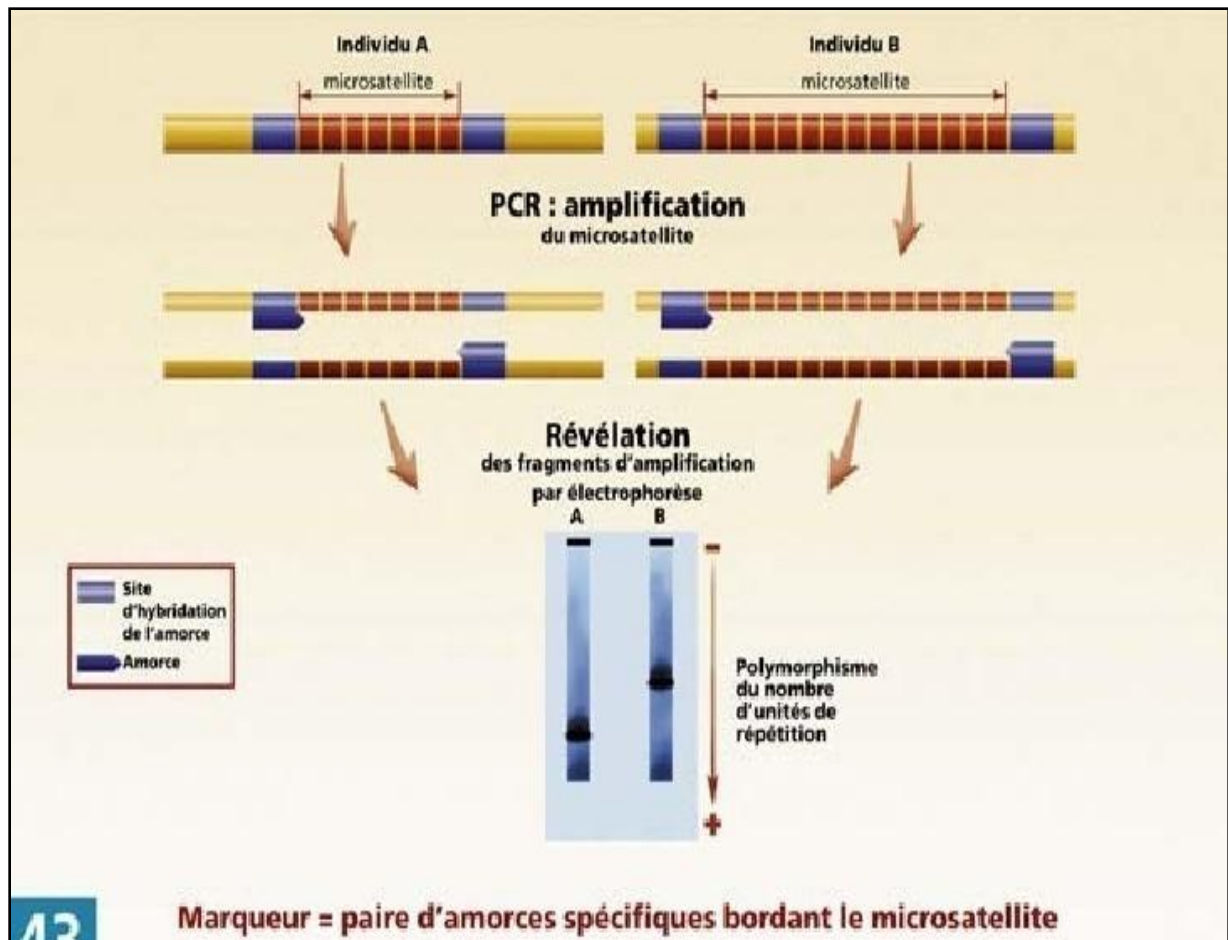


Figure 06 : Technique d'utilisation de SSR .

III.2. Technique de marquage moléculaire :

- La technique PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) fut inventée par Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une réplification *in vitro* de séquences spécifiques d'ADN. Cette méthode permet de générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel). En effet, si la séquence d'intérêt est présente dans l'extrait d'ADN, il est possible de la répliquer sélectivement (on parle d'amplification) en très grande quantité. La puissance de la PCR repose sur le fait que la quantité d'ADN matriciel n'est pas, en théorie, un facteur limitant. On peut donc amplifier des séquences nucléotidiques à partir de quantités infinitésimales d'extrait d'ADN.

À partir d'une telle masse de séquences que constitue l'ADN matriciel, la PCR peut donc sélectionner une ou plusieurs séquences déterminées et les amplifier par réplification à des dizaines de milliards de copies. La réaction terminée, la quantité extrêmement faible d'ADN

matriciel contenue dans l'échantillon PCR n'aura pas varié. En revanche, la quantité de la ou des séquences amplifiées (l'ADN d'intérêt) sera très grande.

Elle permet en quelques heures, le clonage d'un fragment d'ADN grâce à un système automatisé, alors qu'il faut plusieurs jours avec les techniques standard de clonage moléculaire. D'autre part, la PCR est largement utilisée à des fins de diagnostic pour détecter la présence d'une séquence d'ADN spécifique de tel ou tel organisme dans un fluide biologique. Elle est aussi employée pour réaliser des empreintes génétiques, qu'il s'agisse de l'identification génétique d'une personne dans le cadre d'une enquête judiciaire, ou de l'identification de variétés animales, végétales ou microbiennes destinées à des tests de qualité alimentaire, de diagnostic ou de sélection variétale.

Chapitre IV :

*Généralités sur les deux
espèces étudiées*

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

Le genre *Allium* comprend plusieurs centaines d'espèces (ex : poireau, oignon, ciboule, ail) originaire de l'hémisphère Nord (Mazouzi *et al.*, 2011).

IV.1. L'espèce *Allium cepa*

IV.1.1. Classification

Royaume : Plante

Sous royaume : Trachéophyte = plantes vasculaires

Embranchement : Spermatophytes ou Phanérogames = plantes à graines

Sous embranchement : Angiospermes = plantes à fleurs

Classe : Monocotyledonae

Sous classe : Liliidae

Ordre : Liliales

Famille : Liliaceae ou Liliacées

Genre : *Allium*

Espèce : *Allium cepa* L.

Nom commun : Oignon

Nom en anglais : Onion

IV.1.2. Origine

L'oignon (*Allium cepa* L.) est originaire de la partie sud-ouest de l'Asie Centrale (Iran, Pakistan et les républiques méridionales de l'ancienne URSS) (Jones et Mann, 1963 *In* De Bon, 1987).

L'oignon a rapidement gagné toute l'Asie; Afghanistan, Kirghizistan, Dzungarie. Il est cultivé depuis plus de 5 000 ans. Il était très apprécié des Egyptiens, surtout cru, et il possédait aux yeux des Grecs de grandes vertus thérapeutiques. Très tôt elle passe en Egypte ou les premiers témoignages picturaux dateraient de 3700 av. J-C. La migration vers la Chine et le Japon est sans doute également très ancienne (Boulineau *et al.*, 2006). C'est à la fin du

Moyen-âge qu'il arrive en Europe, surtout dans les pays du Nord et de l'Est. En France, il est essentiellement cultivé dans l'Est, mais aussi en Bretagne et dans le Nord.

L'espèce *A. cepa* n'a pas été retrouvée à l'état spontané. Son parent le plus proche, *A. vavilovii* Popov & Vved., peut encore être observé à l'état spontané dans la région sise entre l'Iran, le Turkménistan et la Mongolie (Hanelt, 1990 ; Foury *et al.*, 1992).

IV.1.3. Utilisation et production

Cette plante fut d'abord exploitée comme plante médicinale avant de devenir un condiment ou légume (De Lannoy, 2001). Il peut se consommer cru ou cuit, ou également confit au vinaigre. Ses feuilles (jeunes), aromatiques, sont parfois utilisées en cuisine.

Les oignons sont produits partout dans le monde, à différentes latitudes entre 10°S et 65°N (Foury *et al.*, 1992).

Avec une production de 320 000 tonnes, la France est le quatrième producteur européen d'oignon. L'Espagne est le premier producteur européen (21% de la production européenne), suivie des Pays-Bas (20%) et de la Pologne (15%). La production française représente 9% de la production européenne. En 2004 La production mondiale de l'oignon fut de l'ordre de 58 045 970 tonnes. En 2012, la production mondiale s'élevait à $82,85 \cdot 10^6$ t par an, avec $56,73 \cdot 10^6$ t par an pour l'Asie. La Chine est le premier producteur mondial avec 22 600 000 t par an, l'Inde avec 16 308 990 t par an et les États-Unis avec 3 277 460 t par an. Sur le continent africain, les principaux pays producteurs d'oignon sont l'Égypte avec 2 024 881 t par an, l'Algérie avec 1 183 268 t par an, le Maroc avec 855 764 t par an et le Niger avec 382 000 t par an (FAOSTAT, 2013).

IV.1.4. Description

L'oignon est une espèce herbacée, glabre, d'environ 80 cm de haut (peut atteindre 1,2 m). Vivace par son bulbe unique (composé des bases épaissies des feuilles s'enveloppant les unes dans les autres), volumineux, charnu, ordinairement simple, parfois avec des caïeux. Le bulbe est relativement gros, de forme sphérique, parfois plus ou moins aplati, arrondi plus ou moins déprimé ou ové. Le bulbe d'oignon est composé d'écailles charnues et est recouvert extérieurement d'une ou de plusieurs couches d'écailles desséchées qui sont aussi appelées tunique, de couleur blanches, jaunes, rousse ou purpurin (pourpre) violacé dont les feuilles de couleur verte bleuâtre sont cylindriques, aiguës au sommet et creuses (ce qui distingue cette espèce du poireau et de l'ail et autres espèces cultivées appartenant aussi au genre (*Allium*). La tige florifère est également creuse elle présente un renflement vers sa base (Figure 07).

À feuilles généralement cylindriques d'un vert bleuâtre, creuses également, aiguës au sommet. Les fleurs petites (de 4 à 5 mm de large) (inflorescence), blanches ou rose-violacées, sont regroupées en une très grosse ombelle sphérique en position terminale sur la tige. Les fleurs ont une symétrie trimère, à trois sépales, trois pétales et six étamines. L'ovaire unique est divisé en trois loges. Le fruit est une capsule s'ouvrant par trois valves, libérant chacune généralement deux graines. Chez certaines variétés, il arrive que des bulbilles se développent à la place des fleurs.

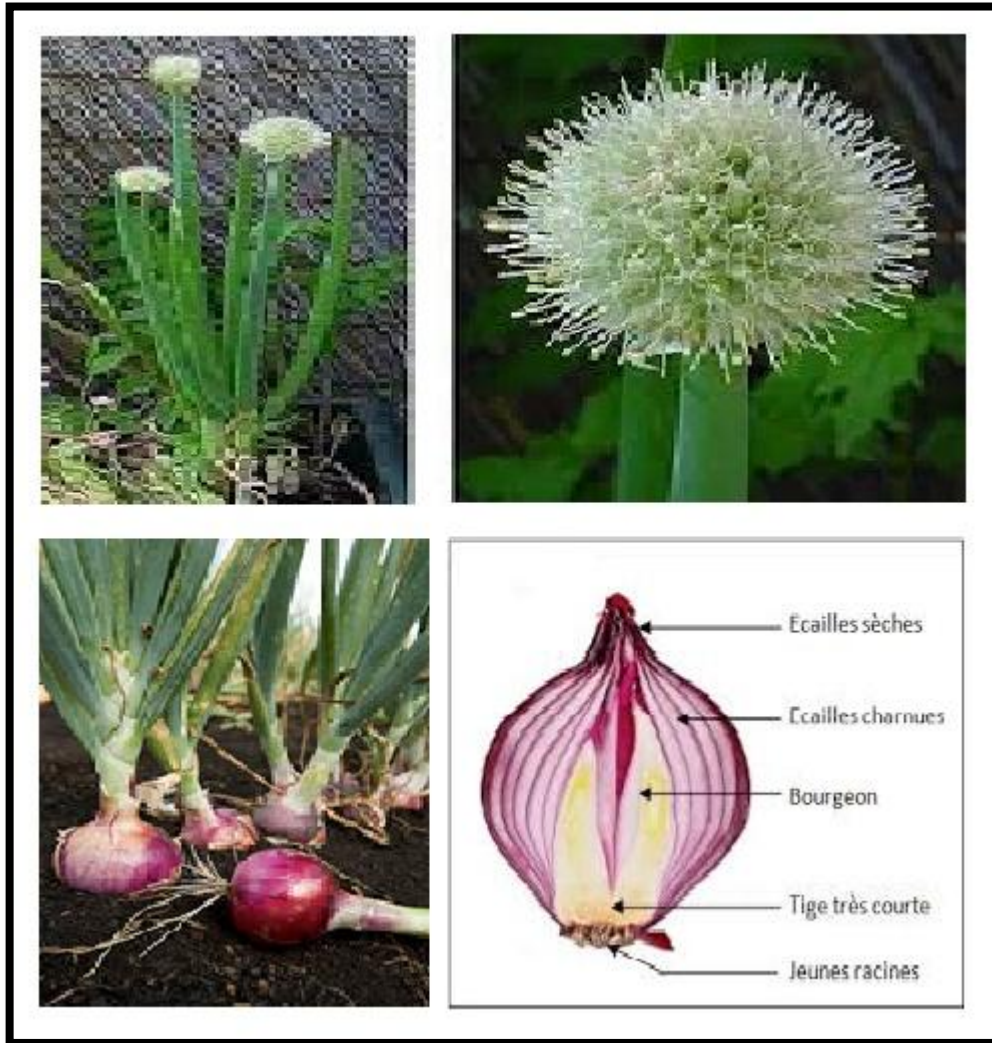


Figure 07: Description morphologique de l'oignon.

IV.1.5. Etude de variabilité chez L'oignon :

IV.1.5.1. Variabilité morphologique

Rouamba *et al.* (1997) signalent que la couleur et la forme des bulbes d'oignon sont les principaux descripteurs morphologiques qui permettent de différencier les variétés d'Afrique. Vingt-huit marqueurs morphologiques ont été identifiés à partir de caractères des bulbes, des feuilles, des tiges, des fleurs et des graines de l'oignon. Si ces marqueurs sont facilement observés à l'œil, ils ont l'inconvénient d'être dominants, d'être influencés par l'environnement et de dépendre souvent du stade de développement de la plante (Cramer *et al.*, 1999).

D'après les descripteurs des bulbes, les bulbes des variétés de l'oignon diffèrent considérablement par leur forme sphérique, aplatie, conique, allongée ; leur couleur ; leur gout et leur aptitude à la conservation (Shigyo *et al.*, 2008).

Blanche, jaune, brune, rouge ou violette, la couleur des bulbes a été utilisée comme un critère majeur pour analyser la diversité génétique, ainsi que pour classer, sélectionner et créer de nouvelles variétés de l'oignon (Kim *et al.*, 2009). Les oignons d'Afrique de l'Ouest sont de couleur violette, blanche et parfois jaune, alors que les autres pays d'Afrique montrent une dominance des variétés à bulbes rouges ou jaunes (Currah, 2002).

La couleur est principalement régie par une série de gènes à hérédité mendélienne mono- et oligogénique (Reiman, 1931). La couleur blanche du bulbe peut être attribuée soit à un gène inhibiteur (II) de couleur incomplètement dominant, qui supprime toute coloration, soit à un gène récessif (*rr*) conduisant aux mutants incolores apparus dans les variétés de couleur rouge, jaune ou brune. Davis *et al.* (1967) et Kim *et al.* (2004) indiquent l'existence d'un autre allèle (*P*) indépendant qui contrôle la couleur violette des bulbes. Selon Fossen *et al.* (1996), la présence des composés flavonoïdes de la famille des anthocyanes produit au niveau du bulbe des couleurs variant du rouge au violet.

IV.1.5.2. Marqueurs biochimiques

24 enzymes différentes ont été caractérisées dans les graines et les racines pour analyser la diversité entre l'espèce *A. cepa* et les autres espèces du genre *Allium* (Cramer *et al.*, 1999). L'analyse de la diversité génétique dans une collection de 188 variétés améliorées de l'oignon originaires des États-Unis à l'aide des enzymes alcool déshydrogénase (ADH), isocitrate déshydrogénase (IDH), phosphoglucomutase (PGM), phosphoglucoisomerase (PGI) a permis de montrer que seule l'enzyme alcool

déshydrogénase est polymorphe entre les variétés de l'oignon (Peffley *et al.*, 1987). Cependant, Rouamba *et al.* (2001) signalent que les enzymes alcool déshydrogénase (ADH), 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH), estérase (EST), phosphoglucomutase (PGM), phosphoglucoisomerase (PGI) et malate déshydrogénase (MDH) sont polymorphes au sein de 16 écotypes d'oignon originaires de six pays d'Afrique de l'Ouest.

L'évaluation de la diversité génétique des écotypes d'oignon provenant de l'Afrique de l'Ouest, à l'aide de quatre enzymes (ADH, 6-PGDH, PGI et MDH), a permis à Rouamba *et al.* (1997) de séparer des variétés provenant des pays francophones : Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Mali, Niger, des variétés du Nigeria, anglophone. Ces auteurs suggèrent l'absence de flux de gènes entre ces cinq pays francophones et le Nigeria. En général, l'analyse de la diversité génétique de l'oignon d'Afrique, à l'aide de marqueurs enzymatiques, montre une homogénéité biochimique entre plusieurs variétés ou entre individus d'une même variété, qui ne se reflète pourtant pas au niveau phénotypique, en particulier pour la forme et la couleur des bulbes (Rouamba *et al.*, 2001).

Par ailleurs, le polymorphisme des enzymes estérase, alcool déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase, phosphoglucoisomerase a été utilisé pour distinguer le profil génétique de l'oignon, de la ciboule et les hybrides des deux espèces (Cryder *et al.*, 1991 ; Peffley *et al.*, 2000).

IV.1.5.3. Marqueurs moléculaires

Les marqueurs *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Target Region Amplification Polymorphism* (TRAP) et *Simple Sequence Repeats* (SSRs) ont été utilisés avec succès pour refléter des variations organoleptique et morphologique entre les différentes variétés de l'oignon, ainsi qu'entre l'oignon et d'autres espèces du genre *Allium* (Klaas *et al.*, 2002).

Les marqueurs dominants AFLP ont été peu utilisés pour l'analyse de la diversité génétique de l'oignon à cause de la taille du génome nucléaire, du nombre élevé d'hétérozygotes et du faible taux de la diversité allélique (Van Raamsdonk *et al.*, 2003). D'après King *et al.* (1998), les marqueurs AFLP ont révélé une absence de polymorphisme chez les variétés hybrides et les variétés paysannes de l'oignon originaires d'Europe, du Nord des États-Unis et du Japon.

Fischer *et al.* (2000) ont été les premiers à développer 30 marqueurs microsatellites génomiques (SSRg) qui ont permis d'analyser la diversité entre 83 variétés de l'oignon venant d'une vingtaine de pays d'Europe, d'Amérique et d'Asie. Cependant, seuls quatre marqueurs sont polymorphes, ce qui ne permet pas la discrimination inter-variétale. Plus tard, Kuhl *et al.* (2004), Martin *et al.* (2005), McCallum *et al.* (2008), Kharl *et al.* (2010) et Baldwin *et al.* (2012) ont identifié des marqueurs SSRg et SSRest (*Expressed Sequence Tag*): ceux-ci ont conduit non seulement à la discrimination entre les variétés de l'oignon, mais aussi à mieux caractériser la diversité génétique intra- et inter-variétale.

IV.1.6. Les différentes variétés d'oignons

L'espèce *Allium cepa* renferme trois groupes, à savoir les oignons communs, les oignons *A. aggregatum* et oignon *A. prolifum*, tous diploïdes ($2n = 2x = 16$) (Silué *et al.*, 2010). Près de 900 variétés d'oignons sont inscrites au catalogue européen des espèces et des variétés. Parmi celles-ci, 52 variétés sont inscrites au catalogue officiel français en 2014. Dans le cas de l'oignon commun, ses variétés sont généralement classées en deux catégories selon l'extérieur de leur bulbe (blanc ou coloré). La forme et la taille du bulbe varient selon la variété, de 2 à 20 cm, aplati, sphérique, piriforme, etc. En Algérie, de nombreuses variétés sont cultivées: doux, blanca ou jaune, rouge fort, hâtif, extra hâtif.

Les oignons rouges ont une chair qui est ferme. Ils ont une saveur douce car ils sont légèrement plus sucrés que l'oignon jaune mais ce sont ceux qui font le plus pleurer. On les plante au printemps et se récoltent au mois d'août. Ils se conservent longtemps.

Les oignons jaunes sont les oignons les plus courants et les plus utilisés en cuisine. Ils ont une odeur assez forte et un goût très prononcé. Comme les oignons rouges, on les plante au printemps et on les récolte en août. Une fois séchés au soleil, les oignons jaunes se conservent longtemps.

Les oignons blancs ont un goût plus piquant que celui de l'oignon jaune, ils sont plantés en automne et se récoltent au printemps. Mais une fois récoltés, ils ne se conservent pas plus d'une semaine.

En Afrique de l'Est et australe, les oignons sont représentés par des variétés originaires de l'Europe et des États-Unis, ce sont en général des variétés de jours moyens, bien adaptées aux conditions tropicales et subtropicales. Le Botswana, le Zimbabwe, la Zambie montrent une dominance des variétés à bulbes jaunes 'Yellow Gramex' et 'Yellow Creole'. Au Kenya, en Tanzanie et en Ouganda, les variétés les plus cultivées sont des variétés importées,

comme ' Red Creole ' ou ' Rouge créole ', ' Bombay Red ' ou ' Rouge de Bombay ', ' Texas Early Grano ' et les variétés hybrides ' Tropicana F1 ' et ' Dessex F1 '. Dans les régions montagneuses d'Afrique orientale, les échalotes remplacent les oignons à cause du climat trop humide. Le cycle végétatif des échalotes est suffisamment bref pour permettre deux cycles de production par an.

En Afrique du Nord, les variétés d'oignon les plus communément observées, ' Rouge d'Amposta ' (Maroc et Algérie), ' Giza 6 ' et ' Giza 20 ' (Égypte), et ' Ultra Red ' (Tunisie), sont de jours moyens et caractérisées par des bulbes de couleur rouge (Currah, 2002).

IV.1.7. Composition chimique

Le bulbe d'oignon frais renferme des fructanes de faible degré de polymérisation (10 à 40 %), et des polysaccharides hétérogènes, des flavonoïdes (principalement des glucosides du quercéto). Dans les oignons colorés: 2.5- 6.5 % sont des saponosides (glycosides de furostanols), des stérols (cholestérol, stigmastérol, β -sitostérol,...), vitamines (A, C, B1 et B2), pectine, anthocyanines et des composés soufrés : sulfoxyde de trans-(+)-S- (1-propényl)-L- cystéine (= isoalline) et autre dérivés de la cystéine (alkyl- et alcénylecystéines et les dérivés sulfoxydes correspondants). Lorsque l'oignon est coupé ou contusé, les sulfoxydes sont dégradés par l'allinase contenue dans la vacuole de la cellule, alors il y a libération de l'acide pyruvique et des alkylthiosulfonates –composés simples- instables et rapidement transformés en disulfures (ex . :disulfure de dipropyle); le trans-(+)-S-(1-propényl) cystéine sulfoxyde (précurseur du facteur lacrymogène), et pour sa part transformé, via l'acide 1- propènesulfénique, en S –oxyde de Z – propénéthial (= S- oxyde de thiopropanal).

Parmi ces thiosulfonates: méthyl méthanethiosulfonate, alkyl (E)-1- propene thiosulfonate, (E,Z)-1-propényl alkanethiosulfonates, propyl propanethiosulfonate, avec le facteur lacrymogène contribuent au goût et à l'arome de l'oignon, qui subissent après un temps plus ou moins court, une décomposition (transformation) en sulfures: di-, tri-, tetrasulfures,... et autres constituants responsables de l'odeur de l'oignon spécialement le méthyl propyl disulfure, méthyl propyl trisulfure et dipropyl trisulfure . D'autres composés ont également été caractérisés dans les extraits: cépaènes (α -sulfinyldisulfures), zwiebelanes (dérivés disoufrés bicycliques), di- et tripeptides soufrés.

IV.1.8. Propriétés pharmacologiques et emplois

L'oignon est en effet doté de propriétés désinfectantes, il participe même à faire baisser le taux de sucre dans le sang (antihyperglycémiant). Deux principes actifs sont responsables de cette action : le disulfure d'allyle propyle et la diphenylamine.

Leur mécanisme d'action reste incertain, mais ils ne font pas intervenir une libération d'insuline (Karawa et Abdel Wahab, 1984). L'oignon est utilisé pour traiter l'inappétence et en prévention contre l'artériosclérose par l'intermédiaire des actions sur la coagulation, en réduisant la cholestérolémie et en maintenant élevé le taux de lipoprotéines hautes densité dans le sang. En outre, l'oignon agit positivement sur l'hypertension, le rhume, la goutte, le rhumatisme, la grippe, la palpitation cardiaque ou sur le système cardiovasculaire en diminuant les facteurs de risques chez les sujets sains et en diminuant les impacts des modifications cardiovasculaires chez les sujets malades (Kendler, 1987). Il est également utilisé en cas de nervosité (Bruneton, 2009). Il possède aussi une activité antiagrégante plaquettaire et fibrinolytique liée à certains composés soufrés, la plupart sont des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase et de la lipooxygénase. Ces extraits ont également une activité anti-asthmatique et antiallergique cutanée. Ses effets dans la prévention de certains cancers ont été étudiés: La consommation régulière de l'oignon réduit considérablement le risque du cancer de l'estomac. Les dérivés soufrés sont néanmoins ici aussi mis en cause : ils pourraient interférer lors des phases d'initiation et de promotion de la carcinogenèse (Galeone *et al.*, 2006).

L'activité antimicrobienne de l'oignon et ses extraits est connue depuis longtemps; le premier qui a noté cette activité était Louis Pasteur en 1858. Virtanen a étudié aussi en 1958 l'activité antibactérienne de l'oignon haché.

Le jus d'oignon possède une forte activité contre notamment *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus milleri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*. Concernant l'activité antifongique, une efficacité a été démontrée envers *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Jardon, 1990). Les dérivés soufrés seraient en partie responsables de ces activités.

L'effet antimicrobien du méthyl methane thiosulfinate, propyl propane thiosulfinate et les thiosulfates trouvés dans les extraits d'oignon, est plus faible que celui de l'allicine.

IV.1.9. Récolte et conservation

La récolte de l'oignon de couleur se fait de juin à septembre à maturité lorsque les feuilles sont sèches. Pour les oignons destinés à la conservation, ils sont d'abord arrachés, ils séchent plusieurs jours sur le sol, puis ils sont conservés après équeutage et séchage, à 65% d'humidité relative (HR %) et à température de -3 à 0°C.

Pour la vente en sec, le stade optimal est atteint quand le feuillage est aux 2/3 secs, ce qui correspond à l'arrêt de croissance et que les racines plus ou moins sèches ne retiennent plus le bulbe au sol. Le séchage et la conservation des bulbes sont des opérations longues et minutieuses ; Ils sont soumis à un séchage complet immédiatement après récolte. Par temps sec et chaud, les oignons sont laissés au sol pendant quelques jours jusqu'à ce que les tiges vertes, la pelure et les racines soient complètement séchées.

La nécessité de sécher l'oignon se fait pour plusieurs raisons. Entre autres le col des oignons est très sensible à la décomposition, s'il reste humide, surtout si les tiges vertes sont coupées avant la récolte.

Il n'est pas recommandé de couper les tiges vertes des oignons et d'éviter l'équeutage et l'excès d'humidité en cours de conservation.

IV.2. *Allium sativum* L:**IV.2.1. Classification:** (Burdock, 1995).

Royaume : Plante

Sous royaume : Trachéophyte = plantes vasculaires

Embranchement : Spermatophytes ou Phanérogames = plantes à graines

Sous embranchement : Angiospermes = plantes à fleurs

Classe : Monocotyledonae

Sous classe : Liliidae

Ordre : Liliales

Famille : Liliaceae ou Liliacées

Genre : *Allium*

Espèce : *Allium sativum* L.

Nom commun : Ail

Nom en anglais : Garlic.

IV.2. 2. Origine

L'ail *Allium sativum* L. provient à l'origine d'Asie centrale mais ayant été introduit très tôt dans de nombreuses civilisations, beaucoup en revendiquent la paternité. Plus précisément, on suppose que son berceau serait situé dans les plaines à l'Est de la mer Caspienne (Kazakhstan, Ouzbékistan et Turkménistan), régions où il pousse encore à l'état sauvage. L'ail est une plante existante approximativement depuis de 5000 à 7 000 ans (Etoh, 1997). Vers 2000 ans avant J.-C., il traversa le Moyen-Orient et atteignit l'Égypte, où marchands et nomades contribuèrent à le répandre dans le sud de l'Europe. Les phéniciens le transportèrent plus au nord en Europe méridionale. Les Romains l'introduisirent en Europe de l'ouest dans les provinces qu'ils conquièrent, dont la Grande-Bretagne. Plus tard, l'ail voyagea sur les mers du globe emporté par les Vikings. Concernant l'ancêtre de l'ail cultivé, plusieurs travaux proposent que ce soit *Allium longicuspis* Regel, car les deux espèces sont morphologiquement et caryologiquement similaires, de même *A. longicuspis* peut être rencontré dans la partie Ouest de la montagne Tien Shan à Kirgizstan qui est le centre d'origine de l'ail (Etoh et Ogura, 1984). Ce bulbe est sans doute l'un des légumes les plus anciennement cultivés par l'homme qui l'utilisait autant pour son alimentation que pour sa santé.

IV.2. 3. Utilisations et production

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

En agriculture organique, l'ail présente aussi un effet insecticide à divers caractéristiques (naturel, écologique, biodégradable, non toxique, fortement soluble en eau). L'utilisation des extraits d'ail en combinaison avec d'autres extraits comme pesticide naturel est efficace pour le contrôle de maladies et d'insectes (Morton, 2006; Diniz *et al.*, 2006; Prabu, 2008).

La production mondiale annuelle de l'ail se caractérise par une augmentation constante au cours de la dernière décennie. En effet, on constate une notable progression des

superficielles plantées et de la production dès l'année 2007. La superficie totale cultivée en 2012 s'élève à 1465772 ha, soit une augmentation de 28.32 % par rapport à l'année 2003. Cette augmentation s'est accompagnée par une amélioration très considérable de la production estimée à plus de 80 % due à l'amélioration des rendements (FAOSTAT-2012).

La Chine est le principal pays exportateur de l'ail au niveau mondial car elle est le leader de la production mondiale par 80.53 % du total avec une production de 20 millions de Tonnes, suivi par l'Inde avec 4.63 %. Les autres principaux producteurs sont la République du Corée, l'Égypte, la Russie, Bangladesh, Éthiopie, Myanmar, USA; USA et l'Ukraine avec un taux global de 7.75 % (FAOSTAT-2012). Par ailleurs, l'Algérie occupe la 20^{ième} place au niveau mondial avec 0.31 % de la production total. Alors qu'au niveau africain, elle se positionne en troisième place après l'Égypte et l'Éthiopie avec un taux de 11.57 % de la production totale africaine (ONS-2010).

La qualité de l'ail est évaluée par ses caractéristiques sensorielles, principalement la couleur et l'intensité de la saveur (Mendez lagunas, 2006).

IV.2. 4. Description

L'ail (*Allium sativum*) est une petite plante herbacée vivace, à des feuilles linéaires plates, longues et étroites. La tête d'ail est un bulbe formé de caïeux (les gousses), insérés sur un plateau d'où partent les racines. L'ensemble des caïeux est enveloppé dans une fine pellicule blanche ou rose. Le nombre de caïeux par bulbe varie de 5 à 16 caïeux.

D'une tige sortant du bulbe et se terminant en ombelle globuleuse, elle peut atteindre 1.2 m de haut. Avec des fleurs blanches ou rougeâtres entourées, avant la floraison, d'une longue spathe membraneuse caduque, terminée en pointe (Figure 08).

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



Figure 08: Description morphologique de l'ail.

IV.2. 5. Espèces et variétés

Selon la classification de Messiaen (1996), l'ail *allium sativum* se classe principalement en 03 espèces ; *sativum*, *ophioscorodon* et *pekinense*. Alors que Engeland (1991) l'a classée seulement en deux ; *A. sativum var. sativum* et *A. sativum var. ophioscorodon* ; *A. sativum var. sativum* ne développe pas la hampe florale en conditions normales de la culture (ail à tige tendre) contrairement à *A. sativum var. ophioscorodon* qui est reconnu par la production de la hampe florale et des graines mais sont stériles. Les variétés qui émettent de hampe florale sont de la région méditerranéenne et se cultivent dans de nombreux pays (Lallemand *et al.*, 1997).

Le groupement de l'ail peut se faire selon les besoins écophysologiques (Burba et Casali, 1982; Burba *et al.*, 1993; Messiaen *et al.*, 1994). Tandis que Maass et Klaas (1995), proposent une classification en 4 groupes, fondée sur les caractères morpho-physiologiques et une analyse phylogénétique avec des marqueurs biochimiques et ADN : Groupe Sativum, Groupe Ophioscorodon, Groupe Longicuspis et Groupe Subtropical, leur répartition en Afrique est liée aux conditions climatiques mais aussi aux hasards de leur introduction (Messiaen et Rouamba, 2004). Les recherches de Messiaen *et al.* (1993); Burba (1995) et Engeland (1991-1995) ; ont classées cette variabilité dans 06 groupes variétaux. Actuellement près de 130 cultivars sont inscrits au Catalogue européen des espèces et variétés et près de 35 au Catalogue officiel français.

➤ Groupe I

Variétés méditerranéennes à hampe florale, 2 feuilles fertiles, prédominantes en Espagne (Rose d'Espagne), présentes aussi en France (Rose de Lautrec), en Italie péninsulaire (Rose d'Itali), Croatie et Algérie. Une variété cultivée en Afrique de l'Ouest (Sénégal, Niger) peut être rattachée à ce groupe, ainsi qu'un clone collecté par Etoh à Amboine (Indonésie). Ce sont des variétés à hampe florale, 2 feuilles florales, ont une forte dormance. Elles présentent des bulbes réguliers, bien structurés et des caïeux moyens. La coloration des caïeux va du rose pâle au rouge vineux. Burba donne à ce groupe le n°IV ("colorados") et Engeland l'appelle "créole". Clones inscrits au catalogue français: Ibérose, Goulurose, Sultop, Morasol, Morasur.

➤ Groupe II

Variétés de climats tempérés, ou méditerranéens à hivers froids. Ces variétés sont prédominantes en Italie du Nord, plantées au printemps en France (Rosé du Var, Ail du Nord, Rose d'Auvergne) et dans de nombreux pays tempérés. Sans hampes florales, plus de 3 feuilles fertiles de forte dormance. Le bulbe est moyen 10-12 bulbilles, les caïeux à tunique rose ou nacré. Burba les intègre dans son groupe III "Blancos", Engeland les appelle "Silverskin". Clones inscrits au catalogue : Printanor, Moulinor, Jardinor, Cristo, Gayant. Ces deux groupes présentent le même profil enzymatique désigné par "Iib" par Maass.

➤ Groupe III

Variétés méditerranéennes, représentées en France par les "Blancs" de la Drôme et de Limagne, et le violet de Cadours. Elles sont présentes aussi en Espagne du Sud, en Roumanie, en Californie (California early). À gros bulbes, irréguliers, 8-12 bulbilles à tunique blanches de forts calibres, sans hampes florales, plus de 3 feuilles fertiles moins dormantes que les précédentes. Profil enzymatique Iic, sans hampes florales, moins dormantes que les précédentes. On peut y rattacher des variétés cultivées en Chine du Sud et à Taïwan, plus précoces, et cultivables en conditions tropicales, mais morphologiquement analogues (les isozymes confirment). Burba confond ce groupe avec le précédent dans ses "blancos", Engeland les dénomme "artichoke". Ce groupe est représenté dans le catalogue français par: Thermidrôme, Messidrôme, Germidour, Jolimont, Corail, Novatop et "Vigor Supreme" (importé d'Amérique).

➤ Groupe IV

Variétés sud-méditerranéennes ou tropicales de plaine, présentes dans les zones chaudes (Sud et est Méditerranée jusqu'au Yémen, Guinée, Antilles, Réunion, Inde du Sud,

Amérique du sud, nommé n° II, subtropical par certains auteurs. Représenté en France par la variété '*Ramsès*'. à hampe florale plus ou moins développée, 3 feuilles fertiles, à caïeux (bulbilles) très nombreux 20-40 à tunique blanche ou rose incluse dans une tunique blanche ou violette, très peu dormantes, profil enzymatique Iia. Engeland ne semble pas avoir observé de variété de ce type. Le groupe est homogène pour les isozymes : " Iia " pour Maass. Mais le même profil enzymatique est partagé par un autre groupe, que nous appellerons " asiatique précoce ". Les groupes I, II, III et V, plus les asiatiques précoces, constituent pour Maass et ses collègues botanistes de l'IPK (Gatersleben) la variété botanique *Allium sativum* var. *sativum*.

➤ Groupe V

De climat continental présent principalement en Europe de l'Est (Roumanie, Tchécoslovaquie, Pologne), mal adaptées au climat méditerranéen, où elles dégénèrent. Elles sont au contraire très bien adaptées chez Ron Engeland (Washington State - 4 mois de neige), qui les appelle " rocambole ". À hampes florales, 2 feuilles fertiles, à bulbilles plus grosses que celles du groupe I et caïeux très nombreux et dormance très faible. Profil enzymatique III.

Burba les place à côté des " colorados " dans son groupe IV, sous le nom de " ruso ". Ce groupe porte pour Maass le n°III et constitue la variété botanique *ophioscorodon*.

➤ Groupe VI

Groupe variétal subtropical, il s'agit de variétés tropicales de montagne. Rencontré au Mexique, Pérou, Égypte, La Réunion, Madagascar, Thaïlande, Viet-Nam. Nommé tropical, n°I par certains auteurs, à hampe florale le plus souvent incluse dans la fausse-tige, plus de 3 feuilles fertiles, précoces, besoin en froid assez élevé. Bulbilles plus grosses que le groupe V et moins nombreuses (5-10) à tunique bulbaire violette. Dormance faible. Profil enzymatique VB, VA. .

Ce groupe est homogène pour les isozymes : " Vb " pour Helga Maass, qui trouve cependant, une variante " Va " en Inde du Nord. Engeland ne semble pas avoir observé de variétés de ce type. Burba le qualifie de " tropical " (n° I). Ce groupe mérite, pour les chercheurs de l'IPK, le rang de variété botanique, mais ils ne lui ont pas encore trouvé de nom latin, le qualifiant de " subtropical".

IV.2. 6. Composition chimique

L'ail apporte 130 kcal pour 100 g, ce qui est plus élevé que la plupart des légumes, mais qui est dû à sa plus faible concentration en eau. Par conséquent, il contient des enzymes exp: alliinase peroxydase, des protéines 16.8% du poids sec, des minéraux, des vitamines: thiamine – riboflavine – niacine ..., des amino acides. Ses fortes teneurs en potassium, phosphore et vitamine B6 peuvent paraître plus intéressantes que dans d'autres végétaux. Cependant, comme la quantité que l'on consomme généralement n'est de l'ordre que de quelques grammes, l'apport final reste insignifiant (Bernadet M. 2000).

Outre son apport en vitamines et minéraux, le bulbe d'ail contient des polysaccharides (cellulose et fructane), des substances stéroïdiques, dont des saponines, qui joueraient un rôle dans ses capacités médicinales (Bezanger et al., 1990 ; Block et al., 1984) , mais ses qualités pharmacologiques sont principalement attribuées à ses composés soufrés, tels que l'alliine, l'allicine ou l'ajoène, dont la teneur peut varier fortement selon le cultivar, l'origine géographique, l'époque de la récolte, ou encore les conditions de stockage (Block et al., 1984).

Le constituant principal de l'ail frais non contusé est l'*alliine* ou *sulfoxyde de S-allyl-L-(+)-cystéine*, il y a aussi le S-(E)-1-propenyl cysteine sulfoxyde et le S-méthylcysteinesulfoxyde. Ces trois composés sont des amino acides non protéiniques du métabolisme secondaire de l'ail.) (Benzeggouta, 2005).

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). L'oxydation à l'air de l'alliine conduit au 1,7-dithioocta-4,5-diène, connu sous le nom de disulfure de diallyle : c'est le constituant majoritaire de l'essence d'ail. L'analyse fine des extraits alcooliques d'ail montre également la présence de produits de condensation de l'alliine, les 6Z –et 6E-ajoènes (4, 5, 9-trithiadodéca- 1, 6, 11-triène-9-S-oxyde) et de produits de cycloaddition du propènethial (vinyldithiines). Il a été montré que beaucoup de composés identifiés en CPG dans les diverses (essences) d'ail ne sont que des artefacts. L'analyse en chromatographie liquide, des produits obtenus par simple distillation sous vide poussé et à température ambiante ne met en évidence que des thiosulfates R-S (O) S-R, l'alliine (R =R = allyl) étant nettement prépondérante (80-90%). Cette variation de composition selon la forme (essence, extraits alcooliques ou huileux, ail frais, poudre d'ail, ail (vieilli), rend souvent

délicate l'interprétation et la comparaison des résultats des études pharmacologiques ou cliniques (Brenton, 2009).

IV.2. 7. Propriétés pharmacologiques et emplois

La forme la plus utilisée pour les essais cliniques est la poudre d'ail habituellement standardisée en alléine. Elle a une composition proche de celle de l'ail frais, 300 mg de poudre étant équivalents à 1 g d'ail frais (Bruneton, 2009)..

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.

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, la bronchite chronique, mal de dents, douleurs d'oreille, pellicules, hypertension, artériosclérose, hystérie (Leung, 1980).

Plusieurs de ces usages traditionnels de l'ail ont été vérifiées expérimentalement. 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 (Lapin et Rat). Egalement, c'est un antiathéromateux capable de faire diminuer les triglycérides et le cholestérol sanguins et d'augmenter le taux des HDL. Une alimentation suffisamment riche en ail diminue l'agrégation plaquettaire et augmente l'activité fibrinolytique, d'où l'intérêt de la plante dans la prévention des thromboses (Bezanger *et al.*, 1990 ; Block *et al.*, 1984)

C'est aussi un expectorant, larvicide, insecticide (Leung, 1980), hypoglycémiant, antiviral, et prévient de certains cancers notamment, le cancer de l'estomac (Jonkers *et al.*, 1999 ; O'gara *et al.*, 2000).

Les activités antibactériennes et même antifongiques de l'ail ont été mises en évidence *in vitro*. L'ail possède un large spectre d'activité antibactérienne et ceci contre des germes Gram positif et Gram négative notamment les espèces appartenant aux genres : *Bacillus* et *Proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Erwinia carotovora*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Le principe actif responsable est l'allicine dont le mécanisme d'action consiste en un changement du profil lipidique de la membrane cellulaire bactérienne.

L'huile essentielle extraite de l'ail possède les mêmes usages et propriétés que l'ail frais ou ses extraits inhibent à différents degrés, la prolifération *in vitro* de *Staphylococcus aureus* et de *Staphylococcus enteritidis*. Les souches d'enterocoques et autres bactéries pathogènes intestinales responsables de diarrhées aussi bien chez les humains que chez les animaux, sont plus facilement inhibées par l'ail que la flore commensale intestinale (Gotez *et al.*, 2012).

IV.2. 7. Production

Les cycles culturaux de l'ail sont sous la double dépendance du climat et de la variété.

- les variétés d'automne sont plantées avant décembre et récoltées en fin juin -début juillet (entre 7 à 8 mois).
- Les variétés de printemps ou alternées sont plantées en février-mars, pour une récolte de mi-juillet à début août ; et en fin janvier –début février pour une récolte dans le courant de juillet.

IV.2. 8. Récolte et conservation

On considère que l'ail est mûr lorsque il reste seulement 3 - 4 feuilles vertes (le tiers supérieur des feuilles est jaune ou sec) et les feuilles commencent à s'enrouler.

La récolte de l'ail s'effectue en fonction de la date de plantation et elle peut être manuelle ou mécanique. Dans ce dernier cas, le producteur veillera au bon réglage des appareils de récolte afin de limiter la hauteur de chute à 50 cm maximum. il est préférable de l'arracher un peu vert et le laisser sécher à l'air sur le sol entre deux et huit jours selon le temps qu'il fait, en prenant soin de poser chaque poignée de telle sorte que les têtes des unes couvrent les queues des autres. L'ail est fort sensible aux coups de soleil qui bleuiraient sa peau délicate et entraveraient sa conservation. Cependant, la plupart de la récolte se fait vers la fin juin-début juillet, lorsque les bulbes sont bien mûrs.

Le déclenchement de la récolte doit être raisonné :

- Réalisation des mesures par pesées des bulbes et des feuilles sur un échantillon de 20 plantes.
- Observation du début de dessèchement des feuilles.

En ce qui concerne la conservation, le bulbe d'ail est de type "semence molle", pour cela une fois arraché, il doit être bien nettoyé et séché afin d'éviter les moisissures (Dossier I.G.P, 2005) . L'ail destiné à la semence doit être conservé dans un local sombre bien aéré et sec ; au froid (de -0,5 à 1 °C) ou au chaud (plus de 12-15 °C) pour empêcher toute

germination. L'ail frais peut être gardé pour 1-2 mois à des températures ambiantes (20°C - 30°C). La conservation de l'ail peut durer 4 à 12 mois, selon les variétés, à une température de 2-4 °C une humidité de 50 – 60 % (Takagi, 1990).

IV.2. 9. Etude de variabilité chez l'ail :

IV.2. 9.1. Variabilité morphologique

Il existe dans le monde plus de trente variétés d'ail blanc et l'ail rose. Chaque région du monde possède sa propre collection de variétés.

Malgré que l'ail se multiplie par voie végétative, par caïeux, bulbes ou bulbilles, mais cette situation n'a pas empêché *Allium sativum* L. de présenter une grande variabilité morphologique et physiologique qui permet sa culture de la Pologne à la Martinique (Langerano *et al.*, 1995 ; Avato *et al.*, 1998). En se basant sur cette variabilité, les clones ont pu être identifiés pour obtenir des cultivars adaptés localement à des types de sols, les températures et la durée du jour.

La floraison peut être obtenue chez les cultivars pourvus de hampes florales par ablation des bulbilles d'inflorescence, mais la plupart des variétés soumises à ce traitement ne produisent pas de graines - excepté certains clones d'Asie centrale et du Caucase collectés par Etoh (1988) qui a montré que la variabilité des géniteurs semblent a priori assez faible. Deux types morphologiques seulement, différent par le nombre et la taille des caïeux (Messiaen *et al.*, 1993). Messiaen *et al.* (1989) ont montré que l'observation des premiers bulbes composés issus de graines révèle cependant, en plus d'une variabilité morphologique reproduisant celle des parents, une intéressante diversité de coloration des caïeux, qui va de rouge vineux intense au gris-mauve clair.

Pour le moment, la sélection clonale est la méthode la plus efficace d'amélioration de l'ail (Lampasona *et al.*, 2003). Les clones issues de la propagation présentent une large diversité phénotypique : la taille de bulbe : forme et couleur, le nombre de caïeux et la date de maturité, la saveur et l'âcreté, la capacité à former la hampe floral, le nombre et la taille des bulbilles, la formation des fleurs dans l'inflorescence et la fertilité (Astley *et al.*, 1982; Hong *et al.*, 2000; IPGRI, 2001; Kamenetsky *et al.*, 2004) ; et de même une variabilité des caractères agronomiques tels que le stress et la tolérance à la sécheresse (Panthée *et al.*, 2006).

Aujourd'hui il existe d'autres moyens d'explorer la variabilité intraspécifique : les marqueurs biochimiques et en particulier les isozymes. Dans le cas de l'Ail, après Etoh

(1988), Pooler et Simon (1993), Lallemand *et al.*, (1994), Maass et Klass (1995) ont choisi l'étude des isozymes sur de vastes collections de variétés.

IV.2. 9.2. Variabilité génétique

La variabilité génétique actuelle provient essentiellement de mutations progressives, stables, parfois encore observables comme dans les mutants de couleur de feuillage, ou instables (exemple de la variation de couleur des tuniques chez le type Lautrec). Au niveau mondial, cette variabilité est encore très large : - adaptation physiologique aux effets de la latitude ou de la photopériode, besoins en froid pour la montaison des hampes florales, température de conservation, précocité, etc. ; - taille, couleur des bulbes, disposition des caïeux par rapport aux tuniques ; - taux de multiplication. Messiaen a décrit et classé ces variabilités physiologiques, phénotypiques et biochimiques selon une nomenclature en 6 groupes, concernant les variétés occidentales, mais qui n'inclut pas celle d'Asie (Proche-Orient, centre d'origine en Asie centrale et Extrême Orient tempéré) (Brand, 1996).

Des études biogéographiques, biochimiques et moléculaires suggèrent que le plus haut niveau d'hétérogénéité se retrouve dans le groupe de cultivars d'Asie centrale (Pooler et Simon, 1993; Hong, 1999 ; Fritsch et Friesen, 2002). Le pool génétique de *Longicuspis*, espèce endémique, moins connu en dehors de l'Asie centrale, a été proposé comme le groupe ancestral d'*Allium sativum* et à partir duquel les autres groupes ont été évolués (Messiaen et Rouamba, 2004). Il sert probablement comme la source la plus importante de la variation génétique de l'ail (Etoh et Simon 2002; Kamenetsky *et al.*, 2005).

La diversité génétique chez les collections d'ail a été révélée par des analyses morphologiques; biochimiques et moléculaires (Al-Zahim *et al.*, 1997 ; Hong *et al.*, 2000; Bradley *et al.*, 2001). Au cours de ces dernières années, les marqueurs moléculaires tels que les RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Maass et Klaas, 1995 ; Ipek *et al.*, 2003), AFLP (Amplified Fragment Length polymorphism) (Lee *et al.*, 2002; García-Lampasona *et al.*, 2003) et les microsatellites ou (SSR, Simple Sequence Repeated) (Li *et al.*, 2003; Moe *et al.*, 2010) ont été reconnus comme marqueurs moléculaires utiles dans la Sélection Assistée par Marqueurs (SAM) et pour évaluer la diversité génétique et les relations entre les clones d'ail car ils ne sont pas affectés par les conditions environnementales.

Les résultats d'analyses par des enzymes et des marqueurs RAPD, sont généralement en accord avec les observations morphologiques; mais ne parvient pas à distinguer les clones. L'introduction des techniques AFLP a fortement facilitée l'évaluation des collections et les

banques de gènes de cette espèce. La comparaison des résultats de AFLP avec les Marqueurs RAPD et les Isoenzymes démontre que les polymorphiques AFLPs sont abondant chez l'ail et que la diversité génétique entre les clones est étroitement liés et ne pouvaient pas être différenciés avec des marqueurs RAPD et les Isoenzymes (Ipek *et al.*, 2003).

L'étude de la variation génétique de l'ail basée sur SSR a révélé une corrélation avec la géographie de la région, ceci indique qu'il peut y avoir eu des pressions de sélection locale pour d'adaptation à des conditions géographiques précises (ManHyun *et al.*, 2012).

Partie expérimentale

Chapitre I :

Matériel et méthodes

Il est à rappeler que l'objectif de ce travail est de caractériser un échantillon de Sept génotypes, quatre de l'espèce *Allium sativum* et trois de l'espèce *Allium cepa* appartenant à la collection de l'ITCMI d'Oum Elbouaghi. Dans le but d'évaluer ce patrimoine génétique et de distinguer ses différences et ses similitudes, nous avons procédé à une caractérisation morphologique et moléculaire et enfin à l'évaluation de l'effet de cette diversité sur la production de principes actifs notamment les huiles essentielles ainsi, que leurs effets anti bactériens.

I. Matériel et Méthodes

I.1. Matériel végétal

La matière végétale est constituée de trois variétés de bulbes d'oignon : Jaune d'Espagne, Rouge d'Amposta et Rouge locale (figure 09) et quatre variétés de Bulbes d'ail *Allium sativum* : Messedrom, Germidour, Mocpta Bulgare et Rouge locale (figure10). Ces variétés ont été fournies par l'institut technique des cultures maraichères et industrielles (ITCMI), après récolte au mois de juillet, la station se localise au niveau de Bire Rogàa, située à 16 Km à l'Est du chef-lieu de la wilaya d'Oum El Bouaghi (Algérie). Le site expérimental de l'institut s'étend sur une superficie de 22 ha dont 18 ha superficie agricole utile, dans une vaste plaine dont l'altitude varie entre 950 à 1000 m.

- ✓ **Coordonnées géographiques :** 25° 51.783 NORD et 7°5.496 EST
- ✓ **Les limites géographiques:**
 - **Limite Nord:** Route Nationale RN°10
 - **Limite Nord, sud, est et ouest :** exploitations agricoles collectives (EAC) issues de la ferme pilote KOUAH.
- Le champ d'action de la station est constitué de dix wilayas : Oum El Boughi – Khenchela – Batna - Constantine – Mila – Setif - Tebessa-Biskra - M'sila Et El Oued. L'origine et les caractéristiques morphologiques des bulbes de ces variétés sont présentées dans le Tableau 01.

Tableau 01 : Liste de génotypes étudiés, origine, et caractéristiques morphologiques des bulbes.

Espèce	Nom de variété	Origine	précocité	Bulbe / Caïeu
<i>A. sativum</i>	Messidrome	Blanc de la Drôme groupe III	précoce	Gros bulbe Caïeu crème
	Germidour	Violet de Cadours groupe III	Très précoce plantation automne	Gros bulbe Caïeu brune
	Mocpta Bulgare	-	Demi tardive	Bulbe régulier à 13 caïeux
	Rouge Locale	-	Demi tardive	Bulbe régulier à 14 caïeux
<i>A. cepa</i>	Rouge d'Amposta	Algérie, Maroc	précoce	Grand bulbe, violacé, elliptique étroite transverse
	Jaune d'Espagne	Afrique de l'Ouest, Bénin	Précoce	Grand bulbe, Jaunâtre, elliptique étroite transverse
	Rouge locale	Algérie	Précoce	Médium bulbe, rouge brunâtre, elliptique moyen transverse,

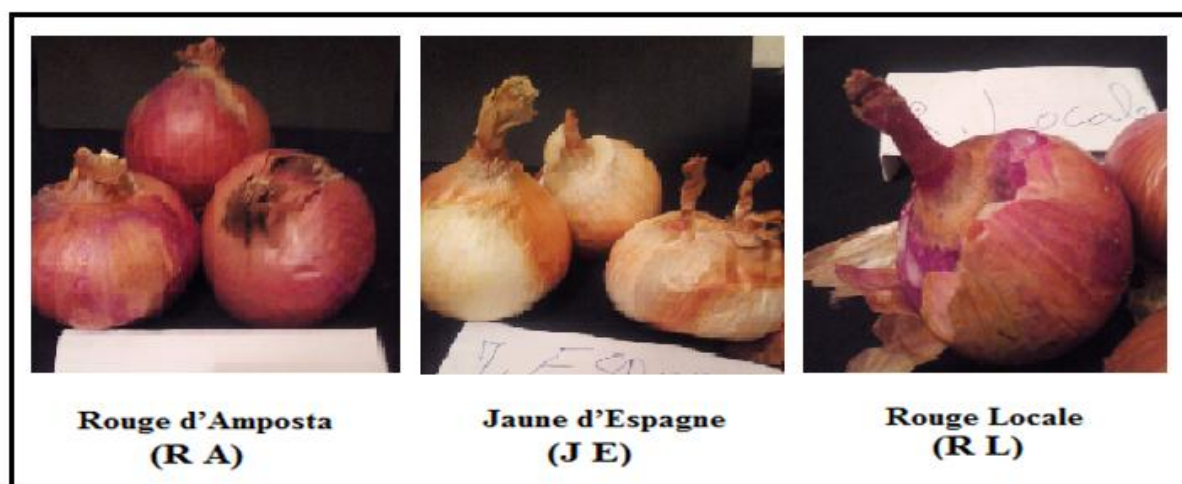


Figure 09 : Les variétés de l'espèce *Allium cepa* L.

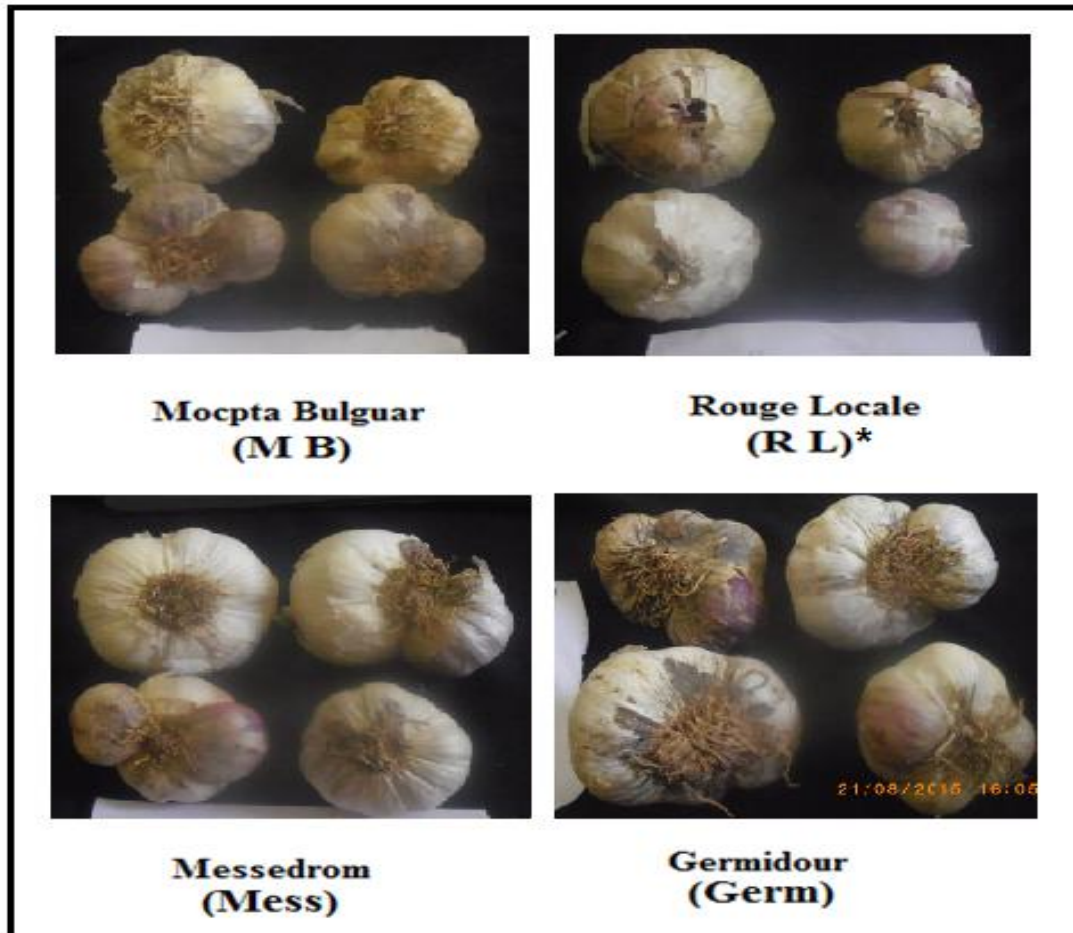


Figure 10 : Les variétés de l'espèce *Allium sativum* L.

I.2. Méthodes :

I.2.1. Caractérisation morphologique :

I.2.1.1. Description morphologique des bulbes des géotypes

Dans cette étude, nous avons présenté les principaux paramètres utilisés pour la description des bulbes et l'identification des 07 géotypes des deux espèces tout en se référant pour chaque caractère qualitatif au descripteur de l'UPOV en 2007 (Union de Protection des Obtentions Végétales) pour l'espèce *Allium cepa*. et conformément à la majorité des critères listés dans le descripteur du genre *Allium* par IPGRI en 2001 (International Plant Genetic Resources Institute) et de la fiche descriptive officielle éditée par le GEVES (Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés et des Semences) pour l'espèce *Allium sativum*.

Tous les caractères qualitatifs sont évalués selon l'intensité de l'expression de chaque critère.

Les données morphologiques basées sur la description des bulbes de chaque espèce ont été collectées sur les sept variétés dont 8 caractères quantitatifs et 11 Caractères qualitatifs pour l'espèce *Alluim cépa* et 5 caractères quantitatifs et 16 caractères qualitatifs pour l'espèce *Alluim sativum* (tableau 02).

Tableau 02 : liste, abréviation et unité des caractères morphologiques quantitatifs de bulbes utilisés pour l'analyse de la variabilité entre et à l'intérieur des génotypes étudiés.

Caractères morphologiques quantitatifs	Abréviation	Unité	Caractères morphologiques quantitatifs	Abréviation	Unité
Longueur de bulbe	LB	Cm	Poids d'un bulbe	PDB	gr
Diamètre des bulbes	DB	Cm	Rendement	Rdt	Q
Nombre des écailles sèches	NEcS	-	Nombre caïeux par bulbe	Ncaï/bulbe	-
Nombre de tuniques internes	NTnI	Cm	Poids d'un caïeu	Pd1caï	gr
Nombre de points végétatifs par Kg	NPtV/Kg	Cm	Nombre Bulbe/kg	N BB/kg	-

I.2.1.1.1. Critères de caractérisation quantitative

Chez les deux espèces, les caractères poids d'un bulbe, Nombre bulbes par kilogramme et le rendement sont déterminés de la même manière.

a. Nombre de caïeux

À partir d'un bulbe, le nombre de caïeux est déterminé par bulbe.

b. Poids d'un caïeu (gr)

Il est calculé par le rapport suivant : poids d'un bulbe/ le nombre de caïeux par bulbe

c. Poids du bulbe

Il est déterminé par le rapport poids total récolté/ nombre de bulbes récoltées, pour chaque répétition.

d. Nombre bulbes /kilogramme

Ce paramètre est calculé à partir du poids moyen d'un bulbe afin d'évaluer la qualité de la production.

e. Rendement

Sur la base du poids des bulbes, le rendement est calculé pour le peuplement théorique c-à-d à 100% de levée (240 plants /variété soit à 177 777 plants /ha) et le peuplement réel qui varie selon le taux de levée final de chaque variété.

f. Nombre de points végétatifs par kg Bulbe/Bulbille

Le nombre de points croissants (points végétatifs) doit être évalué lorsque le bulbe ou la bulbille a complètement dépéri à la fin du stockage, juste avant que la germination commence. Si l'on utilise des bulbes de taille moyenne, le bulbe ou la bulbille doit être coupé(e) transversalement au tiers de la longueur à partir de la base. Chaque point présente une couleur, souvent verdâtre, et est entouré d'anneaux de tissu (figure 11).

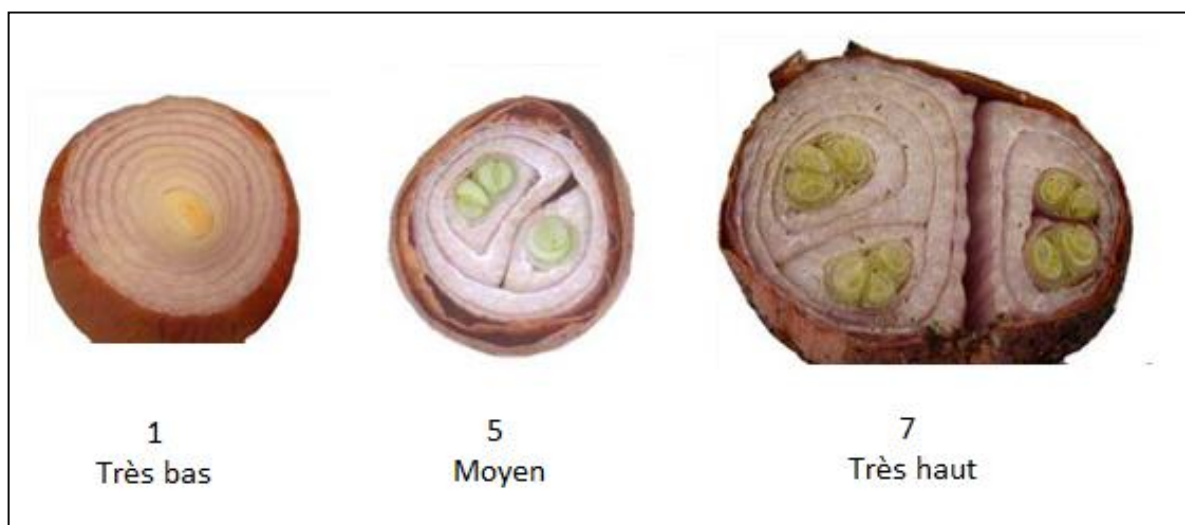


Figure 11 : Notation du nombre de points végétatifs par bulbe (UPOV, 2007).

NB : Les moyennes relatives aux mesures des différents paramètres pour les deux espèces sont apportées dans l'annexe 01.

I.2.1.1.2. Critères de caractérisation qualitative :

✚ Critères de caractérisation qualitative des bulbes des variétés d'oignon :

a. Bulbe/Bulbille : épaisseur des écailles sèches

- Notation :

Mince 3

- Moyenne 5

- Epaisse 7

b. Bulbe/Bulbille: adhérence des écailles après la récolte

- Notation :

Faible 3 - Moyenne 5 - Forte 7

c. Bulbe/Bulbille: couleur de fond des écailles sèches

- Notation :

- Blanches - grises - vertes - brunes - roses - Rouges

d. Intensité de la couleur de fond des écailles sèches

- Notation :

- Claire 3 - Moyenne 5 - Foncée 7

e. Couleur de l'épiderme des écailles

- Notation :

- Absente - verdâtre - rougeâtre.

f. Séparation en bulbilles

C'est le degré de séparation de bulbe en bulbilles (avec des écailles sèches couvrant chaque bulbille) (figure 12).



Figure 12 : Notation du degré de séparation en bulbilles (UPOV, 2007).

g. position du diamètre maximal de Bulbe/Bulbille (figure 13):

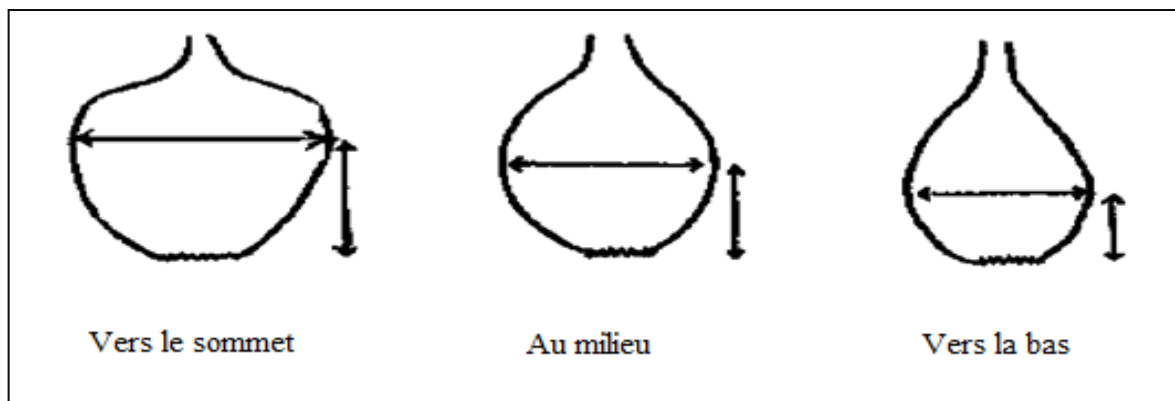


Figure 13: position du diamètre maximal de Bulbe (UPOV, 2007).

h. Forme (en section longitudinale) de Bulbe/Bulbille (figure 14) :

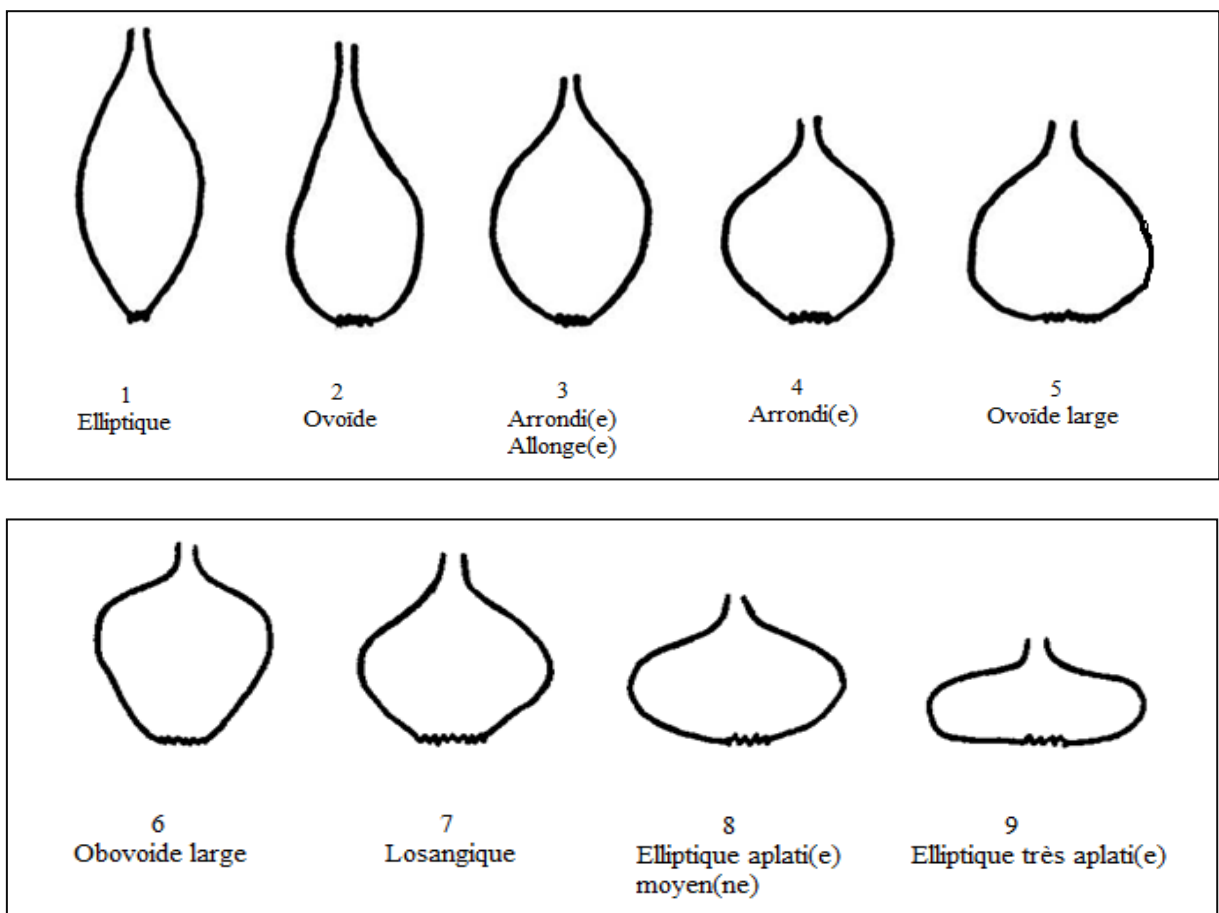


Figure 14 : Notation de la forme en section longitudinale de bulbe (UPOV, 2007).

i. épaisseur du collet de Bulbe/Bulbille (figure 15):

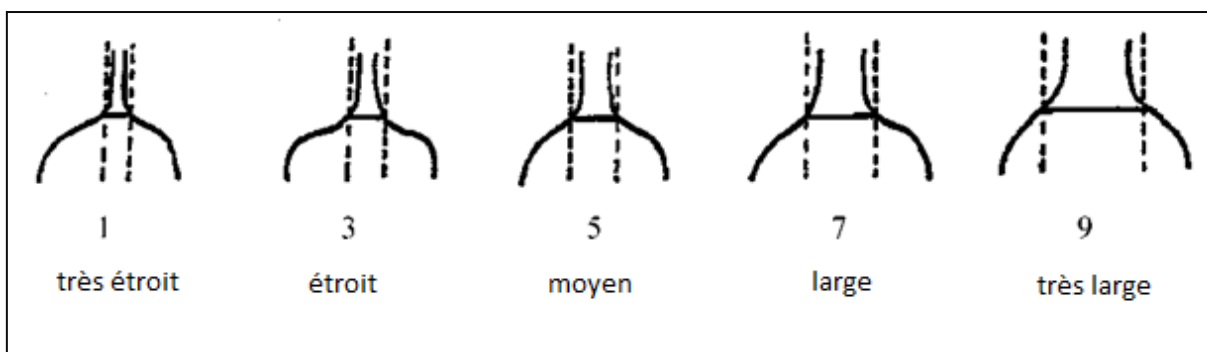


Figure 1 5: Notation de l'épaisseur du collet de Bulbe (UPOV, 2007).

j. Forme du sommet (figure 16):

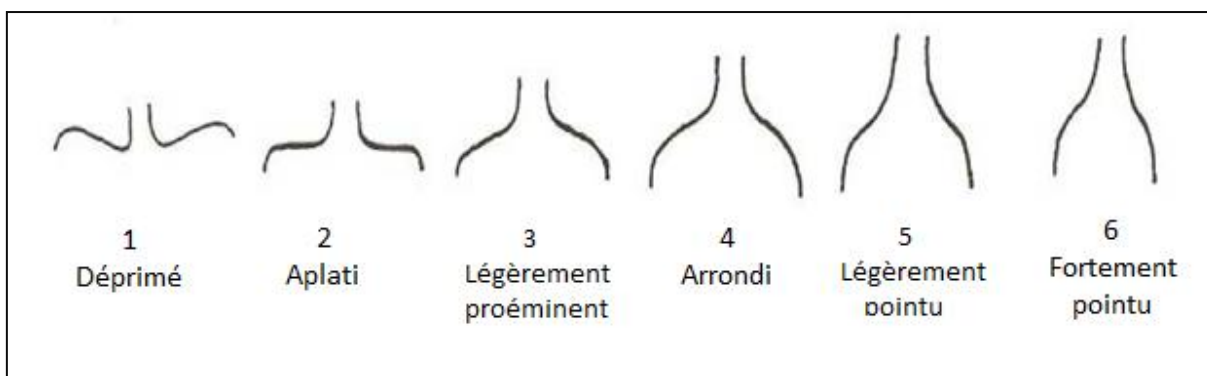


Figure 16: description de la forme du collet de Bulbe (UPOV, 2007)..

k. Forme de la base Bulbe/Bulbille (figure 17):

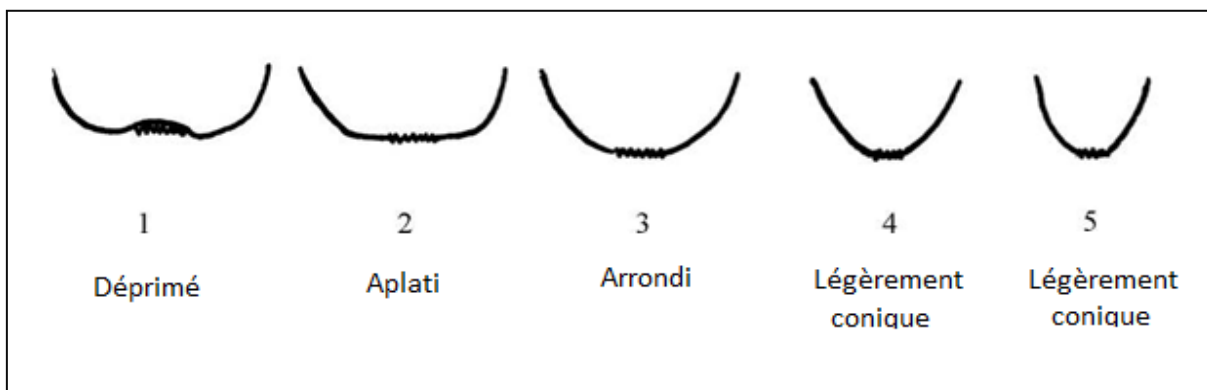


Figure 17 : description de la forme de la base de Bulbe d'oignon (UPOV, 2007).

✚ Critères de caractérisation qualitative des bulbes des variétés d’ail :

a. Forme en section longitudinale (figure 18):

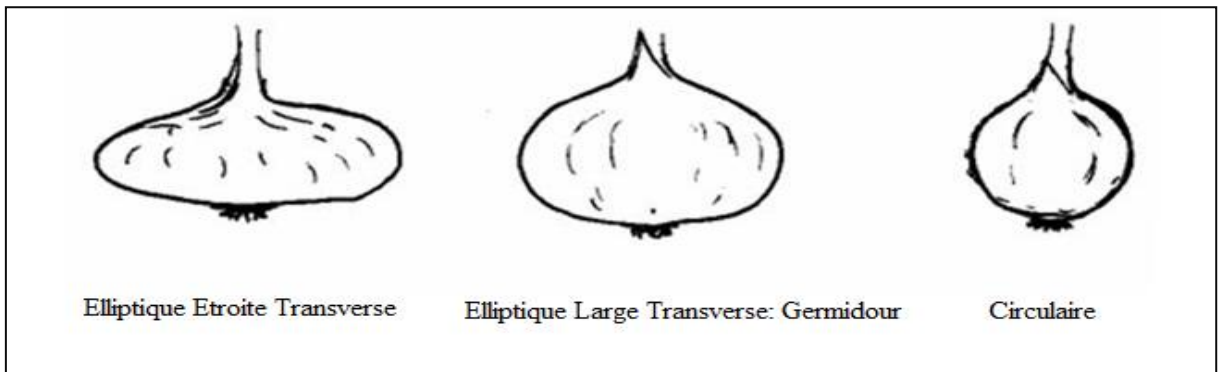


Figure 18 : Notation de la forme en section longitudinale du bulbe d’ail (IPGRI, 2001)

b. Forme en section transversale

• Notation :

- Elliptique
- Arrondie

c. Position du plateau racinaire :

• Notation :

- Déprimée
- Plane
- En saillie.

d. Forme de la base (figure 19).

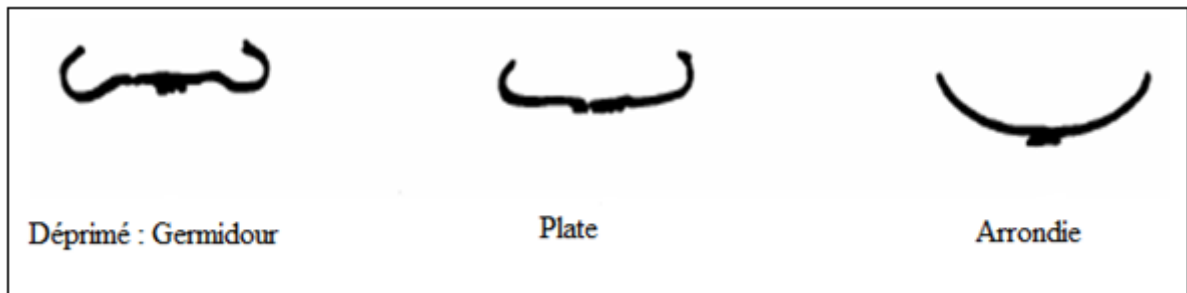


Figure 19: Description de la Forme de la base du bulbe d’ail (IPGRI, 2001)

e. Couleur du fond des tuniques externes sèches :

• Notation :

- Blanc
- Blanc-jaunâtre
- Blanc-rougeâtre

f. Striures anthocyaniques sur la tunique externe sèche :

• Notation :

- Absentes
- Présentes

g. Épaisseur des tuniques externes sèches :

• Notation :

- Minces
- Moyennes
- Épaisses

h. Adhérence des tuniques externes sèches :

• Notation :

- Faible
- Moyenne
- Forte.

i. Position des caïeux a l'extrémité supérieure du bulbe (figure 20):

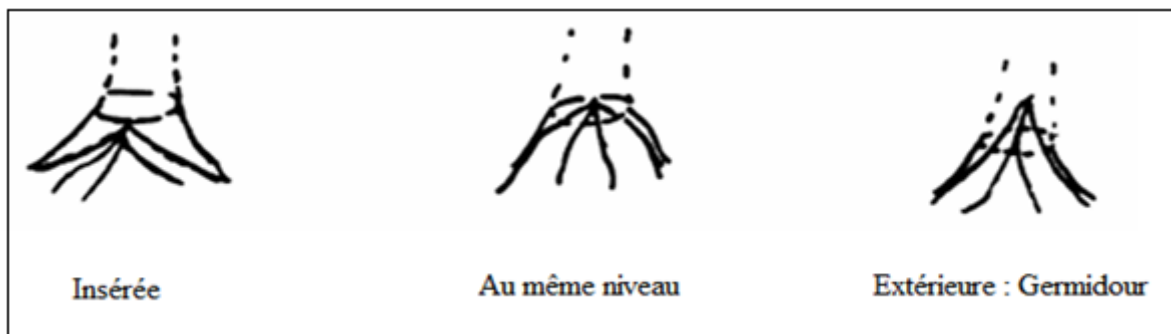


Figure 20 : Notation de la Position des caïeux à l'extrémité supérieure du bulbe d'ail (IPGRI, 2001).

j. Compacité des caïeux :

• Notation :

- Faible
- Moyenne
- Forte

k. Distribution des caïeux (figure 21):

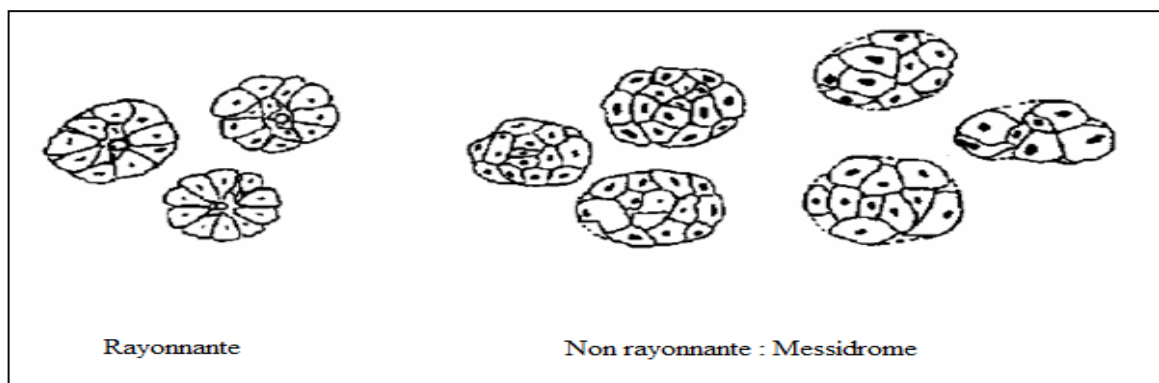


Figure 21 : Notation de la Distribution des caïeux (IPGRI, 2001)

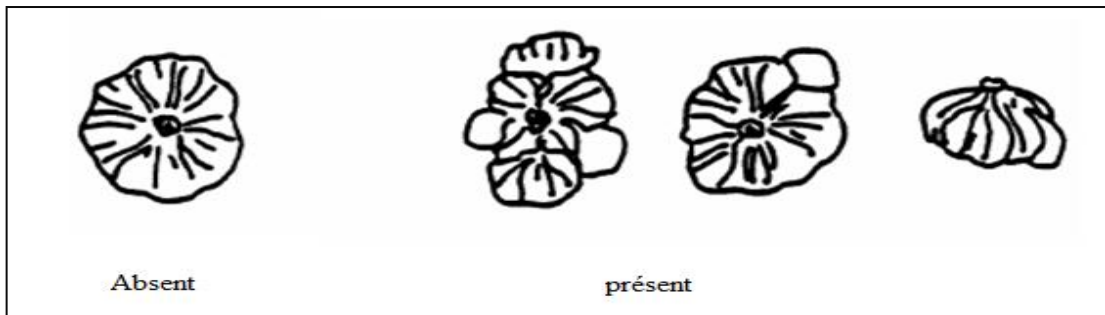
l. Caïeux externes (figure 22):

Figure 22 : Notation des Caïeux externes (IPGRI, 2001).

m. Couleur de la tunique des Caïeux:

- **Notation :**

-Blanche - Crème -Rose - Violette -Brune.

n. Intensité de la couleur de la tunique des Caïeux :

- **Notation :**

- Faible - Moyenne - Forte.

o. Striures anthocyaniques de la tunique des Caïeux :

- **Notation :**

- Absentes - Présentes

p. Couleur de la chair :

- **Notation :**

-Blanche - Jaunâtre

I.2.1.2. Analyse statistique

Des analyses statistiques descriptives, multidimensionnelles et décisionnelles ont été réalisées avec le logiciel SPSS version 21.

Pour chacun des caractères quantitatifs étudiés, nous avons procédé à une analyse descriptive (moyenne, Ecart- type)

Pour tester l'effet de la variété sur les caractéristiques quantitative étudiées, on a procédé à une analyse de variance (ANOVA) à un seul facteur ; le seuil de signification retenu est $P \leq 0.05$, la comparaison des moyennes a été effectuée par le test LSD suite à une analyse de la variance (ANOVA).

Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée, sur la matrice des variables quantitatives, pour étudier la corrélation entre variable et les liens possibles entre les caractéristiques quantitatives et les variétés.

I.2.2. Caractérisation moléculaire

La caractérisation moléculaire des génotypes des deux espèces ainsi que l'analyse de la diversité génétique qui les sépare seraient d'un apport considérable aux actions visant la sauvegarde et la caractérisation de notre patrimoine génétique étudié.

La caractérisation moléculaire permettrait d'estimer les rapports et les similitudes et d'évaluer le potentiel des marqueurs dans l'étude des relations phylogénétiques et la diversité génétique intra-spécifique. Cette technique a été utilisée par plusieurs auteurs pour révéler la diversité génétique chez plusieurs espèces végétales. Nous allons appliquer une des méthodes moléculaires (microsatellite ou SSR; Simple Séquence Reperât) pour discriminer les génotypes des espèces étudiés.

I.2.2.1. Extraction de l'ADN total

Afin de minimiser le temps d'exposition du matériel végétal à la température ambiante et éviter ainsi la dégradation de l'ADN, le mortier et le pilon sont trempés dans l'azote liquide. Un échantillon de 1g de bulbe de chaque variété est broyé dans ce mortier (trois échantillons pour chaque génotype), en présence d'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.

Chaque broyat (chaque génotype) est transféré dans des tubes de 2 ml auxquels nous avons ajouté 1ml de tampon d'extraction (2% CTAB, 20 Mm EDTA; 1,44 mM Tris HCl, 1% β -mercaptoéthanol, à pH 8) dans chaque tube. Tous les tubes sont, par la suite, incubés à 65°C pendant 60 min avec des agitations périodiques toutes les 5min. Après un repos de 4 à 5 min, 1ml de chloroforme: isoamylalcool (24:1 v/v) a été ajouté. Le mélange a été agité manuellement pendant 15 min afin de maintenir l'émulsion, puis centrifugé pendant 30 min à 4500 tr/min, à 4°C.

A la fin de la centrifugation, la phase aqueuse a été gardée et les acides nucléiques qui en font partie ont été précipités en ajoutant un volume égal d'isopropanol, ensuite, une deuxième centrifugation a été réalisée dans les mêmes conditions, pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN obtenu est lavé avec 1 ml d'éthanol (70%).

Au terme de ce lavage (centrifugation), le surnageant est éliminé, les tubes sont séchés à l'air libre pendant une heure. Le culot est par la suite, dissout dans 100 µl de TE (Tampon de re-suspension: Tris HCl 10 mM à pH 8, EDTA 1 mM à pH 8).

Enfin, 2 µl de RNase (Dnase-free, ayant une concentration finale de 10 µg/ml) ont été ajoutés à chaque, incubé à 37 °C pendant 2 heures ou plus pour éliminer les ARN présents dans la solution. Les échantillons sont, par la suite, utilisés ou stockés à -20°C.

Ensuite, 200µl H₂O ultra pure ont été ajoutés à chaque tube, après une légère agitation 300µl chloroforme alcool iso amylique ont été ajoutés suivi d'une centrifugation pendant 10min à 13000 tpm.

Le surnageant récupéré a reçu 0.1Volume (20 µl) d'acétate de sodium (3M, pH5.2) et 2 Volumes (400 µl) d'éthanol 100% frais. L'ensemble étant mis à -80°C pendant 10 min, centrifugé pendant 10 min à 13000 tpm et le culot est récupéré. Ce dernier a été lavé à l'alcool à 70%, séché et dissout dans 100 µl de TE.

I. 2. 2.2. Quantification des acides nucléiques

D'après Sambrouk et ses collaborateurs (1989), la quantité des acides nucléiques (ADN ou ARN) présent dans une préparation est déterminée par l'une des deux méthodes suivantes, selon la pureté de l'échantillon. En effet, si l'échantillon est pur, la quantité d'ADN ou d'ARN est déterminée par spectrophotométrie. Si par contre l'échantillon est contaminé par d'autres substances (phénol, protéines, acides nucléiques) qui peuvent interférer avec l'absorption, la concentration peut être estimée par la méthode de la fluorescence émise par le Bromure d'Ethidium (BET) après électrophorèse sur gel d'agarose. Vu sa simplicité, nous avons utilisé cette dernière méthode.

En effet, l'intensité de fluorescence émise par les molécules de BET, intercalées entre les bases de l'ADN, est proportionnelle à la quantité de ce dernier. Ainsi, l'ADN peut être quantifié après l'électrophorèse sur gel d'agarose et la coloration au BET, par comparaison de la fluorescence d'un autre ADN de concentration connue (Marqueur de taille).

I. 2. 2.3. Procédure de la technique microsatellites ou SSR (Simple Séquence Repeat)

L'analyse SSR a été réalisée en utilisant 100 ng d'ADN des différents géotypes d'oignon et d'ail et 16 amorces SSR. Les conditions d'amplification qui nous ont permis d'avoir les meilleurs résultats sont mentionnés dans le tableau 3:

Tableau 03 : Le mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN par PCR.

Composant	Concentration Initiale	Concentration Finale	Volume (µl) à prélever
ADN	30 ng/µl	60 ng	2
Taq Buffer	5 fois	1 fois	2.5
dNTP	2 Mm	2.5 mM	0,5
MgCl ₂	50mM	1.5 mM	1,25
Amorce Forward	2,5 µM	0.4 µM	4
Amorce Reverse	2,5 µM	0.4 µM	4
Taq polymérase (Promega)	5 U/µl	0.05U	0,4
H ₂ O	-	-	compléter à 25 µl

Le volume final de la réaction est ajusté à 25 µl par l'eau ultra-pure.

L'amplification PCR a été réalisée dans un thermocycleur (BiometraUno II) selon un programme composé de 35 cycles.

1 cycle.....Pré-dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min

35 cycles composés de

- dénaturation à 94°C pendant 1 mn
- hybridation à Ta°C pendant 1 mn
- extension à 72 °C pendant 2 mn

1 cycle.....Post-extension à 72 °C pendant 10 mn

La température d'hybridation (Ta) est calculée pour chaque paire d'amorces à partir de leur séquence. En effet, cette température augmente proportionnellement avec la longueur de la séquence et elle est égale à la température de fusion diminuée de 5°C (Proméga, 1996).

I. 2. 2.4. Séparation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification obtenus, pour chaque amorce, ont été séparés, selon leur poids moléculaire, par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% (1,8 g d'agarose; 60 ml de TBE (1X) et 3 µl de BET) préparé dans un tampon TBE (Tris base 0,45M; Acide borique 0,45M et 0,5 mM EDTA). Pour chaque réaction 6 µl de Bleu de chargement 'Loadingdye' sont ajoutés

au produit amplifié dont on prend 15 µl et on les dépose dans les puits du gel. La migration des fragments d'ADN est réalisée à 90 Volts, pendant 3 heures.

a. Migration

Avant le dépôt des produits de la PCR, nous avons réalisé une électrophorèse à blanc pendant 30 min à 100 V. Entre temps, nous avons ajouté aux échantillons 6 µl de Bleu de chargement. Puis de chaque tube contenant le produit PCR, nous avons chargé 15 µl dans les puits disponibles, sans oublier le marqueur du poids (100 pb). La migration est faite à 200 V jusqu'à ce que le xylène cyanol (le colorant le plus lent) ait atteint les 3/4 du gel.

b. Coloration au Bromure d'Ethidium

Les bandes SSR ont été visualisées sous UV émis par un transilluminateur suite à une agitation du gel dans un bain de bromure d'éthidium pendant 20 min. Les photos ont été obtenues à l'aide du système Gel-Doc.

NB : les différentes solutions utilisées pour l'analyse moléculaire sont rapportées dans l'annexe 02

I. 2. 2.5. Analyse statistique

Les résultats de l'amplification SSR sont lus sur les photos des gels. Seules les bandes nettement visibles ont été comptabilisées. Les profils ont été transformés en matrices binaire présence (1) ou absence (0) de bandes portant en lignes les génotypes étudiés et en colonnes les marqueurs générés par les différentes amorces SSR en considérant les fragments de même tailles comme identiques.

Les matrices des données ont été analysées par le programme Treecon selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averaging) de Nei et Li (1979). La matrice de similarité a été calculée et le dendrogramme de distance a été construit.

❖ Information sur le degré du polymorphisme

Ce paramètre nous renseigne sur l'aptitude d'une amorce donnée à générer un polymorphisme entre les génotypes étudiés. Il est désigné par PIC (Polymorphism Information Content). Selon Bostein *et al.*, (1980), il est calculé par la formule suivante:

$$PIC = 1 - \sum(P_{ij})^2$$

Où P_{ij} est la fréquence du i^{em} bande révélée par le j^{em} amorce.

$P(ij)$ est sommée à travers toutes les bandes révélées par les amorces.

I.2.3. Caractérisation Biochimique :

I.2. 3.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est effectué dans le but de réaliser une étude comparative des principaux constituants des deux espèces d'*Allium* et donc de mieux comprendre leurs propriétés thérapeutiques. Pour cela, l'utilisation de la matière végétale fraîche (Bulbe) s'avère nécessaire pour un broyage manuel à l'aide d'un mixer, puis les différentes pesées sont faites par une balance électrique.

Pour préparer l'extrait éthanolique, les bulbes d'oignon et d'ail ont été coupés en petits morceaux puis écrasés dans un mortier. 50 g de chaque broya sont mélangés avec 250 ml d'éthanol (80%) au reflux pendant 1 h. L'extrait est filtré à l'aide de papier Whatman.

Afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires, un criblage phytochimique est réalisé dans l'extrait préparé (tableau 04).

Tableau 04 : Groupes chimiques, réactions d'identification et indicateurs utilisés.

Groupe chimique	Réactifs d'identification	Indicateur
Sapanosides	Indice mousse > 1cm	Apparition d'une mousse persistante
Flovonoides	<ul style="list-style-type: none"> - Acide chlorhydrique (HCL) - Alcool iso-amylique - Copeaux de magnésium 	Coloration orangé ou violacée Rouge cerise
Alcaloïdes	<ul style="list-style-type: none"> - MayeretWagner - Acide hydrochlorique HCL (10%) - Hydroxyde d'ammonium (10%) - Di éthylique éther, HCL (2%) - Alcool à 60° 	Coloration brun- rougeâtre Turbidité Précipité ou une coloration orangée
Tanins	<ul style="list-style-type: none"> - Ethanol (50%) - chlorure ferrique FeCl₃ 2% 	Coloration bleu noire
Stérols et les tri-terpènes	<ul style="list-style-type: none"> - Anhydride acétique - Chloroforme - Acide sulfurique concentré 	Anneau pourpre ou violet virant au bleu puis vert
Glucosides [sucres réducteurs)	<ul style="list-style-type: none"> - Solution de Feeling - Ethanol, eau distillée - Tartrate sodique-potassique 	Coloration rouge brique

- **Les alcaloïdes**

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et de Wagner. 20 ml de l'extrait a été ajouté à 5 ml d'acide chlorhydrique HCl (10%). Le milieu acide est chauffé dans un bain d'eau, où un volume de solution d'hydroxyde d'ammonium (10%) a été ajouté jusqu'à l'obtention d'un milieu de pH = 9. Une extraction avec de l'éther diéthylique est réalisée suivi d'une concentration avec un dispositif « évaporateur rotatif ». Le résidu est repris dans 5 ml de HCl (2%), divisé en deux parties égales. La première était traitée avec quelques gouttes de réactif de Mayer et la deuxième avec le réactif de Wagner. L'apparition de précipité blanc et brun, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes (Memelink *et al.*, 2001).

- **Les tanins**

1 ml de l'extrait d'alcool a été ajouté à 2 ml d'eau distillée et 2-3 gouttes de la solution de chlorure ferrique FeCl₃ 1 % permet de détecter la présence ou non de tanins. L'apparition d'une couleur verte ou bleu-vert indique la présence de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (Trease *et al.*, 1987 ; Douhou *et al.*, 2003).

- **Les Stérols et tri-terpènes**

Evaporer à sec 10 ml de la solution à analyser, dissoudre le résidu dans 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H₂SO₄ concentré au fond du tube sans agiter. Laisser reposer 30 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes (Trease et Evans, 1989).

- **Saponosides**

Deux grammes de matériel végétal frais broyé sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau. On porte à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15-20 min en position verticale, la persistance d'une mousse confirme la présence de saponines (Dohou *et al.*, 2003)

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes ont été recherchés par la réaction à la cyanidine. Deux (2) ml de l'extrait ont été évaporés et le résidu a été repris dans 5 ml d'acide chlorhydrique dilué 2 fois. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur puis une coloration rose orangé ou violacée. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes (Koffi N'GUESSAN et al., 2009).

- **Les glucosides (sucres réducteurs)**

Introduire 2 ml d'extrait dans un tube, ajouter 2 ml de liqueur de Fehling (1 ml réactif A et 1ml réactif B) et porter l'ensemble 8 min dans le bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (Trease *et al.*, 1987).

I.2. 3.2. Extraction des huiles essentielles

a. Méthodes d'extraction

Les HES de l'ail et de l'oignon sont extraites par la méthode d'hydrodistillation, par ébullition pendant 2 heures d'un mélange de 700 g de matériel végétal et d'eau distillée. Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à immerger une quantité de la masse végétale dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium anhydre, pour absorber l'humidité et éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile (figure 23). L'opération d'extraction dure deux à trois heures à partir du début d'ébullition.

Après extraction, les huiles sont récupérées et conservées dans de petits flacons opaques qui sont fermés hermétiquement pour les conserver à 4°C, afin de les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température, jusqu'à son usage (Hacisefrogullari *et al.*, 2005).

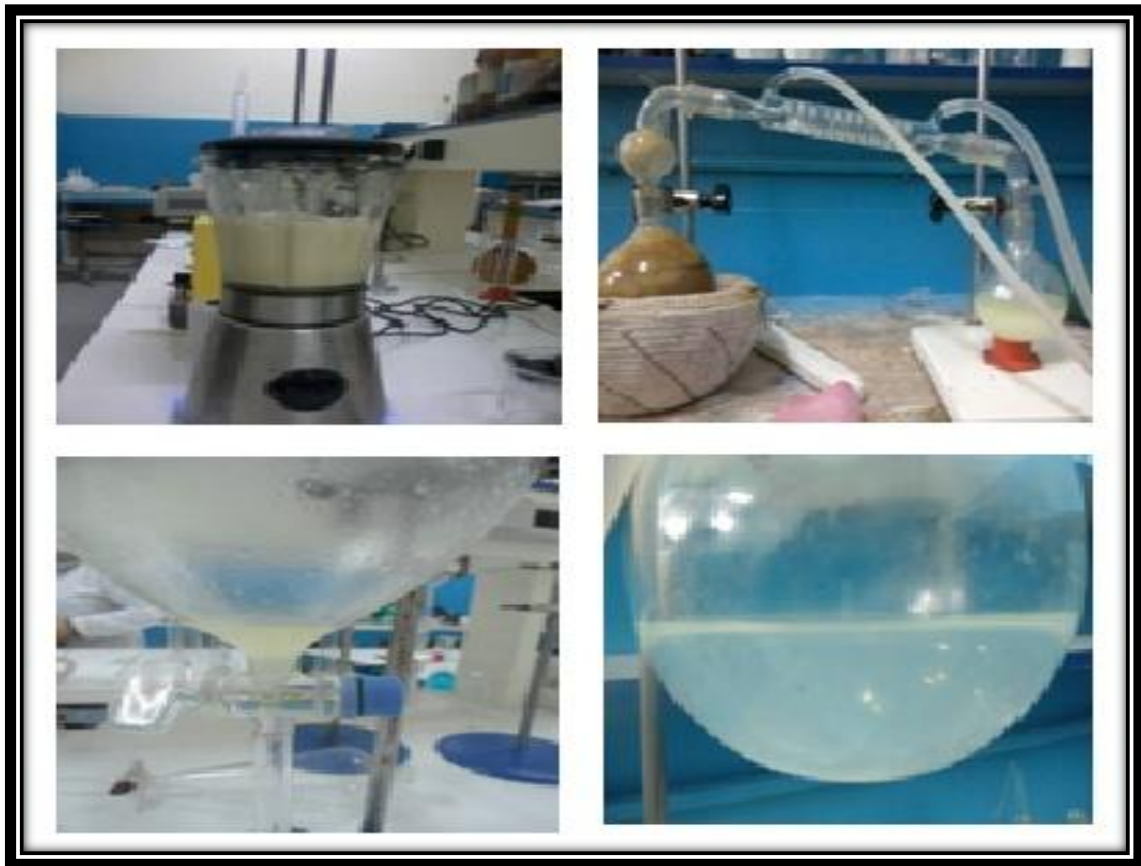


Figure 23: Les étapes de l'extraction de l'HE des variétés des deux espèces par la méthode d'hydrodistillation.

b. Calcul du rendement : AFNOR (1986)

Le rendement en huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse d'huiles essentielles obtenues et la masse du matériel végétal à traiter.

$$R\% = M_{HE} / M_V \times 100$$

R : rendement en huiles essentielles en%.

M_{HE} : quantité d'extrait récupérée exprimée en gramme (g).

M_V : quantité de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en gramme (g).

I .2.3.3. Etude analytique des huiles essentielles

I .2.3.3.1. Propriétés organoleptiques

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, odeur, saveur et couleur) de l'essence de l'ail et de l'oignon sont vérifiées et notées.

I .2.3.3.2. Mesure de quelques paramètres physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques tels que : le pouvoir rotatoire, l'indice d'ester, l'indice d'acide, l'indice de réfraction....etc. constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des huiles essentielles. Ces essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissant aux normes édictées par l'association française de normalisation (A FNOR ,2000).

a. Détermination des indices physiques

- **Densité relative**

La densité de l'HE correspond au rapport entre la masse d'un certain volume de l'essence et la masse du même volume d'eau pris à la même température.

- **Mode opératoire**

La mesure de la densité de l'HE a été réalisée à l'aide d'un pycnomètre et calculée à partir de la formule suivante :

$$D_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dans laquelle :

m_0 : la masse en gramme du pycnomètre vide

m_1 : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée

m_2 : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile.

- **Indice de réfraction**

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence du rayon lumineux dans l'air et le sinus de l'angle de Réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré.

$$n_{\lambda}^t = \frac{\text{Sin}_i}{\text{Sin}_r}$$

La mesure de l'indice de réfraction de l'HE est effectuée à l'aide d'un réfractomètre classique de marque OPTECH et donné par lecture directe sur le refractomètre à température fixée à 20 °C. Pour cela, on a opéré comme suit :

- Etalonner l'appareil à l'aide d'une substance d'indice de réfraction connu à la température fixé à 20°C.
- Nettoyer les prismes et déposer quelques gouttes d'HE entre les deux faces des prismes.
- Regarder dans l'oculaire et tourner le bouton de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule.
- Supprimer les irisations pour obtenir une ligne nette entre les deux zones.
- Noter la valeur de l'indice par l'échelle de lecture.

- **Miscibilité à l'éthanol**

Dans un Erlen contenant 1 ml d'HE, on verse de l'éthanol à 70 % par fraction de 0,2 ml à l'aide d'une burette de 20 ml en agitant après chaque ajout. Lorsqu'une solution limpide est obtenue on note le volume d'alcool ajouté, 20 ml d'alcool ont été nécessaires.

b. Détermination des indices chimiques

En plus des caractères physiques, des méthodes chimiques peuvent être utilisées pour doser les fonctions (acide, ester, alcool, carbonyle,) présentes dans les HE. Ces dernières permettent non seulement de mettre en évidence la présence des fonctions organiques mais aussi de mesurer leurs proportions dans le mélange.

- **Indice d'acide**

L'indice d'acide **I_a** est le nombre de milligrammes de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres renfermés dans un (01) gramme d'HE.

- ❖ **Mode opératoire**

1 g d'HE, 5ml d'éthanol à 96% et environ 5 gouttes d'indicateur coloré (phénophtaléine) sont introduits dans un Erlen. Le mélange ainsi formé est titré par une solution alcoolique de potasse (KOH) 0.1N jusqu'à où la solution vire au rose.

L'indice d'acide est déterminé par la formule :

$$I_a = V.C. \frac{56,11}{m}$$

V : volume en ml de la solution de KOH utilisée pour le titrage.

C : concentration en mole/L de la solution de KOH

m : masse en g de la prise d'essai

- **Indice d'ester**

L'indice I_e d'ester est le nombre de milligramme de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libérés par hydrolyse en milieu basique (saponification) des esters contenus dans 1g d'essence. La potasse réagit sur les esters selon une réaction dite de saponification :



- ❖ **Mode opératoire**

Dans un ballon de 100 ml, on introduit 1g d'HE et 25 ml d'une solution alcoolique de potasse (KOH) 0.5 M à l'aide d'une burette, ainsi que quelques fragments de pierre ponce. On adapte au ballon un réfrigèrent et on porte mélange au reflux pendant une (01) heure. Après refroidissement de la solution, on ajoute 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénophtaléine. Puis, l'excès de KOH est titré avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0.5 N jusqu'à la disparition de la couleur rose.

Parallèlement, une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions en utilisant les mêmes réactifs.

L'indice d'ester est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I_e = \frac{28,05}{m} (V_0 - V_1)$$

V_0 : Volume en ml de la solution d'HCl (0,5N) pour l'essai à blanc.

V_1 : volume en ml de la solution d'HCl (0,5N) mesuré pour le calcul de I_e

m : Masse en g de la prise d'essai.

I_a : Valeur d'indice d'acide.

- **Indice de saponification**

L'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse caustique (KOH), nécessaire pour transformer en savon les acides gras et les triglycérides d'un (01) gramme de Corps gras.

Le principe consiste à titrer l'excès d'hydroxyde de potassium en solution par l'acide chlorhydrique.

❖ **Protocole expérimental**

Mettre 2g d'huile dans une fiole muni d'un réfrigérant puis, ajouter 25 ml de solution éthanolique de KOH (0.5N), ensuite on porte le mélange à ébullition en agitant de temps en temps pendant 1h. 3 gouttes de phénolphaléine sont ensuite ajoutées. La solution savonneuse est titrée avec HCL (0.5N). Parallèlement, un essai à blanc et dans les mêmes conditions a été effectué.

L'indice de saponification est donné par la formule:

$$I_s = \frac{N \cdot (V_0 - V_1)}{p} \quad (\text{mg KOH/ g d'H.E})$$

Dans laquelle :

V₀ : volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique pour l'essai à blanc

V : volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la prise d'essai

N : normalité exacte de la solution chlorhydrique

P : poids en gramme de la prise d'essai

• **Indice de peroxyde**

On définit l'indice de peroxyde comme étant le nombre de milliéquivalent d'oxygène par kilogramme de corps gras et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode.

Le principe repose sur le traitement d'une prise d'essai, en solution dans l'acide acétique et du chloroforme, par une solution d'iodure de potassium, puis le titrage de l'iode par une solution titrée de thiosulfate de sodium.



L'indice de peroxyde est donné par la formule (h) :

$$I_p = \frac{(V_0 - V)}{p} \times 10 \quad (\text{méq. O}_2/\text{kg d'H.E})$$

Dans laquelle :

V : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai.

V₀ : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc.

P : prise d'essai en gramme.

NB : les valeurs moyennes des rendements en HEs et les différents réactifs utilisés pour le screening phytochimique sont rapportées dans l'annexe 03

I .2.3.4. Analyse de la composition chimique des HEs

Les constituants de l'huile essentielle ont été séparés et identifiés par Shimadzu CPG/MS. L'analyse a été réalisée par un chromatographe à phase gazeuse du type Shimadzu couplé à un spectromètre de masse. La colonne capillaire était du type QP 2010 S de 25 m longueur, diamètre 0.25 mm. Le débit du gaz porteur (hélium) était de 0.77ml/min. 1µl d'huile essentielle a été injecté, en utilisant le mode split. La température de l'injecteur est de 250° C.

La température de four a été programmée de 55°C (3min) à 120°C, avec une augmentation 3°C/ min, suivi d'une stabilisation à cette même température pendant 3min, puis une augmentation de 5°C/ min jusqu'à une température de 180°C (cette température a été maintenue pendant 11.33 min).

Le spectromètre de masse a été configuré pour analyser 40-350 AMU nominal par 0.6s. La source d'ions et de la température d'interface est de 200, 250 ° C, respectivement. Les composés ont été identifiés à partir de leurs spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standard de la banque de données informatisée NIST 05. Le pourcentage de chaque composé au sein de l'huile est déterminé à partir des aires des pics.

❖ Analyse statistique :

➤ Typologie des variétés (regroupement des variétés)

La typologie des variétés au sein de la même espèce selon les différents paramètres et caractères étudiés a été effectuée à l'aide de la classification hiérarchique sous SPSS 21. La méthode de Ward a été opté comme algorithme d'agrégation et les variétés au sein de même groupe ont été réunies selon la mesure du carré de la distance euclidienne. Les résultats présentés suite à ce type de traitement statistique sont la matrice de proximité entre variété et le dendrogramme qui représente graphiquement les regroupements.

I.2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :

I.2.4. 1. Matériel du test de l'activité antibactérienne :

a. Souches bactériennes

Les souches bactériennes sur lesquelles nous avons testé l'activité des huiles essentielles (Tableau 05), sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection), ont été choisies pour leur haute pathogénicité et leur multi résistance. Ce sont des espèces Gram négatif /ou Gram positif, pathogènes et responsables d'infections graves chez l'homme et dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques .Elles sont activées à 37 °C pendant 24 heures par repiquage sur milieu gélosé Muller-Hinton (MH). Ces souches bactériennes appartiennent à la collection du laboratoire de microbiologie de l'hôpital CHU de Constantine.

Tableau 05 : Liste des souches bactériennes étudiées.

Genre et espèce	N° ATCC	Gram	Famille
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+	Staphylococcacées
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	-	Enterobacteriacées
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-	Pseudomonadacées
<i>Escherichia.coli</i>	25922	-	Enterobacteriacées

b. Les antibiotiques

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

c. Milieux de culture

Selon les souches bactériennes, nous avons utilisé les milieux de cultures suivants : Mueller Hinton (MH), Bouillon nutritif.

NB : La composition chimique de ces milieux de culture est décrite dans Annexe 04.

I.2.4. 2. Activité antibactérienne

Dans notre travail, l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des deux espèces *in vitro* vis à vis des différentes souches bactériennes *Escherichia coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, a été réalisée par la méthode de l'aromatogramme .

a. Méthode de diffusion par disque (l'aromatogramme)

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

➤ Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé à partir de culture des souches bactériennes dans le bouillon nutritif après incubation pendant 24 heures à 37°C dans l'étuve, quelques millilitres de cette culture sont ajoutés dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, et agité au vortex pendant quelques secondes. L'opacité de la suspension doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland, pour cela la concentration bactérienne des différentes solutions ou inoculum est évaluée par turbidité est exprimée par la mesure des densités optiques de 0.08 à 0.10. à une longueur d'onde de 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit le milieu de culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. Il est à signaler d'une part, que la suspension ajustée devra contenir 10⁸ UFC /ml (unitsformingcolony /ml) et d'autre part, que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au-delà de 15 minutes faute de quoi la concentration et donc l'opacité risque d'augmenter à cause de la croissance bactérienne.

➤ Ensemencement

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

➤ Préparation des disques d'aromatogramme

Les disques sont fabriqués à partir de papier Wattman n°3 avec un diamètre de 6 mm. Ensuite ils sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'autoclave. Les disques sont déposés délicatement sur la surface de la gélose MH inoculée à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. Puis à l'aide de micropipette, 1 disque est imprégné par

les huiles brutes des variétés d'ail et d'oignon et 3 disques sont imprégnés par les HE diluée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à 1/2, 1/4 et 1/8 (v/v). De même, les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des huiles testées. Le test est répété trois fois pour avoir des résultats fiables. Finalement, les boîtes de pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C dans l'étuve.

➤ Lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition (à l'aide d'une règle à l'extérieure de la boîte) qui est représentée par une auréole formée autour de disque où aucune croissance n'est observée (Najjaa et al., 2007) (Tableau 06).

Tableau 06: Evaluation de l'effet antibactérien selon le diamètre d'inhibition.

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

b. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'induire une réduction de la croissance microbienne de 90%. La détermination de la CMI est réalisée par la méthode de dilution.

c. Préparation de la gamme de dilutions

Le principe de la méthode consiste à réaliser une série de dilutions (1/2, 1/4 et 1/8) de l'huile dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Une gamme de concentration de notre huile essentielle allant de : 500µl/µl à 125 µl/µl (tableau 7) (Skandamis et Nychas, 2001).

- Pour l'espèce *Allium cepa* nous avons déterminé la CMI uniquement pour les HEs de Rouge d'Amposta et Jaune d'Espagne qui ont présenté une activité antibactérienne vis-à-vis de *staphylococcus aureus*. Nous avons éliminé celle de Rouge locale qui ne

semble pas active contre les souches testées, ainsi que les bactéries (*E. coli*, *p. aeruginosa* et *k. pneumoniae*) qui n'ont pas été sensibles aux HEs d'oignon.

Tableau 07: valeurs des dilutions utilisées pour déterminer la CMI.

Rapport de dilution (H.E/DMSO)	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$
%	50	25	12.5
µl H.E/ml DMSO	500	250	125

NB : les valeurs moyennes de la mesure des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait brute des HEs sont rapportées dans l'annexe 04.

Chapitre II :

Résultats et Discussion

II. 1.Caractérisationmorphologique

II. 1.1.Analyse de la diversité des caractères morphologiques quantitatifs :

II.1.1.1.Effet variété sur les paramètres morphologiques :

Allium cepa :

Les analyses descriptives de la variance des caractères quantitatifs des variétés de l'espèce *Allium cepa* sont regroupées dans le tableau08, des écarts importants ont été enregistrés entre les valeurs minimales et les valeurs maximales pour la plupart des caractères.

Tableau8 : Analyse descriptive des paramètres morphologiques.

Paramètre	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
PDB	250,98	87,17	365,00	154,83
NBB	4,7	1,1	6,0	3,0
LB	10,24	0,83	11,67	9,33
DB	11,09	1,01	12,67	10,00
Rdtqx/h	44,65	15,46	64,88	27,55
NEcS	3,1	1,8	6,0	1,0
NTnI	7,4	1,0	9,0	6,0
NPtV /Kg	20,2	7,1	30,0	11,0

La variation relativement la plus importanteest notée pour le poids d'un Bulbe (PDB), le rendement (Rdt) et le nombre de points végétatifs (NPtV), alors que celle qui est la plus faible est observée pour la longueur de Bulbe (LB).

La moyenne du poids d'un Bulbe varie de 154,83 g valeur mesurée pour le cultivar (RL) à 365,00 gpour la variété Rouge d'Amposta (RA) (Tableau 08).

Le nombre de points végétatifs par kilogramme varie de 11.00 points chez la variété RL à 30.00 points pour la variété jaune d'Espagne. Il en est de mêmepour le rendement qui varie de 27,555 q/hchez le cultivar RL à 64,388 q/h rendement du génotype RA(Rouge d'Amposta) (tableau 08).

La longueur de Bulbe varie de 9.33 cm pour Jaune d'Espagne (JE) à 11,667 cm moyenne du génotype RA(Tableau 08).

L'analyse de la variance des caractères des variétés testées de l'espace *Allium cepa* fait ressortir une divergence dans le comportement des variétés vis-à-vis de certains paramètres étudiés.

Effectivement, il existe des différences très hautement significatives à $p < 0.01$ pour le nombre de Bulbe (NB) par kilogramme, le nombre des écailles sèches (NEcS) et le nombre de point végétatifs (NPtV) par kilogramme et significatives pour le poids de Bulbe (PDB) et le rendement (Rdt) tandis que l'effet variété n'était pas significatif sur la longueur, le diamètre de Bulbe et le nombre de tunique internes (NTnI) (Tableau 09).

Tableau 09 : Effet variétal sur les paramètres morphologiques.

Paramètre	ddl	F	Signification
PDB	2	5,612	0,042*
NBB	2	19,500	0,002**
LB	2	3,498	0,098 ^{ns}
DB	2	2,407	0,171 ^{ns}
Rdtqx/h	2	5,575	0,043*
NEcS	2	34,333	0,001**
NTnI	2	3,167	0,115 ^{ns}
NPtV /kg	2	40,452	0,000**

- **Effet variété sur le poids d'un bulbe**

L'analyse de variance révèle des différences significatives entre les variétés testées pour ce variable (Tableau 10.)

Les résultats relatifs à ce paramètre pour les 03 variétés de l'espèce *Allium cepa* sont présentés dans le Tableau 10. Les individus des variétés : jaune d'Espagne et Rouge d'Amposta présentent le poids de Bulbe le plus importants par une moyenne de 308,00g et 287,00g respectivement. Cependant, les individus de la variété rouge local présentent la plus faible valeur du poids de Bulbe 157,94 g.

Tableau 10 : Effet variété sur le poids d'un bulbe.

Variété	PDB			
	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
RL	157,94 ^a	4,82	163,50	154,83
JE	287,00 ^b	90,04	364,00	188,00
RA	308,00 ^b	49,57	365,00	275,00

Lettres différentes sur la même colonne signifie une différence significative à $p \leq 0.05$.

- **Effet variété sur le nombre de Bulbe**

Les mesures de ce paramètre ont montré des variations significatives (Tableau 11) en fonction des variétés. Notons que les variétés JE et RA présentent le nombre de Bulbe /kg le plus faible par une moyenne de 4,3 et 3,7 Bulbe par kilogramme respectivement, contrairement aux individus de la variété RL qui présentent le nombre de Bulbe /kg le plus important (6 bulbes par kilogramme).

Tableau 11 : Effet variété sur le nombre de Bulbe.

Variété	NBB/kg			
	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
RL	6,0 ^a	0,0	6,0	6,0
JE	4,3 ^b	0,6	5,0	4,0
RA	3,7 ^b	0,6	4,0	3,0

- **Effet variété sur le rendement (Rdt)**

L'analyse de variance a montré qu'il existe des différences significatives entre les variétés évaluées pour le rendement.

Les résultats du rendement pour les variétés de cette espèce sont présentés par le tableau 12. Le meilleur rendement en bulbe est noté chez la variété rouge d'Amposta avec une moyenne de 54,755q/h suivi par la variété JE avec une moyenne de 51,022q/h. Cependant, la variété RL présente le plus faible rendement en bulbe 28,16.75 q/h.

D'après les tableaux : (10), (11) et (12) qui montrent les groupes homogènes des variétés en fonction des variables, poids d'un Bulbe, nombre de Bulbe par kilogramme et le rendement on peut classer les variétés testées en deux groupes :

Groupe 1 : regroupe les variétés Jaune d'Espagne et Rouge d'Amposta.

Groupe 2 : ne renferme que la variété Rouge Locale.

Tableau 12 : Effet variété sur le rendement (Rdt).

Variété	Rdt			
	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
RL	28,17 ^a	79,53	29,07	27,55
JE	51,02 ^b	16,00	64,71	33,42
RA	54,75 ^b	88,12	64,88	48,88

- **Effet variété sur le nombre des écailles sèches (NEcS)**

Pour le nombre des écailles sèches, l'analyse de variance révèle des différences significatives entre les variétés évaluées, les résultats du tableau 13 qui présentent les groupes homogènes en fonction du nombre des écailles sèches nous ont permis de classer les variétés en deux groupes variétaux :

Groupe 1 : regroupe les variétés RL et JE.

Groupe 2 : regroupe que la variété RA.

Les individus des variétés RL et JE (tableau 13) présentent un nombre des écailles sèches très faibles avec une moyenne de 2.3 et 1.7 respectivement. Par contre, les individus du cultivar RA présentent un nombre des écailles élevé avec une moyenne de 5.3.

Tableau 13 : Effet variété sur le nombre des écailles sèches (NEcS).

Variété	NEcS			
	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
RL	2,3 ^a	0,6	3,0	2,0
JE	1,7 ^a	0,6	2,0	1,0
RA	5,3 ^b	0,6	6,0	5,0

- **Effet variété sur le nombre de points végétatifs (NPtV/kg)**

L'analyse de variance révèle des différences significatives entre les variétés testées pour le nombre de points végétatifs par kilogramme.

Le tableau 14 montre que les trois variétés testées sont regroupées en trois groupes différents :

Groupe 1 : RL.

Groupe 2 : JE.

Groupe 3 : RA

Les résultats relatifs à ce paramètre pour les trois variétés sont présentés par le tableau 14 où, les individus de la variété JE présentent une valeur moyenne du nombre de points végétatifs très importante (27.3/kg) suivie par la variété RA avec une valeur de 21.7 /kg, cependant la variété RL présente la plus faible valeur en nombre de point végétatifs (11.7/kg).

Tableau 14: effet variété sur le nombre de points végétatifs (NPtV/Kg)

Variété	NPtV/kg			
	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
RL	11,7 ^a	0,6	12,0	11,0
JE	27,3 ^b	3,1	30,0	24,0
RA	21,7 ^c	2,1	24,0	20,0

Allium sativum

Les valeurs moyennes prises par les variables chez les trois génotypes et les valeurs extrêmes (min et max) relativisées par rapport à la moyenne générale de la variable considérée sont données dans le tableau 15.

Des variations importantes ont été enregistrées entre les valeurs extrêmes pour la plupart des caractères, par exemple : la variation la plus importante est notée pour le poids d'un caïeu alors que celle qui est la plus faible est notée pour le nombre de caïeux par Bulbe (Tableau 15).

Tableau 15: Analyse descriptive de l'espèce *Allium sativum*.

Variété	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
Pd1B	24	5	32	15
Pd1caï	2,49	0,80	4,33	1,46
Ncaï /Bulbe	12,6	1,3	14,0	10,0
NBB	43,4	10,6	66,0	31,0
Rdt	43,48	88,93	55,99	26,79

Le poids d'un caïeu varie de 1.46 g pour la variété Mocpta Bulgare (MB) à 4.33 g, valeur mesurée pour la variété Messedrom (Mess). Le nombre de caïeux par Bulbe varie de

10 cai/Bulbe pour MB à 14 cai/bulbe, moyenne des cultivars Messdrom (Mess), Rouge locale (RL*) et Germidour (Germ).La variété RL* présente le meilleur rendement en bulbe contrairement au MB qui présente le plus faible rendement.

L'analyse de la variance révèle des effets génotypes significatifs à $p < 0.05$ pour l'ensemble des variables mesurées à l'exception du poids d'un caïeu et le nombre de caïeux par bulbe (Tableau 16).

Tableau 16 : Effet variété sur les paramètres morphologiques.

Paramètre	Ddl	F	Signification
Pd1B	3	4,693	0,024*
Pd1caï	3	0,418	0,745 ^{ns}
Ncai /B	3	2,063	0,184 ^{ns}
NB /Kg	3	6,058	0,019*
Rdt	3	5,559	0,023*

- **Effet variété sur le poids d'un bulbe, le nombre de Bulbe/k et le rendement**

Pour le caractère poids d'un Bulbe, les individus des variétés RL* et Germ présentent un poids élevé par une moyenne de 31,56 g et 30,16 g respectivement. Cependant, pour ce même caractère les individus de la variété MB ont donné la plus faible valeur (21,86g) (Tableau 17).

Tableau 17 : Effet variété sur le poids d'un bulbe

Variété	PDB			
	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
MB	17,67 ^a	3,66	21,86	15,07
RL*	27,38 ^b	3,84	31,56	24,00
Mess	26,27 ^b	2,51	28,95	23,97
Germ	26,53 ^b	3,22	30,16	24,02

Pour le caractère, nombre de Bulbe par kilogramme, les individus de la variété MB présentent un nombre important (66.00 B/k) comparativement aux individus des variétés RL* Mess et Germ respectivement (42 B/kg, 41 B/kg , 45 B/kg) (Tableau 18).

Tableau 18 :Effet variété sur le nombre de bulbe /kg

Variété	N.BULBE/Kg			
	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
MB	58,00 ^a	9,85	66,00	47,00
RL*	37,67 ^b	5,86	42,00	31,00
Messe	38,00 ^b	4,36	41,00	33,00
Germ	40,00 ^b	6,24	45,00	33,00

Pour le caractère rendement en Bulbe, la meilleure valeur est enregistrée chez la variété RL* avec moyenne de 55.9997q/h, suivie par les variétés Germ et Mess avec une moyenne de 53.61754 q/h et de 51.4664 q/h respectivement, contrairement à MB qui produit peu de rendement 38.86205 q/h (Tableau19).

Tableau 19:Effet variété sur le rendement en bulbe

Variété	Rdt			
	Moyenne	Ecart-type	Maximum	Minimum
MB	31,42 ^a	65,09	38,86	26,79
RL*	48,64 ^b	67,74	55,99	42,67
Mess	46,69 ^b	44,67	51,46	42,61
Germ	47,16 ^b	57,27	53,61	42,70

D'après les tableaux (17, 18, 19) qui montrent les groupes homogènes des variétés en fonction des variables: poids d'un Bulbe, nombre de bulbe par kilogramme et le rendement en bulbe, on peut classer les variétés évaluées en deux groupes variétaux :

Groupe 1 : referment la variété MB.

Groupe2 : regroupe les variétés RL*,Mess et Germ.

II.1.1.2. Analyse de la matrice de corrélation

✚ *Allium cepa* :

La détermination du coefficient de corrélation permet de mesurer l'intensité de la corrélation entre deux caractères quantitatifs et en conséquence, de mettre en évidence le poids de deux composants dans l'élaboration du caractère.

D'après la matrice de corrélation entre les variables quantitatives de l'espèce *Allium cepa* (Tableau 20), il ressort que le poids de bulbe est étroitement lié au rendement en bulbe avec un coefficient ($r = + 1,000$) et au nombre de points végétatifs ($r = + 0,673$). On constate aussi qu'il existe une corrélation positive entre le poids de bulbe et leur diamètre ($r = + 0,666$) ainsi que leur longueur ($r = + 0,504$), entre la longueur de bulbe et leur diamètre ($r = + 0,836$) et enfin entre le rendement et le nombre de points végétatifs ($r = + 0,672$) (Tableau 21). Ces résultats sont comparables à celui de Boukary *et al.*, (2012) qui ont montré qu'il y a une corrélation positive entre le nombre de bourgeons végétatifs et la matière sèches bulbes ($r = + 0,558$) et entre le diamètre de bulbe et leur hauteur ($r = 0,618$).

Tableau 20 : Matrice de corrélation entre les paramètres quantitatifs de l'*Allium cepa*

Variable	PDB	NBB	LB	DB	RDT	NEcS	NTnI	NPtV
PDB	1	-0,788*	0,504	0,666*	1,000**	0,417	-0,668*	0,673*
NBB		1	-0,439	-0,541	-0,787*	-0,486	0,588	-0,743*
LB			1	0,836**	0,506	0,66	0,031	-0,008
DB				1	0,665	0,474	-0,228	0,257
RDT					1	0,416	-0,666	0,672*
NEcS						1	-0,031	-0,022
NTnI							1	-0,760*
NPtV								1

* La corrélation est significative au niveau $P \leq 0,05$. ** La corrélation est hautement significative au niveau $0 < P \leq 0,05$.

✚ *Allium sativum*

La matrice de corrélation de cette espèce montre des corrélations significatives entre plusieurs couples de variables (Tableau 21).

Tableau 21 : Matrice de corrélation entre les paramètres quantitatifs de L'*Allium sativum*

Variable	Pd1b	pd1caï	Ncaï/Bul	Nb B/Kg	Rdt
Pd1b	1	-0,039	0,628*	-0,980**	1,000**
pd1caï		1	-0,126	0,075	-0,038
Ncaï/Bul			1	-0,711**	0,629*
Nb B/Kg				1	-0,980**
Rdt					1

*La corrélation est significative au niveau $P \leq 0.05$. ** La corrélation est hautement significative au niveau $0 \leq P \leq 0.05$.

Les coefficients de simple corrélation indiquent, en effet, qu'il existe une forte corrélation positive ($r = + 1,000$) avec le poids de bulbe et le rendement en bulbe et avec le nombre de caïeux par bulbe ($r = +0,628$), c-à-d plus ce dernier augmente plus le poids de bulbe augmente ce qui confirme cette corrélation.

II.1.1.3. Analyse en composant principale (ACP) :

Pour déterminer comment les géotypes évalués se regroupent selon les différentes combinaisons de caractères mesurés, on a utilisé l'analyse en composantes principales (ACP), qui présente l'avantage de réduire le nombre de caractères mesurés en un nombre restreint d'axes ou de composantes principales et de grouper les géotypes évalués en conséquence et pour expliquer les variations constatées entre les variétés étudiées.

II.1.1.3. 1. Modèle de L'ACP sur les paramètres quantitatifs

Allium cepa :

L'analyse en composantes principales montre que les deux premiers axes ont les valeurs propres les plus élevées. Ils expriment 83,566 % de la variabilité détectée dans la matrice des données analysées. Le premier axe explique 59,599 %, alors que le deuxième absorbe à lui seul 23,967% (Tableau 22).

Tableau 22 : Éléments du modèle de L'ACP sur les paramètres quantitatifs de L'*Allium cepa*.

Composante	Extraction Sommes des carrés des facteurs retenus		
	Total	% de la variance	% cumulés
1	4,768	59,599	59,599
2	1,917	23,967	83,566

L'axe 1 est défini par 5 variables qui sont le rendement, le poids de bulbe, le nombre de points végétatifs/kg, le nombre de tuniques internes et le nombre de bulbe par Kg dont trois d'entre elles sont positivement liées à cet axe. Il s'agit du rendement en bulbe, le poids de bulbe et le nombre de poids végétatif, contrairement au nombre de bulbe par kilogramme et le au nombre de tuniques internes qui sont négativement corrélés à l'axe 1 (Figure 24). L'axe 2 représente bien les variables : nombre des écailles sèches, longueur et diamètre de bulbe qui lui sont positivement corrélées (Figure 24).

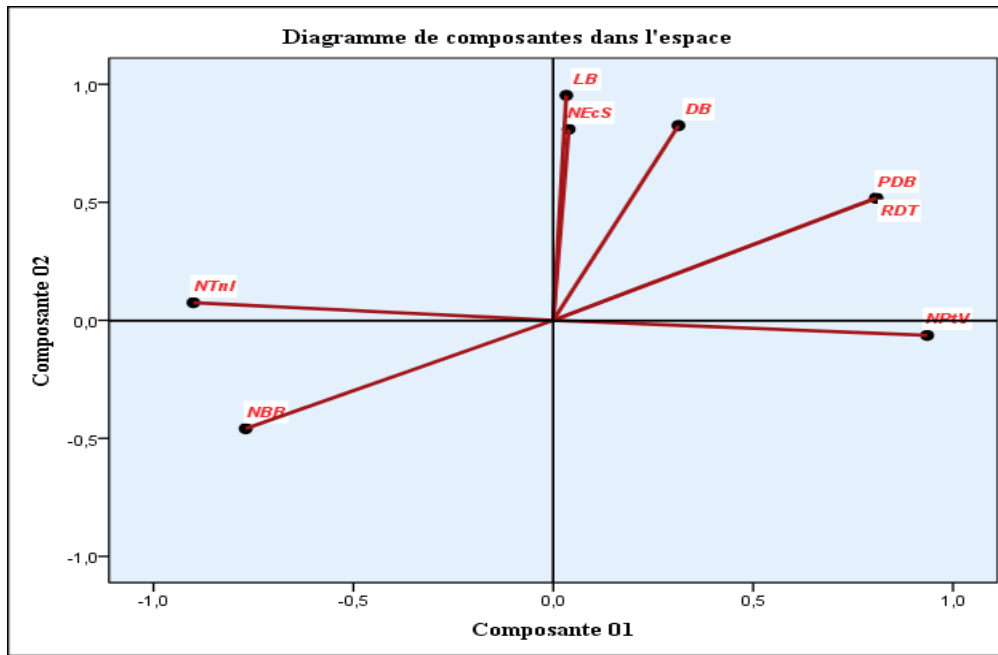


Figure 24: Carte factorielle des paramètres quantitatives de l'Allium cepa

✚ *Allium sativum* :

Les résultats de l'analyse en composantes principales montrent que les deux premiers axes expliquent 90,102 % de la variation totale disponible dans la matrice des données soumises à l'analyse (69,976 % axe₁, 20,126 % axe₂) (Tableau 23).

Tableau 23 : Éléments du modèle de L'ACP sur les paramètres quantitatifs de l'espèce *Allium sativum*

Composante	Variance totale expliquée		
	Valeur propre	% variance expliquée	% variance expliquée cumulée
1	3,499	69,976	69,976
2	1,006	20,126	90,102
3	0,478	9,566	99,668
4	0,017	0,332	100,000

Trois variables sont bien représentées par l'axe 1, il s'agit du rendement, du nombre de caïeux par bulbe et du poids de bulbe. Ces variables sont positivement liées à cet axe 1 (Figure 25), tandis que la variable nombre de bulbe par kilogramme est négativement corrélée à ce même axe. L'axe 2 représente bien la variable poids d'un caïeu qui lui est positivement corrélée (Figure 25).

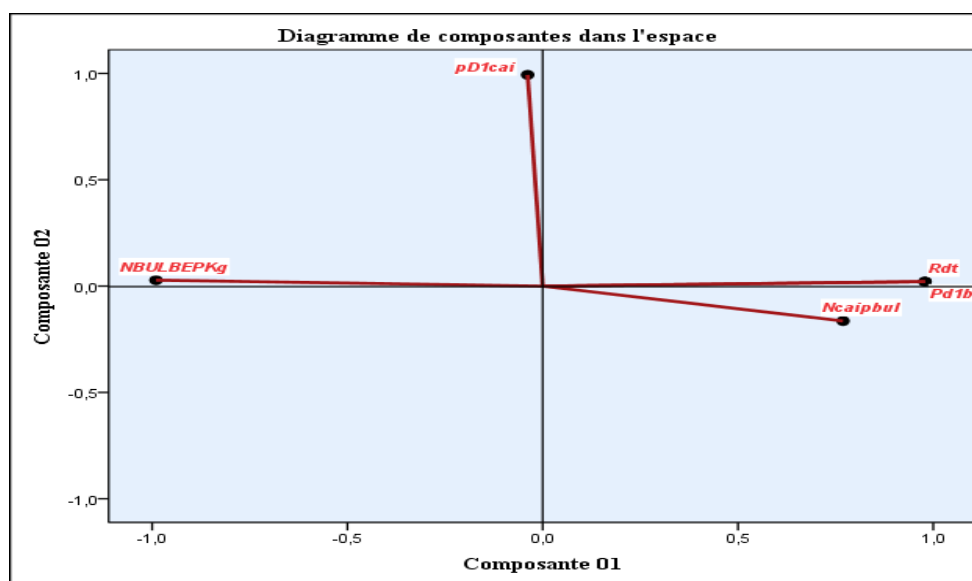


Figure 25: Carte factorielle des paramètres quantitatives de l'*Allium sativum*

II.1.1.3. 2. Projection des variétés sur le plan factoriel et classification

✚ *Allium cepa*

Les corrélations des variables avec les axes principaux conduisent à l'identification des groupes des génotypes qui se caractérisent par différentes combinaisons de caractères, en outre, les plans formés par les axes 1 et 2 montrent que les génotypes Rouge d'Amposta et Jaune d'Espagne se groupent ensemble et s'opposent le long de l'axe 1 au groupe formé par le génotype Rouge locale (Figure 26).

Le premier groupe de génotypes se distingue par la combinaison des caractères suivants : nombre de points végétatifs par Kg , rendement en bulbe et poids d'un bulbe, longueur de bulbe, nombre des écailles sèches et diamètre de bulbe.

La variété Rouge d'Amposta diffère de Jaune d'Espagne par la longueur de bulbe, nombre des écailles sèches et le diamètre de bulbe qui sont plus élevés chez la première variété et pour le nombre de points végétatifs qui est plus élevé chez la seconde variété(Figure 26) .

le second groupe de variétés se distingue par la combinaison des caractères suivants : le nombre de tuniques internes et le nombre de bulbe par kilogramme. Les valeurs de tous les génotypes pris ensemble, sont plus élevées que la moyenne générale.Ce groupe se diverge du premier groupe par : un rendement en bulbe, un nombre de points végétatifs et un poids de bulbe plus réduits.

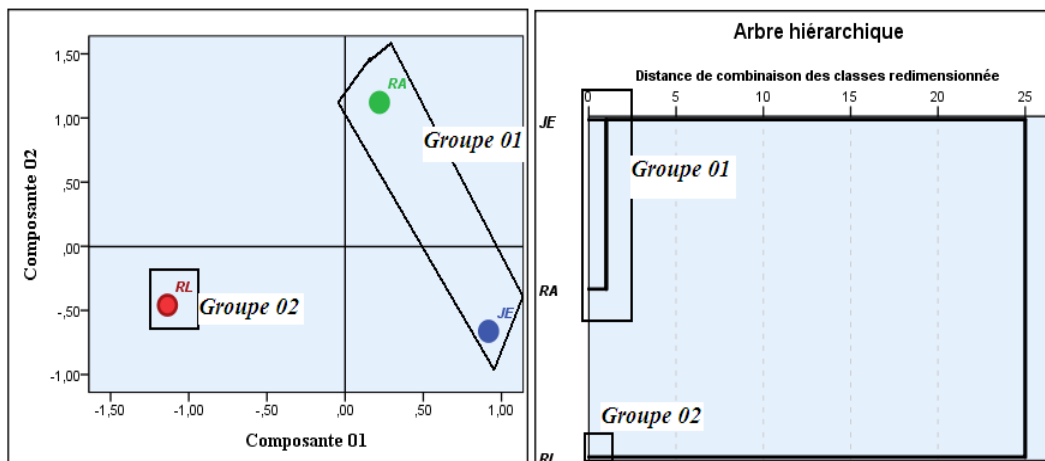


Figure 26: Projection factorielle et classification des variétés d'oignon.

Allium sativum

Pour le regroupement des génotypes de cette espèce à partir des caractères observés, l'analyse a permis de délimiter deux groupes représentés comme suit:

Le groupe 1 : contient trois variétés (75%) à savoir RL*, Germ et Mess qui s'opposent le long de l'axe 1 au groupe 2 qui comprend une seule variété (25%) qui est la variété MB. Le premier groupe se distingue par la combinaison des caractères suivants : le rendement, le poids d'un bulbe et le nombre de caïeux par bulbe tandis, que le second groupe de variétés se démarque par de faibles valeurs pour la même combinaison de caractères cités mais se caractérise par un nombre de bulbe par kg plus élevé et un poids d'un caïeu plus réduit (Figure27).

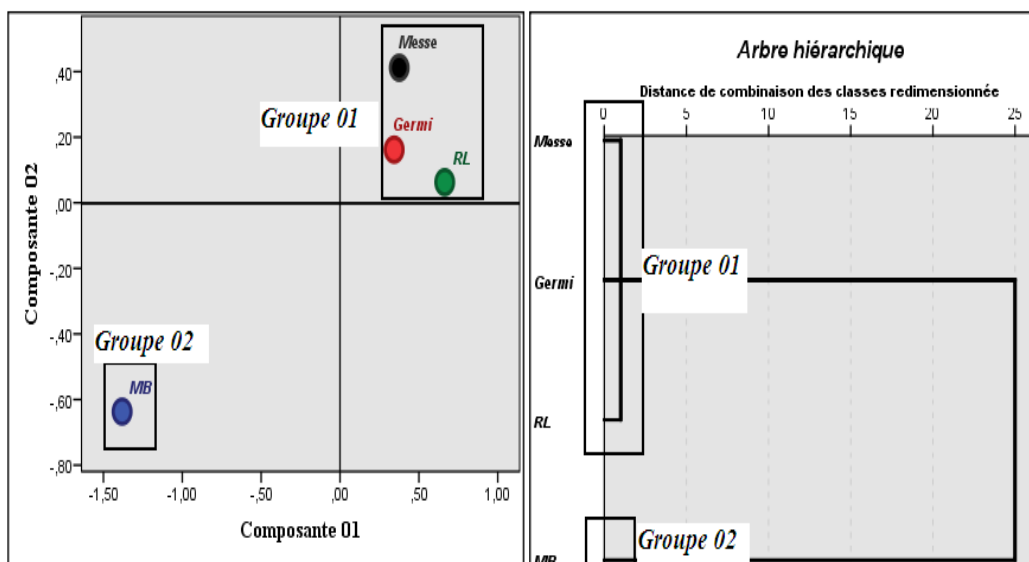


Figure 27: Projection factorielle et classification des variétés d'ail.

II.1.2. Descripteurs qualitatifs :

✚ *Allium cepa*

Parmi les descripteurs des bulbes d'oignon, la forme et la couleur sont utilisées par la quasi-totalité des producteurs enquêtés (99%) et peu d'entre eux utilisent le nombre des lobes par bulbe, l'uniformité en forme des bulbes et l'uniformité en couleur des bulbes pour décrire un écotype (Rabiouet *al.*, 2014).

Les différentes notations descriptives des écailles sèches du bulbe d'oignon (Tableau 24) (Figure 28), montrent une large variabilité variétale pour la présentation des bulbes qui est un indicateur pour l'orientation de la production soit vers la consommation directe ou la transformation. Nos résultats montrent que la variété Jaune d'Espagne se différencie des deux autres variétés par la totalité des descripteurs des écailles sèches tandis que, les deux autres variétés RL et RA sont presque semblables pour certains descripteurs. Pour faire une différenciation entre ces deux variétés on peut se baser sur les catégories suivantes : épaisseur des écailles sèches et adhérence des écailles après récoltes.

Les observations effectuées après la récolte pour la description des bulbes sont résumées dans le tableau 25. On constate aussi une large variabilité entre les variétés d'oignon pour chaque descripteur (Figure 28), mais l'épaisseur du collet de bulbe peut être considérée comme indicateur important pour différencier les différents types d'oignon étudiés

Tableau : 24: Notations descriptives des écailles sèches d'oignon

Variétés	Epaisseur des écailles sèches	Adhérence des écailles (après récoltes)	Couleur de fond des écailles sèches	Intensité de la couleur des écailles sèches	Couleur de l'épiderme des écailles sèches
Rouge d'Amposta	Epaisses	Forte	Rouge violette	Foncée	Rougeâtre/ violette
Jaune d'Espagne	Mince	Faible	Jaune Brune	Claire	Verdâtre
Rouge locale	Moyennes	Faible	Rouge Brune violette	Foncée	Rougeâtre /violette claire

Tableau : 25: Notations descriptives des Bulbes d'oignon

Variétés	Forme en section longitudinale	forme du sommet	Forme de la base	Degré de séparation en bulbilles (avec des écailles sèches couvrants chaque bulbille	Position du diamètre maximal vers le sommet	Epaisseur du collet
Rouge d'Amposta	Elliptique très aplati	Aplati	Aplati	Moyen	Au milieu	Large
Jaune d'Espagne	Elliptique très aplati	Légèrement proéminent	Aplati	Faible	Au milieu	Etroit
Rouge locale	Elliptique aplati moyen	Arrondi	Aplati	Absent ou très faible	Au milieu	Moyen

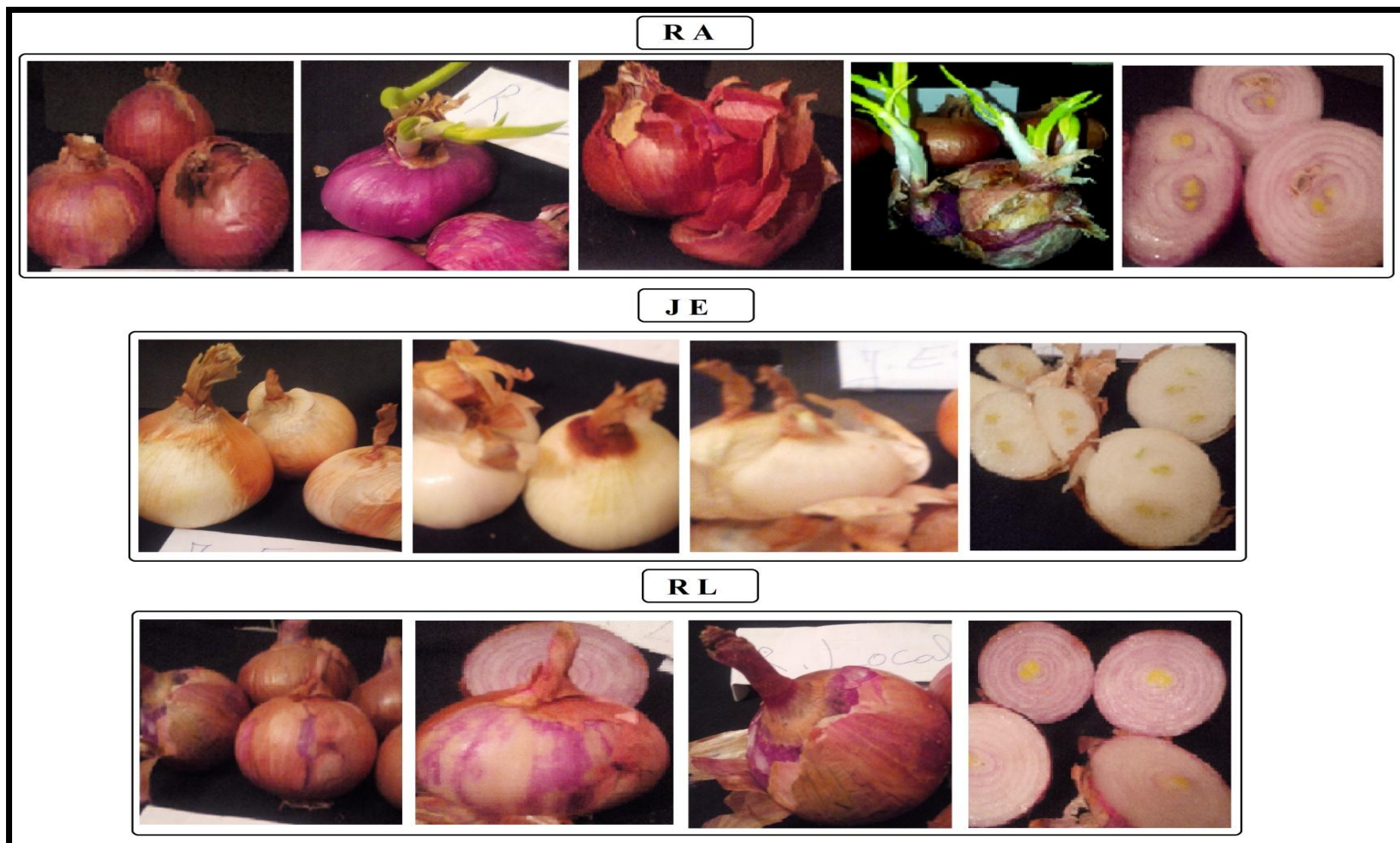


Figure 28 :Notation sur les bulbes et les écailles sèches des trois variétés d'oignon.

 *Allium sativum*

La caractérisation morphologique des variétés étudiées sur la base des paramètres qualitatifs a mis en évidence un polymorphisme phénotypique important pour les différentes notations descriptives des bulbes et des caïeux des différentes variétés étudiées. Parmi les 22 catégories possibles des 8 descripteurs de bulbes utilisés (Tableau 26), 17 sont présentes dans l'échantillon. Une de ces catégories peut être considérée comme importante pour distinguer les variétés, c'est le cas de la catégorie adhérence des tuniques externes sèches, forte chez la variété Mocpta Bulgare et faible chez la variété Germidour (Tableau 26) (Figure 29). Les observations effectuées pour la description des caïeux (Tableau 27) indiquent que certaines catégories telles que la position des caïeux à l'extrémité supérieure du bulbe, compacité des caïeux, distribution des caïeux et couleur de la chair sont spécifiques pour la variété Germidour. Donc ces catégories peuvent servir comme indicateurs pour distinguer cette variété des autres variétés (Tableau 26) (Figure 29). Ceci corrobore avec Volket *al.*, (2009) qui indiquent que certaines catégories, tels que l'arrangement des caïeux et la couleur de la peau des caïeux sont généralement stables pour chaque écotype à l'égard des sites de production et des conditions de culture. Alors, l'identification de ces caractères stables des cultivars d'ail peuvent servir comme indicateurs pour la classification de cette espèce.

Tableau 26 :Notations descriptives des bulbes d’ail

Notations Variétés	forme en section longitudinale	forme en section transversale	position du plateau racinaire	forme de la base	couleur de fond des tuniques externes sèches	striures anthocyaniques sur la tunique externe sèche	épaisseur des tuniques externes sèches	adhérence des tuniques externes sèches
Rouge locale	Arrondie	Arrondie Circulaire	Plate	Plate	Blanc jaunâtre	Présentes	Epaisse	Moyenne
Mocpta bulgare	Arrondie	Arrondie circulaire	Plate	Plate	Blanc jaunâtre	Présentes	Moyenne	Forte
Messidrome	Arrondie	Elliptique large transverse	Déprimé	Plate	Blanc	Absente	Epaisse	Moyenne
Germidour	Elliptique	Elliptique large transverse	Déprimé	Déprimée	Blanc jaunâtre	Présentes	Moyenne	Faible

Tableau : 27: Notations descriptives des caïeux d'ail

Notations Variétés	position des caïeux à l'extrémité supérieure du bulbe	compacité des caïeux	distribution des caïeux	couleur des tuniques	intensité de la couleur des tuniques	striures anthocyaniques de la tunique	couleur de la chair
Rouge locale	Au même niveau	Forte	Rayonnante	Rose violette	Forte	Absent	Blanche
Mocpta Bulgare	Au même niveau	Forte	Rayonnante	Rose	Forte	Présent	Blanche
Messedrome	Au même niveau	Forte	Rayonnante	Crème en bas et vers le rose en haut	Moyen	Absent	Blanche
Germidour	Extérieure	Moyenne	Non rayonnante	Brune en bas et vers le Rose enhaut	Forte	Présent	Jaunâtre

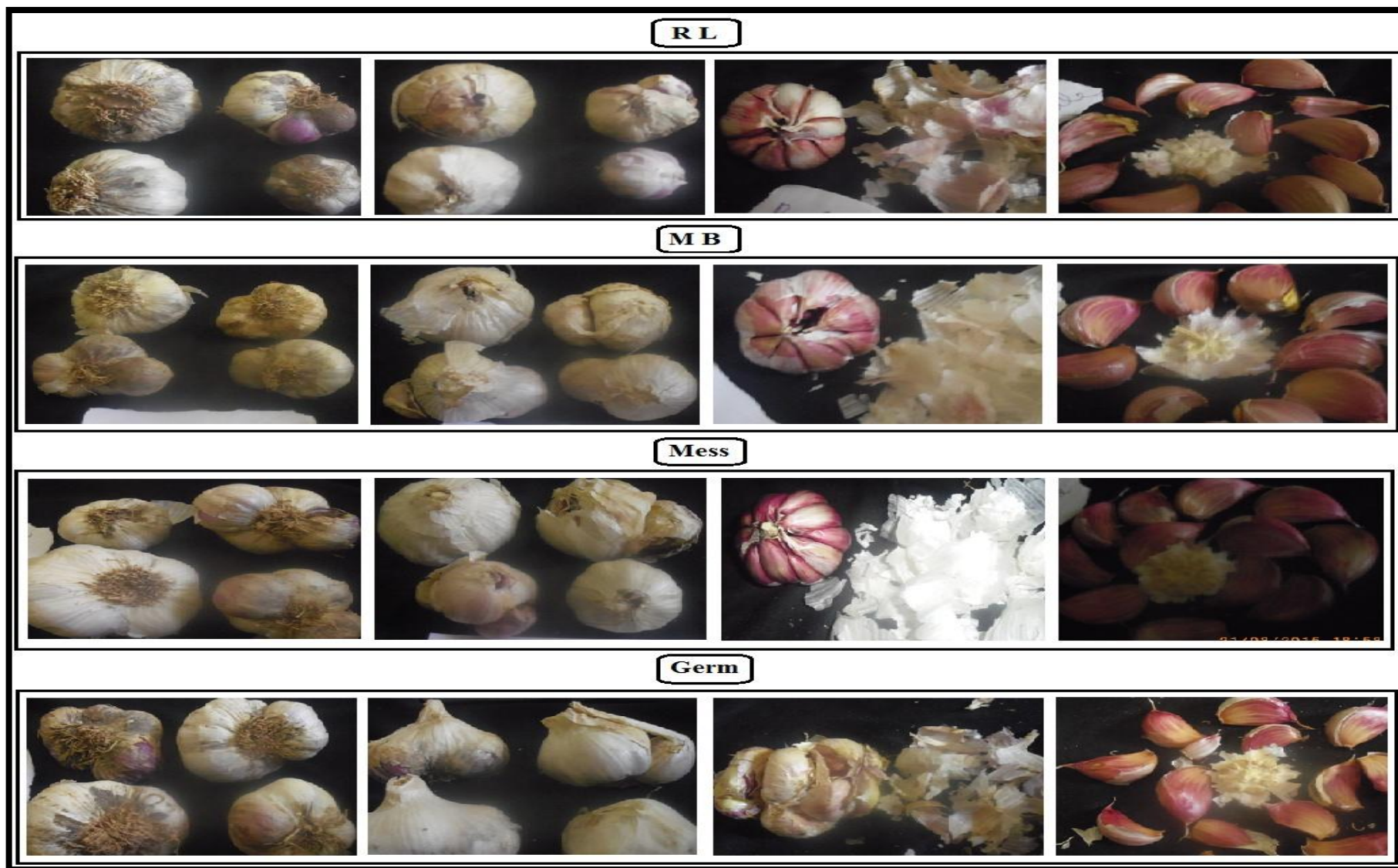


Figure 29 :Notations sur les bulbes et les caïeux des quatre variétés d'ail.

Discussion

La caractérisation morphologique est une des étapes importantes dans la description et la classification des plantes cultivées (Manzano *et al.*, 2001; yabiet *et al.*, 2002 ; Radhouan, 2004).

Les analyses descriptives ont montré des écarts importants entre les valeurs minimales et les valeurs maximales pour l'ensemble des variables morphologiques analysées. Ceci indique une variabilité inter-variétés importante.

L'analyse de la variance indique aussi des effets génotypes significatifs pour la plupart des variables mesurées. Un effet génotype significatif est l'indicateur de différence d'origine en partie génétique. Ces différences sont mises à profit dans le processeur de sélection lorsqu'elles vont dans le sens désiré de l'amélioration du caractère considéré.

Pour l'espèce *Allium cepa* la caractérisation morphologique basée sur les descripteurs morphologiques des trois variétés, au regard de la plupart des caractères morphologiques de bulbes étudiés, a bien révélé l'importance des descripteurs : épaisseur des écailles sèches, adhérence des écailles après récoltes et épaisseur du collet de bulbe dans la discrimination des variétés d'oignon, tandis que la classification des génotypes selon les différentes notations descriptives des écailles sèches du bulbe d'oignon et surtout la couleur des écailles sèches, nous a permis de regrouper les trois génotypes étudiés en deux groupes. Le premier groupe représente les deux variétés RL et RA qui se distinguent par une nuance de la couleur violette et le deuxième groupe ne comporte que la variété JE qui représente la coloration jaune brune.

L'ensemble des analyses portant sur les caractères quantitatifs a permis d'identifier une importante variabilité entre les variétés d'oignon à partir du rendement en bulbe, du nombre de bulbe par kilogramme, du poids d'un Bulbe, nombre de points végétatifs par kg et le nombre des écailles sèches.

A l'issue de cette étude, les variétés JE et RA ont enregistré le meilleur rendement en Bulbe. Elles se distinguent aussi par une moyenne du poids d'un Bulbe et du nombre de points végétatifs élevé par contre, RL qui présente le plus faible rendement en bulbe, le plus faible poids d'un Bulbe et du nombre de points végétatifs, présente le plus important nombre de Bulbe par Kilogramme et le nombre de tuniques internes, ceci témoigne d'une levée importante sur les parcelles de la variété RL, ce qui reflète l'effet exercé par la taille des bulbes sur le rendement de l'oignon.

La comparaison entre le poids moyen d'un bulbe et le rendement fait ressortir une relation hautement positive entre eux, l'augmentation de la taille du Bulbe entraîne une augmentation de la production, ceci concorde aux résultats apportés par Noorbakhshian *et al.*(2006) qui rapportent que le poids du bulbe possède un effet considérable sur le rendement.

Pour l'espèce *Allium sativum*, l'ensemble des analyses portant sur les caractères quantitatifs a permis d'identifier une importante variabilité entre les variétés d'ail à partir du rendement en bulbe, du nombre de bulbe par kilogramme et du poids d'un Bulbe.

Dans cette étude les variétés RL*, Mess et Germ ont enregistré le meilleur rendement en Bulbe. Elles se distinguent aussi par une moyenne du poids d'un Bulbe élevé par contre MB qui présente le plus faible rendement en bulbe présente aussi le plus faible poids d'un Bulbe et le plus important nombre de Bulbe par Kilogramme, ceci témoigne d'une levée importante sur les parcelles de MB, qui nous a permis de dire que l'effet du peuplement par hectare apparait moins net sur la production.

Le rendement moyen obtenu au cours de cette campagne est de 43,47 q/ha et ceci est proche au rendement national moyen de ces Cinq dernières années qui est de 52.59 q/h (FOSTAT-2012).

Conclusion

La caractérisation morphologique sur la base des paramètres quantitatifs et qualitatifs des bulbes des variétés des deux espèces étudiées a indiqué une gamme importante de variabilité phénotypique pour la plupart des caractères morphologiques analysés

Les effets génétiques sur les paramètres des bulbes apparaissent par la comparaison inter-variétés. Ils sont hautement significatifs témoignant une nette influence du génotype sur le phénotype des cultivars des deux espèces ainsi une grande variabilité du matériel végétal étudié. Les différences statistiquement significatives de l'espèce *Allium*, sont décelées principalement très hautement significatives à $p < 0.01$ pour le nombre de Bulbe par kilogramme, le nombre des écailles sèches et le nombre de point végétatifs par kilogramme et significatives pour le poids de Bulbe et le rendement tandis que l'effet variétés n'était pas significatif sur la longueur, le diamètre de Bulbe et le nombre de tunique internes.

Une forte corrélation positive est révélée entre les caractéristiques de bulbe les plus distinctives qui sont : le rendement, le poids d'un bulbe et le nombre de points végétatifs. En outre, le poids de bulbe affiche une corrélation positive avec leur diamètre et leur

longueur. La longueur de bulbe est corrélée positivement avec leur diamètre. Cette régression multiple synthétise l'effet de ces variables. Elle montre que le rendement en bulbes est plus déterminé par le poids de bulbe et le nombre de points végétatifs.

L'analyse en composante principale des caractères quantitatifs a permis de distinguer deux groupes dont 0.67% de variétés pour le premier et 0.33% pour le deuxième.

Les différences statistiquement significatives de l'espèce *Allium sativum* indiquent des effets génotypes significatifs à $p < 0.05$ pour l'ensemble des variables mesurées à l'exception du poids d'un caïeu et le nombre de caïeux par bulbe.

Une forte corrélation positive est remarquée entre le poids de bulbe, le rendement en bulbe et le nombre de caïeux par bulbe. La configuration des caractères quantitatifs étudiés par l'analyse en composante principale, permet de délimiter deux groupes distinctifs dont 0.75% de variétés pour le premier et 0.25% pour le deuxième.

La caractérisation morphologique des cultivars étudiés sur la base des paramètres qualitatifs a mis en évidence un polymorphisme phénotypique important. Les différentes notations descriptives des écailles sèches du bulbe d'oignon montrent une large variabilité variétale pour la présentation des bulbes. La variété Jaune d'Espagne se diffère des deux autres variétés par la totalité des descripteurs des écailles sèches. Les observations effectuées après la récolte pour la description des bulbes présentent une importante variabilité entre les variétés d'oignon pour chaque descripteur, mais l'épaisseur du collet de bulbe peut être considéré comme indicateur important pour différencier les différents types d'oignon étudiés.

Pour l'espèce *Allium sativum*, une importante variabilité variétale est enregistrée pour la présentation des caïeux. En effet, les différentes notations descriptives des caïeux indiquent que certaines catégories telles que la position des caïeux à l'extrémité supérieure du bulbe, compacité des caïeux, distribution des caïeux et couleur de la chair sont spécifiques pour la variété Germidour, tandis qu'un polymorphisme phénotypique moins important a été observé pour les différentes notations descriptives des bulbes.

Enfin, une analyse de la diversité génétique à l'aide des marqueurs moléculaires microsatellites pourrait conduire à mieux caractériser la variabilité entre les variétés des deux espèces étudiées.

II. 2.Caractérisation moléculaire

II. 2. 1. Purification et quantification de l'ADN

L'objectif de cette étude est de déterminer le degré de polymorphisme entre les génotypes d'ail et d'oignon étudiés. Pour cela, nous avons extrait les ADN des génotypes des deux espèces et nous avons estimé leur quantité et leur qualité moyennant la méthode de quantification sur gel d'agarose. Il s'agit d'une quantification visuelle d'ADN en comparaison à un marqueur de poids. Le résultat de cette quantification est illustré dans la figure 30.

L'ADN du phage lambda digéré par Hind III est un marqueur de taille, on l'utilise comme marqueur de quantité car on connaît la taille et la concentration de chacun de ses fragments.

Pour estimer la concentration en ADN de nos échantillons, nous avons chargé 1 μ l de marqueur et 2 μ l d'ADN dans chaque puits correspondant aux génotypes étudiés.

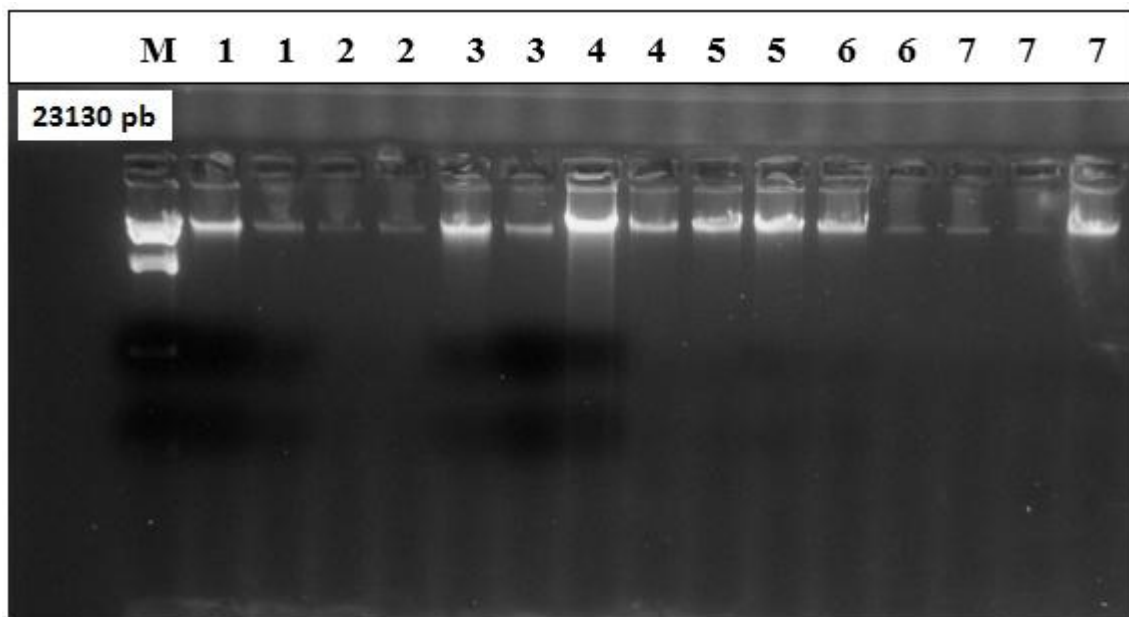


Figure 30: Quantification de l'ADN sur gel d'agarose à 1.5%.

Légende: M = λ Hind III; **1** :Rouge d' Amposta.O ; **2** :Jaune d'Espagne.O ; **3** :Rouge Locale . O; **4**: M. Bulgare.A; **5**:Rouge Lcale.A ; **6**:Messedrom.A ; **7**:Germidour.A

Après avoir déterminé la concentration d'ADN, des dilutions ont été faites pour chaque échantillon afin de la ramener à 50 ng/ μ l(Tableau 28).

Tableau 28: Concentration estimée, facteur de dilution et concentration finale de l'ADN extrait des géotypes étudiés.

Géotype	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
Concentration estimée (ng/μl).	30	120	120	357.75	357.75	120	238.4
Facteur de dilution.	non	4	4	11.92	11.92	4	7.95
Concentration finale (ng/μl).	30	30	30	30	30	30	30

II. 2.2. Diversité génétique de l'espèce *Allium sativum* utilisant les marqueurs microsatellites (SSR)

Pour l'espèce *Allium sativum*, huit paires d'amorces microsatellites ont été utilisées pour étudier la diversité génétique des cultivars (Tableau 29). Parmi les amorces microsatellites de l'*Allium sativum*, seulement six ont généré des profils polymorphes. Ce polymorphisme varie de 0.75 (ASM-59, ASM-40, ASM-109, ASM-78, ASM-72) à 1 (ASM-80). Ainsi, un total de 64 bandes reproductibles a été obtenu (dont 16 bandes sont monomorphes) ce qui génère une moyenne de 16 bandes / géotype; 8 bandes / amorce. Les bandes polymorphes sont au nombre de 48 (soit 75%). La majorité des bandes se situe entre 169 et 410 pb.

Tableau 29: résumé des analyses statistiques de l'hétérosigotie pour tous les loci

Locus	Tailed'Ech	HomObs	Het Obs	Homatt*	Het att*	Nei**
ASM-59	8	0.2500	0.7500	0.4643	0.5357	0.4688
ASM-40	8	0.2500	0.7500	0.4643	0.5357	0.4688
ASM-35	8	1.0000	0.0000	0.5714	0.4286	0.3750
ASM-53	8	1.0000	0.0000	0.5714	0.4286	0.3750
ASM-109	8	0.2500	0.7500	0.4643	0.5357	0.4688
ASM-78	8	0.2500	0.7500	0.4643	0.5357	0.4688
ASM-80	8	0.0000	1.0000	0.4286	0.5714	0.5000
ASM-72	8	0.2500	0.7500	0.4643	0.5357	0.4688
Mean	8	0.4062	0.5938	0.4866	0.5134	0.4492
St. Dev		0.3765	0.3765	0.0538	0.0538	0.0471

* homozygotie attendue et hétérozygotie attendue calculées selon Levene (1949)

** Nei's (1973) hétérozygotie attendue

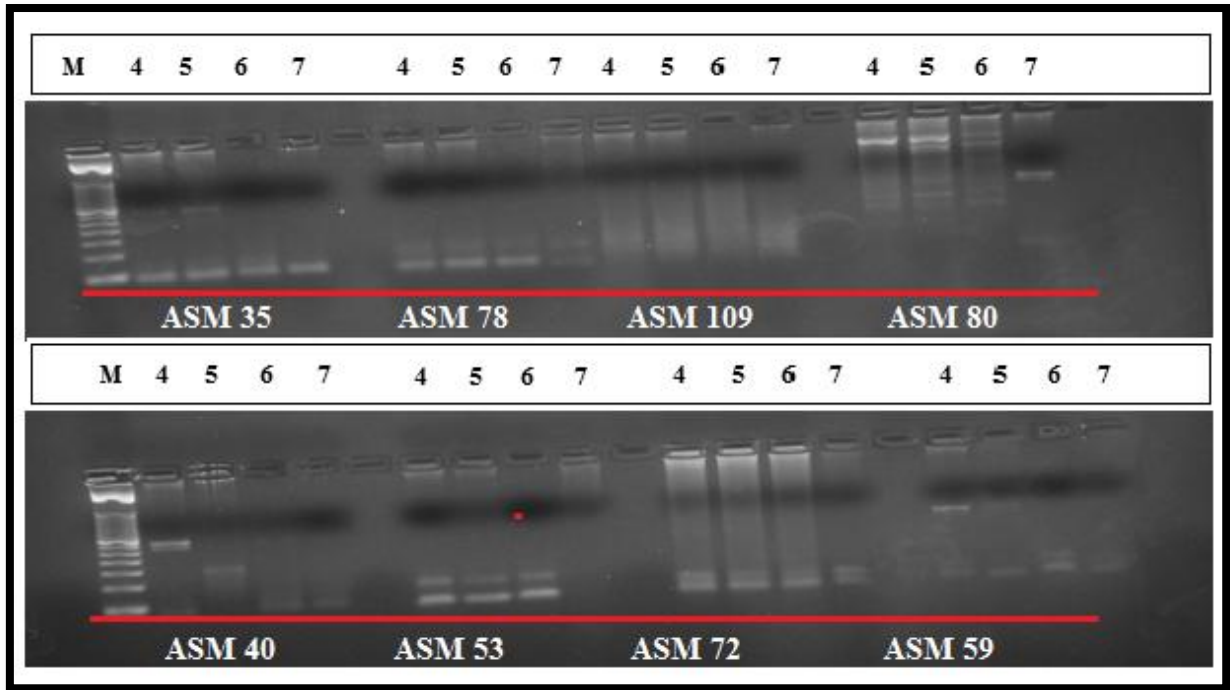


Figure 31 :Résultats d’amplification en se basant sur des amorces ASM.

Tableau 30 : Nombre de fragments générés par chaque marqueur SSR

Marqueur	Séquence: (5’-3’)	PIC1*	Nbre d’allèles détectés	% de polymorphisme	(T°) d’hybridation
ASM-59	F 5’- CTTGCCGGAAC TCGATATT -3’ R 5’- CACAGCAACATGCACCAT -3’	0.6616	2	0.7500	50°C
ASM-40	F 5’- CACAGCAACATGCACCAT -3’ R 5’- TGCCGGAAC TCGATAT -3’	0.6616	2	0.7500	46°C
ASM-35	F5’TTGGACTGAATTCTGAATACCT-3’ R5’-GGGTGTGTGGTTCAAGGA -3’	0.5623	2	0.0000	54°C
ASM-53	F 5’- ACAAGGTCGACATCGTTTG -3’ R 5’- GGGCTTCACCTGAACACA -3’	0.5623	2	0.0000	51°C
ASM-109	F 5’- GGTCTCCTCATCCACCGT -3’ R 5’- GTGTGGGGCATGATTGAC -3’	0.6616	2	0.7500	52°C
ASM-80	F 5’- AATCTCCCTCCAAAGTCCC -3’ R5’-CCTGTATTTTGTGTAAAGCATCA-3’	0.6616	2	0.7500	57°C
ASM-78	F 5’-TGTTCCAACCAGATTTAATGC -3’ R 5’-AAGTGGCGGTTGTGTCTG -3’	0.6931	2	1.0000	52°C
ASM-72	F 5’-CACGCGAATCTTTCTTGG -3’ R 5’-TGCAAAGCAATATGGCAG -3’	0.6616	2	0.7500	48°C

II.2.2.1. Le dendrogramme

L'analyse des profils obtenus a permis de réaliser la matrice de similarité génétique entre les génotypes d'ail étudiés. Cette matrice nous a permis de réaliser le dendrogramme en utilisant le programme Treecon for windows version 1.3b (Figure 32) et la matrice des distances génétiques (Tableau 32). Les constructions phylogénétiques ont été basées sur la méthode des distances génétiques: UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) fondée sur la distance de Nei & Li (1979).

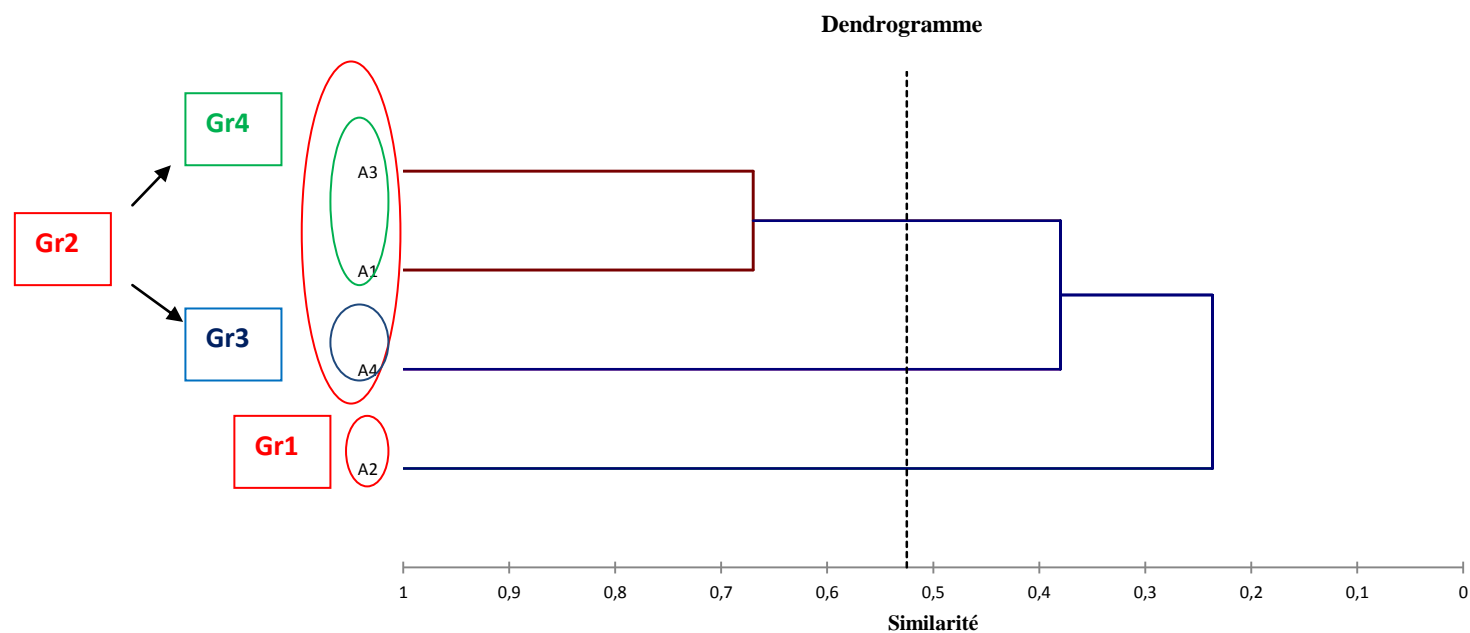


Figure 32 : Dendrogramme de similarité génétique des cultivars d'*Allium sativum* UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) fondée sur la distance de Nei & Li (1979).

A1=MB, A2=RL*, A3 = Mess, A4 = Germ.

Le dendrogramme obtenu (Figure32) basé sur la matrice de similarité (Tableau 31) donne des informations concernant les relations génétiques entre les différents génotypes d'ail en fonction de la distribution allylique des loci.

Tableau31: Matrice de similarité génétique entre les génotypes d'ail.

A1	1			
A2	0,51	1		
A3	0,67	0,16	1	
A4	0,55	0,04	0,21	1

A1= MB , A2= RL* , A3 = Mess , A4 = Germ

En effet, les coefficients de similarité (CS) varient de 0.04 à 0.67 traduisant une importante diversité génétique. Pour une distance de similarité de 0.23, les différents cultivars se séparent en deux grands groupes: Gr1, Gr2. Le premier groupe (Gr1) est composé d'un seul génotype «A2= RL* ». Le deuxième groupe (Gr2) renferme respectivement les génotypes «A1= MB », «A3= Mess » et «A4= Germ », alors que pour une distance de similarité de l'ordre de 0.38, le deuxième groupe se sépare à son tour en deux sous-groupes : le premier renferme l'accession A4 et le deuxième les accessions A1 et A3.

II.2.2.2. Discussion du dendrogramme

◆ Groupe: 1

Le premier groupe comporte le génotype «A2= RL* ». En fait, les analyses morphologiques ne montrent pas cette structuration génétique car cette variété se partage avec deux variétés du deuxième groupe par certains caractères morpho-qualitatifs et quantitatifs liés à la production à savoir: le poids d'un bulbe, le rendement en bulbe et le nombre de caïeux/bulbe.

◆ Groupe: 2

Le deuxième groupe est formé par «A1= MB », «A3= Mess » et «A4= Germ ». L'origine de ces accessions et la classification moléculaire montrent que les deux sous groupes présentent une faible similarité moléculaire de l'ordre de 0.38 et une importante diversité de l'ordre 0.62. Ces deux variétés se trouvent ensemble dans le groupe III qui est représenté dans le catalogue français par : Thermidrôme, Messidrôme, Germidour, Jolimont, Corail, Novatop et " VigorSupreme " (importé d'Amérique).

Le génotype «A4= Germ » constitue un sous groupe à part, au sein de ce deuxième groupe, et se distingue des autres génotypes par certains caractères morpho-qualitatifs reliés aux caïeux à savoir : position des caïeux à l'extrémité supérieure du bulbe, compacité des caïeux, distribution des caïeux et couleur de la chair, mais il partage avec le génotype «A3= Mess » du même groupe et avec le génotype «A2= RL* » du premier groupe certains caractères morpho-quantitatifs reliés à la production à savoir: le poids d'un bulbe, le rendement en bulbe et le nombre de caïeux/bulbe.

En effet, les génotypes «A3= Mess » et «A1= MB » ont un coefficient de similarité génétique de 0.67 et les paramètres quantitatifs n'expliquent pas cette similarité de cultivars. Bien qu'on ne possède pas d'informations sur l'origine de «MB», ces deux variétés font partie du deuxième groupe. Probablement, leur regroupement dans un même cluster vient du fait qu'elles se partagent plusieurs critères relatifs aux caïeux même : position des caïeux à l'extrémité supérieure du bulbe, compacité des caïeux, distribution des caïeux, couleur de la chair et deux autres critères relatifs aux bulbes : forme en section longitudinale et même la forme de la base de bulbes où encore peut être elle ont les mêmes caractères agronomiques. La caractérisation moléculaire des cultivars étudiés sur la base des marqueurs SSR a mis en évidence un polymorphisme moléculaire important.

II. 2.3. Diversité génétique de l'espèce *Allium cepa* utilisant les marqueurs microsatellites (SSR)**II.2.3.1. Le dendrogramme**

Pour l'espèce *Allium cepa*, huit paires d'amorces microsatellites ont été utilisées pour étudier la diversité génétique des trois différents cultivars. Toutes les amorces microsatellites de l'*Allium cepa* ont généré des profils polymorphes. Ce polymorphisme varie de 0.33 (ACM-157, ACM-134, ACM-229, ACM-91,) à 1 (ACM-45, ACM-21, ACM-138). Ainsi, un total de

48 bandes reproductibles a été obtenu ce qui génère une moyenne de 16 bandes / génotype; 6 bandes / amorce. Les bandes polymorphes sont au nombre de 48 (soit 100%). La majorité des bandes se situe entre 90 et 296 pb.

Tableau 32:résumé des analyses statistiques de l'hétérosigotie pour tous les loci.

Locus	Tailed'Ech	HomObs	Het Obs	Homatt*	Het att*	Nei**
ACM-157	6	0.3333	0.6667	0.4667	0.5333	0.4444
ACM-134	6	0.3333	0.6667	0.4667	0.5333	0.4444
ACM-45	6	0.0000	1.0000	0.4000	0.6000	0.5000
ACM-21	6	0.0000	1.0000	0.4000	0.6000	0.5000
ACM-229	6	0.3333	0.6667	0.4667	0.5333	0.4444
ACM-91	6	0.3333	0.6667	0.4667	0.5333	0.4444
ACM-251	6	0.6667	0.3333	0.6667	0.3333	0.2778
ACM-138	6	0.0000	1.0000	0.4000	0.6000	0.5000
Mean	6	0.2500	0.7500	0.4667	0.5333	0.4444
St. Dev		0.2357	0.2357	0.0873	0.0873	0.0727

* Expectedhomozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expectedheterozygosity

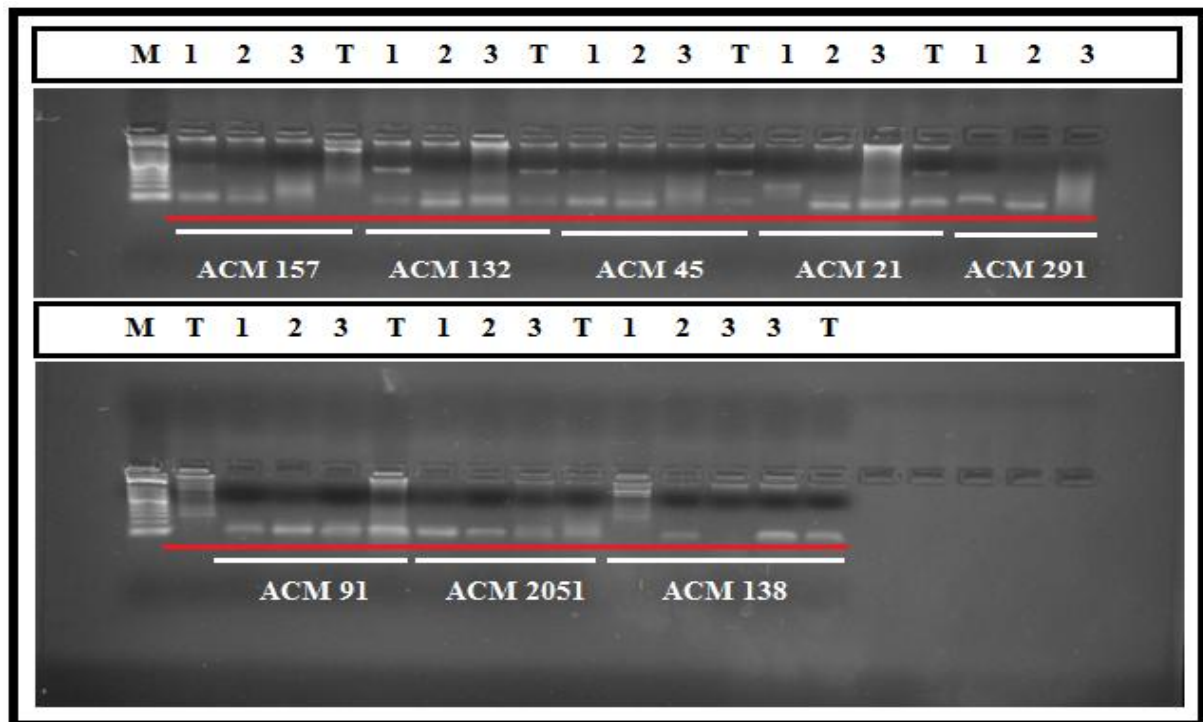


Figure 33:Résultats d'amplification en se basant sur des amorces ACM.

V1=RA , V2=JE , V3 =RL

Tableau 33 : Nombre de fragments générés par chaque marqueur SSR (ACM)

Marqueur	Séquence: (5'-3')	PIC I*	Nbre d'allèles détectés	% de polymorphisme	(T°) d'hybridation
ACM-157	F 5'- GCTAGTTGTACCTGCGCCTC - 3' R 5'- TTGTTGTTGGTGTTCAGG - 3'	0.6365	2	0.6667	56°C
ACM-132	F5'- ATGGGGCCTGGTAAGTTTTT -3' R5'- TGCACACCGTTTCATTTTA -3'	0.6365	2	0.6667	52°C
ACM-45	F5'-AAAACGAAGCAACAAACAAAA 3' R5'-CGACGAAGGTCATAAGTAGGC -3'	0.6931	2	1.0000	55°C
ACM-21	F 5'- GGTTGTTTCCACTACACTTGAG -3' R 5'- CGTCCTTGGTATTCTTGTGC -3'	0.6931	2	1.0000	57°C
ACM-229	F 5'-TACGAGCGGAGGTATGAGC -3' R5'-GCCAGGAAGGCGAGTAGTAA -3'	0.6365	2	0.6667	56°C
ACM-91	F 5'- TCTCCTCCTCTAACCAGCCA -3' R 5'-GGTGCTCCAGTTGAGCTTTC -3'	0.6365	2	0.6667	55°C
ACM-251	F 5'-TCTCCACCACCATTTCATTCA -3' F 5'-GAAGGTGTTTCGGACAAGGA -3'	0.4506	2	0.3333	54°C
ACM-138	F 5'- ACGGTTTGATGCACAAGATG -3' R 5'- CCAACCAACAGTTGATACTGC -3'	0.6931	2	1.0000	55°C

Dendrogramme

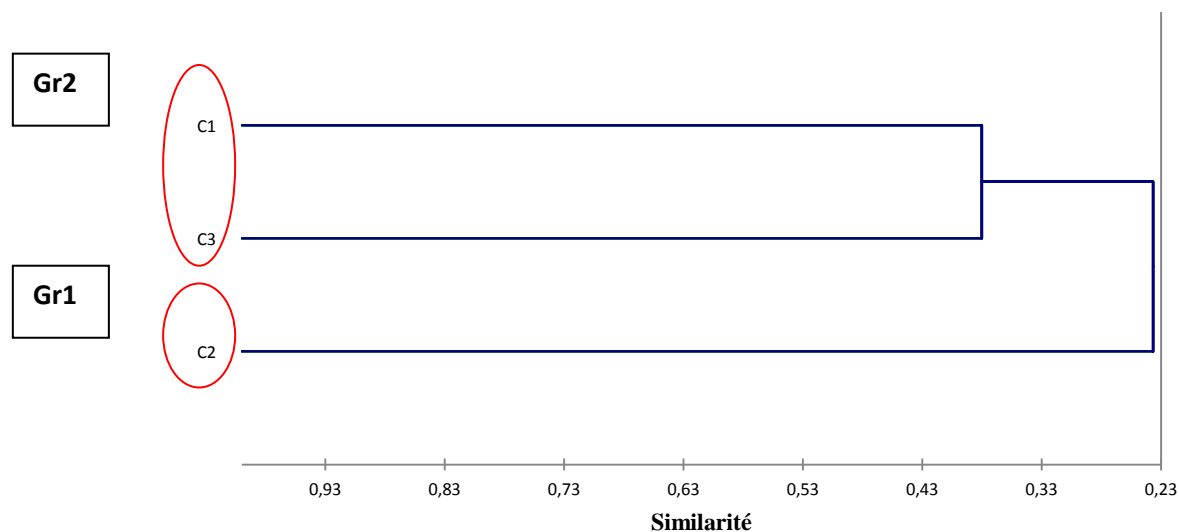


Figure 34: Dendrogramme de similarité génétique des cultivars d'*Allium cepa* UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) fondée sur la distance de Nei & Li (1979).

C1= RA, C2= JE, C3 =RL

Tableau 34: Matrice de similarité génétique entre les génotypes d'oignon.

C1	1		
C2	0,052	1	
C3	0,052	0,3	1

En effet, les coefficients de similarité (CS) varient de 0.052 à 0.3 traduisant une importante diversité génétique. Pour une distance de similarité de 0.23, les différents cultivars se séparent en deux grands groupes: Gr1, Gr2. Le premier groupe (Gr1) est composé d'un seul génotype «C2 ». Alors que pour une distance de similarité de l'ordre de 0.38, le deuxième groupe (Gr2) renferme respectivement les génotypes «C1 et C3».

II.2.3.2. Discussion du dendrogramme

◆ Groupe: 1

Le premier groupe comporte la variété « C2= JE », où on n'a pas signalé l'implication des paramètres morphologiques quantitatifs dans le regroupement de cette variété avec l'autre variété RA. Ce regroupement serait probablement dû à l'origine de ces deux variétés et aux différences au niveau des paramètres morphologiques descriptifs des écailles sèches où la variété JE se diffère de RL et RA par la totalité des descripteurs des écailles sèches (Épaisseur, Adhérence des écailles après récoltes, Couleur de fond des écailles sèches, Intensité de la couleur des écailles sèches et Couleur de l'épiderme des écailles sèches). Donc, les analyses moléculaires basées sur huit microsattellites confirment la description morphologique qualitative des trois génotypes testés.

La classification moléculaire montre que ces deux groupes présentent une similarité moléculaire de l'ordre de 0.23 et une importante diversité de l'ordre 0.77

◆ Groupe: 2

Le deuxième groupe est formé par « C1 = RA » et « C3 = RL ». En examinant l'origine de ces deux cultivars rassemblés dans ce groupe, on remarque qu'ils ont la même origine où se partagent presque les mêmes caractéristiques morphologiques descriptives des écailles sèches, cités plus haut. Cela confirme les travaux de Rouambaet *al.*, (1997) qui ont signalé que la couleur et la forme des bulbes d'oignon sont les principaux descripteurs morphologiques qui permettent de différencier les variétés d'Afrique. Kim *et al.* (2009) ont

montré aussi que la couleur des bulbes, Blanche, jaune, brune, rouge ou violette, a été utilisée comme un critère majeur pour analyser la diversité génétique, ainsi que pour classer, sélectionner et créer de nouvelles variétés de l'oignon. Reiman (1931) a montré que la couleur est principalement régie par une série de gènes à hérédité mendélienne mono- et oligogénique. Kim *et al.* (2004) indiquent l'existence d'un autre allèle (*P*) indépendant qui contrôle la couleur violette des bulbes.

La classification moléculaire montre que ces deux variétés présentent une similarité moléculaire de l'ordre de 0.38 et une importante diversité de l'ordre 0.62 ce qui confirme le polymorphisme moléculaire de tous les cultivars de cette espèce.

Conclusion

L'analyse moléculaire de la variabilité génétique des variétés d'ail sur la base de huit couples d'amorce SSR, a permis de générer un nombre relativement grand de marqueurs polymorphes ainsi que des taux de polymorphisme élevés chez les quatre types de cultivars, ce qui suggère que la diversité morphologique de ces variétés, est au moins attribuable aux bases génétiques (Wiesman *et al.*, 1998).

Le nombre de bandes polymorphes, le taux de polymorphisme ont montré une grande variabilité entre les différentes variétés testées.

Pour l'espèce *Allium cepa*, la caractérisation moléculaire a permis de distinguer les variétés entre elles et les a groupées en 2 groupes distincts. Les variétés formant le deuxième groupe se partagent au moins 2 ou 3 caractères morphologiques qualitatifs ensemble. Ce résultat fait penser à ce que les amorces (SSR) utilisées ont amplifié des loci exprimant les paramètres morphologiques qualitatifs. Toutes ces constatations montrent l'importance des marqueurs SSR comme outil moléculaire pour identifier la diversité intra spécifique et intra variétale des cultivars de ces deux espèces.

Les deux dendrogrammes établis à partir de la matrice de similarité des marqueurs SSR, montre une différenciation des génotypes claire et facile à interpréter.

L'étude de la diversité pourrait être plus efficace en augmentant le nombre de caractères morphologiques étudiés et en faisant une caractérisation agro- morphologique, ce qui pourrait améliorer la concordance entre les dendrogrammes obtenus suite à l'analyse moléculaire et à l'étude morphologique. De même, l'utilisation de nouvelles amorces pourrait permettre de révéler de nouveaux marqueurs.

❖ **Compatibilité des données moléculaires avec les données morphologiques**

Les deux groupes résultants des deux dendrogrammes de similarité de l'SSR présentent une similarité moins importante avec les groupes générés par les axes 1 et 2 au niveau de l'ACP des deux espèces résultant des paramètres morphologiques. Ce résultat fait penser à ce que les amorces (SSR) utilisées ont amplifié des loci exprimant les paramètres morphologiques qualitatifs pour les deux espèces.

II.3. Analyses Biochimiques**II.3.1. Screening phytochimique**

Les résultats des tests de caractérisation phytochimique réalisés sur les extraits des sept variétés étudiées, sont représentés dans le tableau 35.

Tableau 35 : Résultats de l'analyse phytochimique des deux espèces.

Métabolites	<i>Allium sativum</i>				<i>Allium cepa</i>		
	Mess	Germ	MB	RL*	RL	JE	RA
Saponosides	+	+	+	+	-	-	-
Tannins	-	-	-	-	+	±	+
Glycosides	-	-	-	+	±	±	+
Flavonoïdes	-	-	-	-	+	±	+
Alcaloïdes	+	+	+	+	+	+	+
Stérols et triterpènes	-	-	-	-	+	+	+

Signification des symboles : (+) : présence, (-) : absence, (±) : trace.

Il ressort que les alcaloïdes sont révélés dans toutes les variétés étudiées, cependant, les tanins seuls les variétés d'oignon en sont pourvus alors que pour l'ail aucun résultat positif n'a été enregistré. Il faut signaler, aussi que, les flavonoïdes, les stérols et les triterpènes, le test de saponosides est positif qu'avec les quatre variétés de l'ail

Les résultats des tests des glucosides (sucres réducteurs) varient d'une variété à l'autre, on note une présence importante dans deux variétés une de l'ail (RL*) et l'autre de l'oignon (RA), avec une présence faible chez deux variétés d'oignon (RL et JE). Les résultats des analyses phytochimiques s'accordent avec ceux obtenus par Manganbu et al, (2014) et ChitraShenoy et al, (2009).

II.3.2. Rendement en huiles essentielles :

Les rendements moyens en huile ont été calculé par rapport à 1000 g de la matière fraîche, pour les variétés de l'ail : Rouges locale, Messedrom, Germidour et Mocpta-Bulguar les rendements sont respectivement de $(0,72\% \pm 0,015)$, $(0,46\% \pm 0,026)$, $(0,61\% \pm 0,01)$ et $(0,51\% \pm 0,01)$ (figure 35). Pour les variétés de l'oignon Rouge locale, Jaune d'Espagne, Rouge d'Amposta sont respectivement de $(0,64 \pm 0,032)$ $(0,40 \pm 0,015)$ et $(0,52 \pm 0,01)$ (figure 36).

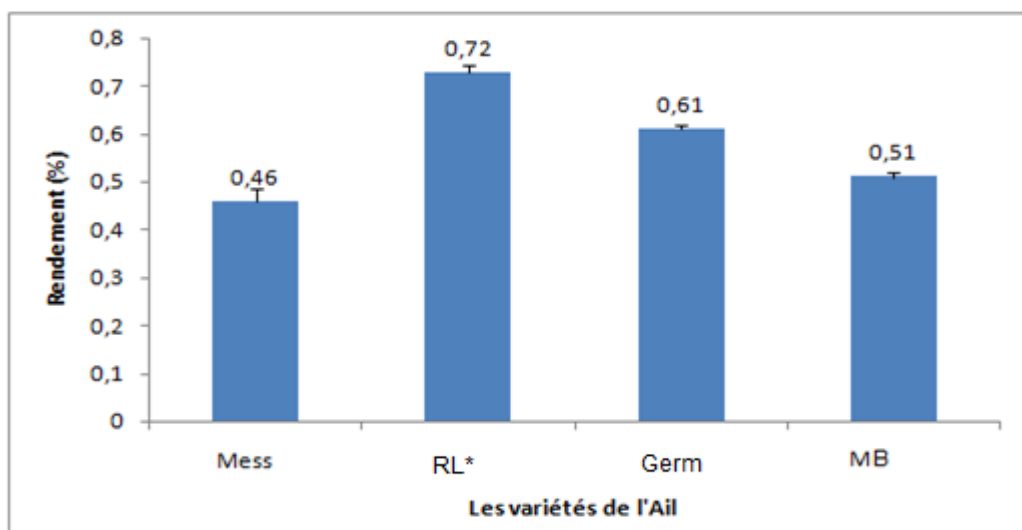


Figure 35 : Rendement en H.E des variétés de l'*Allium sativum*.

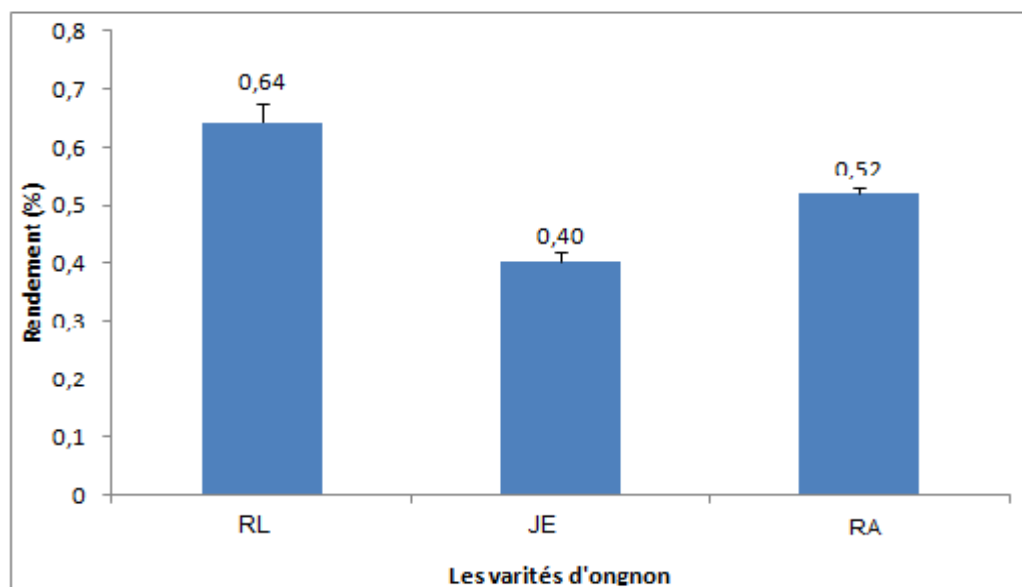


Figure 36 : Rendement en H.E des variétés d'*Allium cepa*

II.3.3. Etude analytique de l'huile essentielle :

II.3.3.1 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites

De part la saveur épicée et l'aspect mobile des huiles essentielles qui sont similaires chez les deux espèces, cependant, la couleur diffère d'une variété à l'autre tandis que l'odeur se diffère d'une espèce à une autre (tableau 36).

Tableau36: Caractéristiques organoleptiques desextraits des huiles essentielles.

Caractère		Odeur	Couleur
Variétés			
Ail	RL*	Forte et désagréable, Alliées	Jaune très Claire
	Mess	Forte et désagréable, Alliées	Jaune d'orée (foncée)
	Germ	Forte et désagréable, Alliées	Jaune d'orée (foncée)
	MB	Forte et désagréable, Alliées	Jaune d'orée
Oignon	RL	Forte et désagréable, odeur sulfure	Jaune d'orée dégradée vers la claire
	JE	Forte et désagréable, odeur sulfure	Jaune d'orée dégradée vers le claire (en bas)
	RA	Forte et désagréable, odeur sulfure	Jaune claire

II.3.3.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les principales caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles des espèces *Allium sativum* et *Allium cepa* sont récapitulés dans le tableau37.

Tableau 37 :Caractéristiquesphysicochimiques del'huileessentielle

Espèce	<i>Allium sativum</i>				<i>Allium cepa</i>		
	RL*	Germ	Mess	MB	JE	RA	RL
indice d'acide	6.63	6.78	10.35	7.68	5.13	4.18	8.28
indice d'ester	86.24	86.21	94.96	113.55	125.98	103.25	137.01
Indice de Saponification	92.87	92.99	105.31	121.23	131.11	107.43	145.29
Indice de peroxyde	7.97	7.13	7.13	7.15	7.12	7.11	7.14
Indice de réfraction	1.4650	1.4640	1.4691	1.4640	1.4691	1.4651	1.4700
Densité à 20°C	1.026	1.025	1.028	1.029	1.028	1.029	1.030
Miscibilité à Ethanol 70 °	2.75	2.75	2.75	3.0	3.0	3.0	2.95

Les résultats des analyses physico-chimiques montrent que les huiles essentielles se trouvent dans les fourchettes des normes de références établies par AFNOR. Cependant, il faut signaler qu'à l'exception des huiles des variétés Mess et MB les indices d'ester, d'acidité et de saponification sont plus élevés que pour les deux autres variétés d'ail et l'oignon RL.

II.3.3.3. Analyse chimique des huiles essentielles :

Les résultats obtenus par la méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée au spectre de masse (CG/SM) sont portés respectivement dans les tableaux 38 et 39 pour les variétés d'oignon et 40, 41, 42 et 43 pour les variétés de l'ail.

Allium cepa

Tableau 38 : Composition chimique de l'huile essentielle de la variété RA

Temps de rétention	Nom de Composé	%
3.192	3,4-Diméthylthiophène	0.089
3.619	3,4-Diméthylthiophène	0.637
3.789	1-propène, 3-bromo-	0.139
4.146	Disulfure, méthylpropyl	3.010
4.855	Diméthyltrisulfure	0.508
9.695	Disulfure, dipropyl	0.979
10.990	1, 2, 4, 5-Tétrazine 3, 6-diamine	0.518
17.985	1,2,4-Trithiolane, 3,5-diéthyl-	0.428
18.307	1,2,4-Trithiolane, 3,5-diéthyl-	1.790
29.039	3-Décanol	0.348
36.248	2-Buténoïque acide, 1-méthylethylester	0.269
36.383	Nonane, 3-iodo -	0.169
39.146	Undécane, 3-méthyl-	0.099
39.992	Citronellylisobutyrate	0.209
41.511	1-Undécène -4-ol	0.209
41.706	Hexadécanoïque acide, méthylester	3.109
42.600	n-Hexadécanoïque acide	5.370
46.101	10,13-Octadécadiénoïque acide, méthylester	1.186
46.199	9,12,15-Octadécatriénoïque acide, mentylester, z,z,z	1.146
46.468	9-Octadécénoïque acide (z)-, méthylester	8.123
47.727	9,12-Octadécadiénoïque acide mentylester	42.15
48.080	Oleïque acide	27.23
49.282	Octadécanoïque acide	1.540

Tableau 39:Composition chimique de l'huile essentielle de la variété RL.

Temps de rétention	Nom de composé	%
3.630	3,4Dimethylthiophene	1.140
3.801	2(3H)-Furanone,3-bromodihydro-	0.570
4.159	Disulfide,methyl propyl	2.880
41.72	Hexadecanoicacid,methyl ester	8.930
42.599	n- Hexadecanoic acid	2.190
46.480	8-Octadecadienoic acid,methyl ester	14.83
47.593	9,12- Octadecadienoic acid(Z,Z)-	36.00
47.964	Oleic Acid	28.67
48.283	4-Aminocyclohexanone,N-acetyl-	2.890

Au total, 23 composés ont été identifiés dans l'HE de la variété RA et 09 composés dans l'HE de la variété RL ce qui correspond respectivement à un pourcentage de (99,67%) et de (98,84%) par rapport à l'ensemble des constituants isolés. Nous avons identifié cinq composés soufrés dans l'huile essentielle de la variété RA soit le 3,4Dimethylthiophene (0.726%), le disulfure méthylpropyl (3,01%), le diméthyltrisulfide (0,50%), le disulfuddipropyl (0,979%) le 1, 2,4-Trithiolane, et le 3,5-diethyl- (2.218%), alors que la variété rouge locale n'en contient que le 3,4Dimethylthiophene (1.140%) et le disulfure de méthylpropyl (2,89%).

✚ *Allium sativum*

Tableau 40 : composition chimique de l'huile essentielle de la variété Germ

Temps de rétention	Nom de composé	%
3.117	3-hexadecyloxy-carbonyl-5-(hydroxyethyl)-4-methylimidazolium ion	26.15
3.791	Disulfide, methyl 2 propenyl	18.72
4.852	Dimethyltrisulfide	0.93
8.459	Diallyldisulphide	26.91
9.068	Tetrasulfide, di-2-propenyl	0.32
9.296	Diallyldisulphide	0.39
10.374	Sulfide, allylmethyl	7.34
12.998	3-vinyl-1, 2-dithiacyclohex-5-ene	0.54
17.075	Trisulfide, di-2-propenyl	15.24
17.718	3-hexanol, 2-methyl-5-nitro-, (R*,R*)-	0.18
18.410	1,2-dithiolane	0.14
18.483	dl-Alanyl-dl-leucine	0.04
19.997	Disulfide, methyl 2-propenyl	0.39
20.711	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	0.11
22.962	Sulfur	0.13
26.599	Tetrasulfide, di-2-propenyl	0.53
41.733	Hexadecanoic acid, methyl ester	0.70
42.713	n-Hexadecanoic acid	0.17
46.508	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	0.98

Tableau 41: composition chimique de l'huile essentielle de la variété Mess.

Temps de rétention	Nom de composé	%
3.355	1-propene, 3.3'-thiobis-	0.32
3.800	Disulfide, methyl 2-propenyl	12.21
4.148	Disulfide, methyl 2-propenyl	0.52
4.324	1, 3-dithiane	0.66
4.860	Dimethyltrisulfide	3.54
8.476	Diallyldisulphide	30.25
9.075	Diallyldisulphide	1.18
9.301	Diallyldisulphide	2.07
10.391	(methylthio)-acetonitrile	19.59
17.098	Trisulfide, di-2-propenyl	26.41
18.420	L, 2-dithiolane	0.16
19.997	Disulfide, meththyl 2-proponyl	0.74
26.610	Tetrasulfide, di-2-proponyl	0.67
41.354	Cyclicoctaatomic sulfur	0.15
41.725	Hexadecanoicacid, methyl ester	0.35
42.600	n-octadecenoic acid (z)-, methyl ester	0.19
46.490	9-octadecenoic acid (z)-, methyl ester	0.56
47.966	Oleic acid	0.41

Il faut signaler que parmi les différents composés identifiés dans l'HE des diverses variétés, certains sont soufrés et qui se répartissent comme suit :

- la variété Germ en contient 15 composés identifiés dont neuf soufrés
- la variété Mess renferme 14 composés parmi lesquels dix sont soufrés,

Alors que les variétés MB et RL* les composés détectés sont respectivement de cinq soufrés sur 10 et onze composés soufrés sur 18.

Il a été constaté que leur constituant majoritaire différent sensiblement où, par exemple, dans la variété RL* domine le Trisulfide, di-2-proponyl avec 43.24%, par contre pour les variétés Germ, Mess et MB le diallyldisulfide prédomine avec respectivement (27.3%), (33.5%) et (33.75%).

Tableau42: Composition chimique de l'huile essentielle de la variété MB.

Temps de rétention	Nom de Composé	%
3.786	Disulfide,methyl 2-propenyl	30.15
4.852	Dimethyltrisulfide	3.21
8.452	Diallyl disulfide	33.75
10.383	(Methylthio)-acetonitrile	8.95
17.092	Trisulfide,di-2-propenyl	4.53
41.726	Hexadecanoic acid ,methyl ester	2.76
46.490	1-Hexadecyne	4.50
47.750	Nonanoicacid,methyles ester	0.63
49.614	1,2-Benzenedicarboxylic acid,diisooctyl ester	11.12
50.025	1,4-Phenylenediamine,N,N'-di(2-thienoyl)-	0.40

Tableau 43:Composition chimique de l'huile essentielle de la variété RL*.

Temps de rétention	Nom de composé	%
3.777	Disulfide,methyl 2-propenyl	3.63
4.306	Ethene,1,2-bis(methylthio)-	0.34
4.836	Dimethyl trisulfide	1.42
8.455	Diallyl disulfide	19.23
9.054	Diallyl disulfide	0.69
9.278	Diallyl disulfide	1.52
10.383	Sulfide,allyl methyl	20.48
11.941	sec-Butyl pentyl disulfide	0.42
12.967	3-Vinyl-1,2-dithiacyclohex-5-ene	0.38
17.130	Trisulfide,di-2-propenyl	43.13
18.394	1,2-Dithiolane	0.47
19.980	Disulfide,methyl 2-propenyl	1.17
20.639	Pentane,3-methyl-	0.45
26.571	Tetrasulfide,di-2-propenyl	1.70
41.324	Cyclic octaatomic sulfur	0.28
42.568	n-Hexadecanoic acid	0.27
47.610	9,12- octadecadienoic acid (Z,Z-	2.11
47.988	Oleic Acid	1.81

II.3.4. Classification hiérarchique :

Une présentation des génotypes d'ail et d'oignon, basée sur les différents paramètres biochimiques en fonction de la distance euclidienne au carré, a montré bien des profils clairs qui expliquent leurs classement en groupes homogènes.

II.3.4.1. Classification en fonction de résultats de screening phytochimique

✚ *Allium sativum*

D'après la matrice de dissimilarité entre les variétés de l'espèce *Allium sativum* (Tableau 44), il ressort que les variétés Germ, MB et Mess sont peu éloigné à la variété RL* avec un coefficient de dissimilarité de (1,000).

Tableau 44:Matrice de dissimilarité des variétés d'ail en fonction de résultats de screening phytochimique.

Observation	Carré de la distance Euclidienne			
	Mess	Germ	MB	RL*
Mess	0,000	0,000	0,000	1,000
Germ	0,000	0,000	0,000	1,000
MB	0,000	0,000	0,000	1,000
RL*	1,000	1,000	1,000	0,000

En se référant au dendrogramme (Figure 37), nous remarquons que les génotypes d'ail étudiés se répartissent en deux groupes. Le premier groupe est composé des génotypes Germ, MB et Mess. Ces génotypes se sont groupés ensemble car ils présentent les mêmes résultats des testes des différents principes actifs étudiés. Le deuxième groupe ne renferme que la variété RL* qui se diffère des variétés du premier groupe par une présence importante en glucosides.

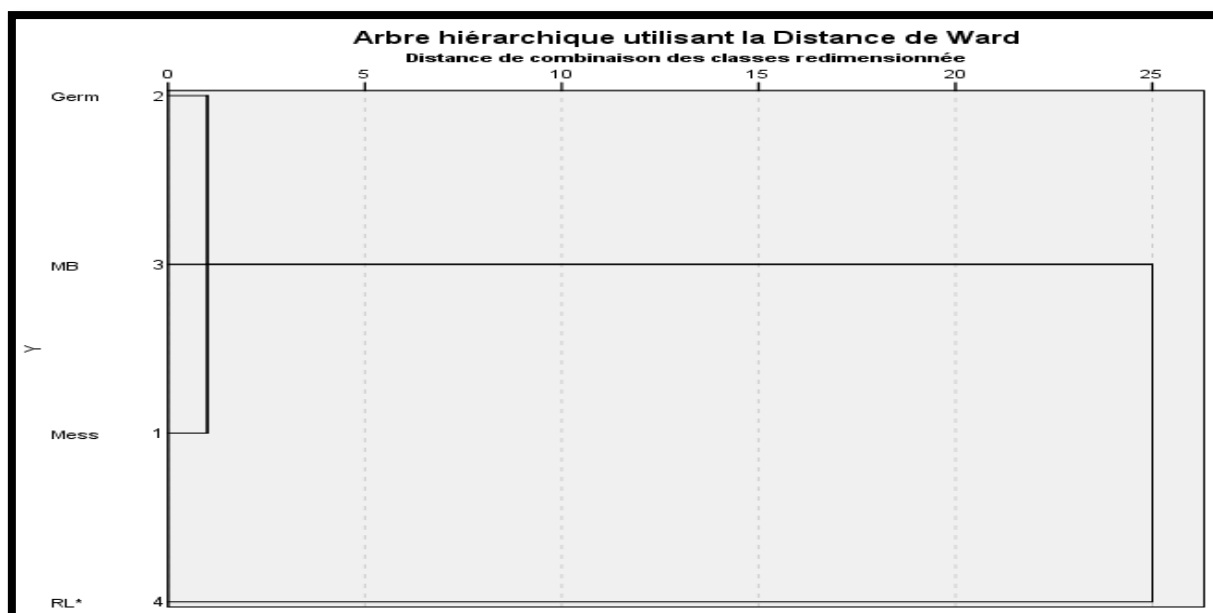


Figure 37 :Dendrogramme de dissimilarité génétique entre les génotypes d'ail, basé sur les résultats du screening phytochimique.

✚ *Allium cepa*

La matrice de dissimilarité entre les variétés de l'espèce *Allium cepa* (Tableau 45), montre que les variétés RL et RA sont trop éloignées à la variété RL* avec un coefficient de dissimilarité de (2,000) et (3,00) respectivement.

Tableau 45:Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction de résultats de screening phytochimique.

Observation	Carré de la distance Euclidienne		
	RL	JE	RA
RL	0,000	2,000	1,000
JE	2,000	0,000	3,000
RA	1,000	3,000	0,000

Le dendrogramme obtenu (Figure38) basé sur la matrice de disimilarité (Tableau 45) donne des informations concernant les relations génétiques entre les différents génotypes d'oignon en fonction de résultats des testes des différents principes actifs étudiés. Les différents cultivars se séparent en deux grands groupes, le premier groupe est composé d'un seul génotype JE. Le deuxième groupe renferme les génotypes RL et RA.

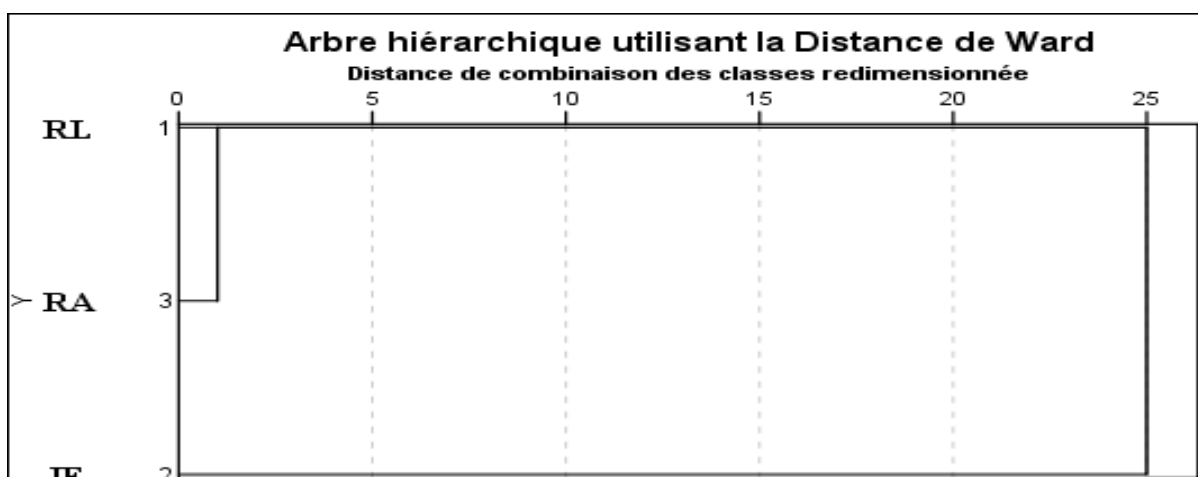


Figure 38 :Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon, basé sur le paramètre du screening phytochimique.

II.3.4.2. Classification en fonction du rendement en HE

✚ *Allium cepa*

D'après la matrice de proximité entre les variétés de l'espèce *Allium cepa*(Tableau 46), il ressort que la variété JE se trouve éloigné à la variété RL* avec un coefficient de

dissimilarité de (0,058), cependant la variété RA s'occupe un emplacement intermédiaire entre ces deux variétés avec un coefficient de dissimilarité de (0,014), mais elle forme un groupe appart avec la variété JE. Le dendrogramme obtenu, nous a permis de dire que la variété JE forme un groupe appart avec la variété RA. Ces deux variétés se sont groupées ensembles car elles présentent un rendement moins important que la variété RL du l'autre groupe .

Tableau 46:Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction du rendement en HE

Observation	Carré de la distance Euclidienne		
	RL	JE	RA
RL	0,000	0,058	0,014
JE	0,058	0,000	0,014
RA	0,014	0,014	0,000

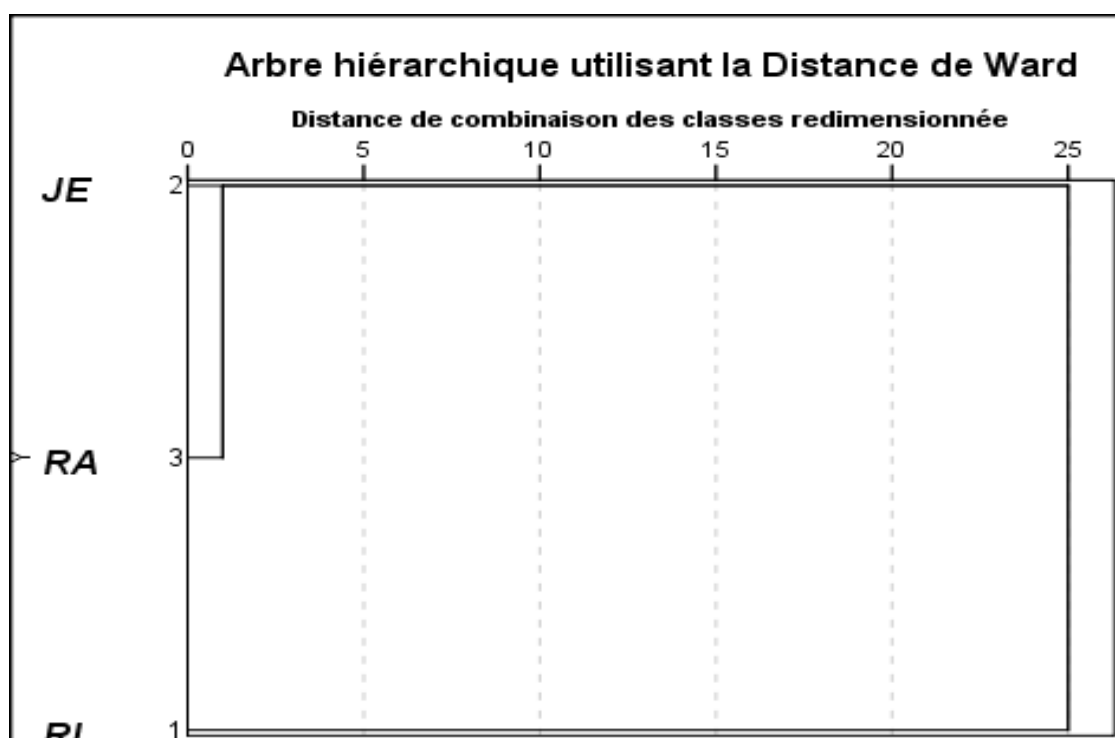


Figure 39 :Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon, basé sur le paramètre du redement en HE.

✚ *Allium sativum*

L'analyse des résultats du rendement en huile essentielle obtenus a permis de réaliser la matrice de proximité génétique entre les génotypes de l'ail (tableau47). D'après Cette matrice il apparait que la variété Mess se trouve éloignée des deux variétés RL* et Germ avec respectivement des coefficients de dissimilarité de 0,071 et 0, 023, tandis que ces deux dernières variétés se séparent entre elles par un coefficient de 0.014 et de la variété MB par des coefficients de dissimilarité de 0.047 et 0.010 respectivement. Cette matrice de proximité nous a permis de réaliser le dendrogramme illustré dans la (figure 40) où il ressort que les différents génotypes se séparent en deux grands groupes, le premier groupe est composé des variétés RL* et Germ qui se distinguent des variétés du deuxième groupe Mess et MB par une teneur importante en HE.

Tableau 47:Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction du rendement en HE.

Observation	Carré de la distance Euclidienne			
	Mess	RL*	Germ	MB
Mess	0,000	0,071	0,023	0,003
RL*	0,071	0,000	0,014	0,047
Germ	0,023	0,014	0,000	0,010
MB	0,003	0,047	0,010	0,000

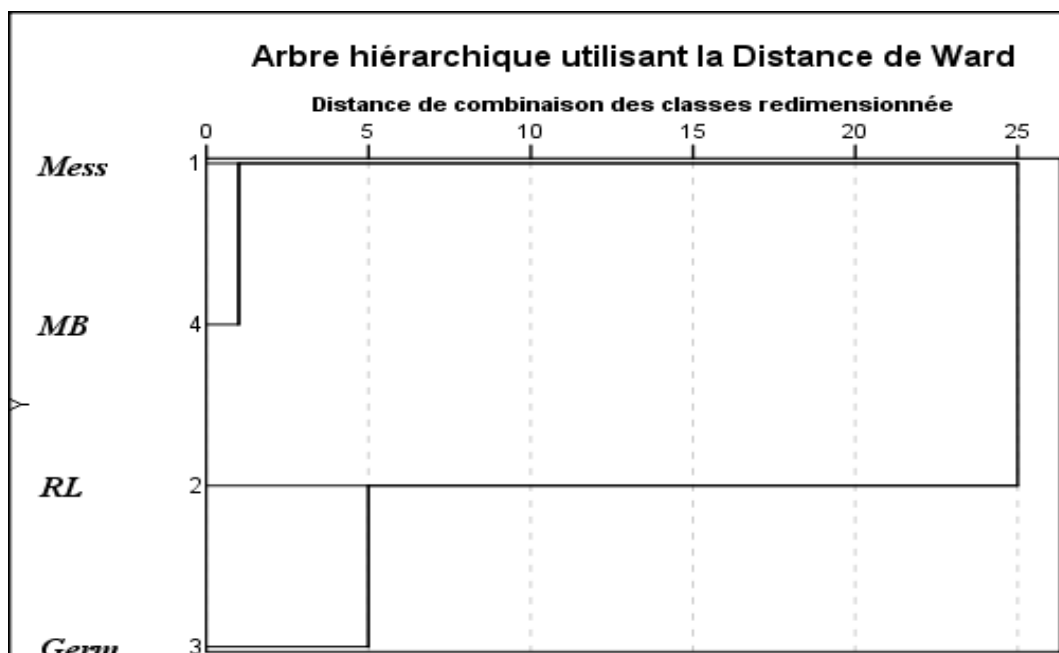


Figure 40 :Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'ail, basé sur le paramètre du redement en HE.

II.3.4.3. Classification en fonction des caractéristiques organoleptique des HEs

✚ *Allium sativum*

La matrice de dissimilarité entre les variétés de l'ail (Tableau 48), montre que les variétés Mess et Germ sont trop éloignées à la variété RL* avec un coefficient de dissimilarité de (4,000) pour les deux variétés. Cependant la variété MB se sépare de ces trois variétés par un coefficient de dissimilarité de (1.000). Deux groupes uniquement sont observés en cas où on considère la couleur de l'huile essentielle en tant que critère de classification des génotypes (figure 41). Le premier groupe est composé des génotypes RL* et MB . Ces génotypes se sont groupés ensemble car ils sont étroitement liés (coefficient de dissimilarité de 1.000. Dans le deuxième groupe les variétés «Germ» et «Mess» présentent un coefficient de dissimilarité de l'ordre de 0.000 (Tableau 48). Ces génotypes se partagent les mêmes caractères organoleptiques des huiles essentielles extraites, en particulier la couleur.

Tableau 48:Matrice de dissimilarité des variétés d'ail en fonction des caractéristiques organoleptiques des HEs.

Observation	Carré de la distance Euclidienne			
	RL*	Mess	Germ	MB
RL*	0,000	4,000	4,000	1,000
Mess	4,000	0,000	0,000	1,000
Germ	4,000	0,000	0,000	1,000
MB	1,000	1,000	1,000	0,000

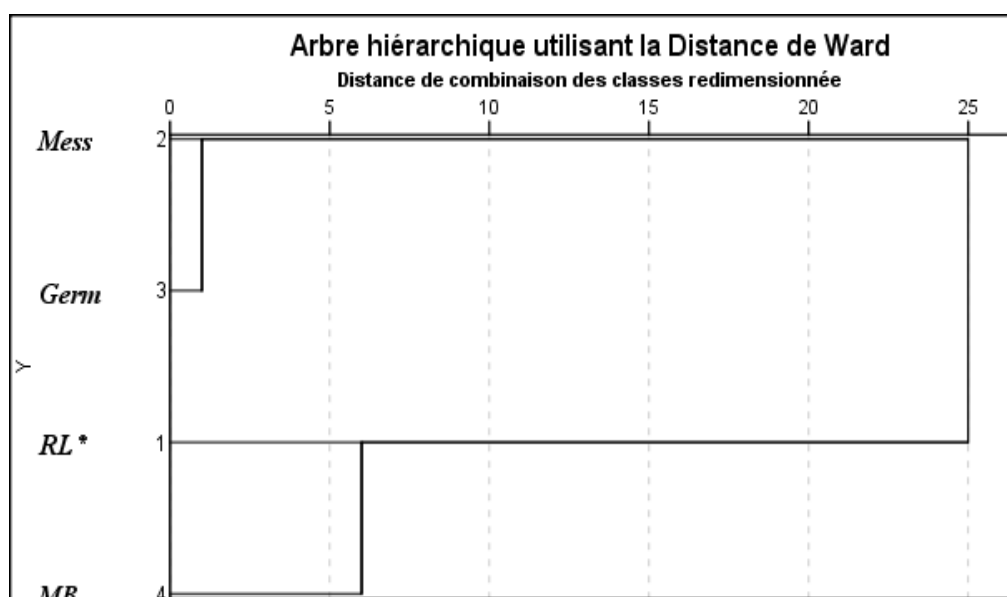


Figure 41 :Dendrogramme de dissimilarité génétique entre les génotypes d'ail, basé sur les caractéristiques organoleptiques des HEs.

✚ *Allium cepa*

L'analyse des résultats des caractéristiques organoleptiques obtenus a permis de réaliser la matrice de proximité génétique entre les génotypes de l'oignon (tableau 49). D'après Cette matrice il ressort que la variété RA se sépare des deux variétés RL et JE par un coefficient de dissimilarité de 1,000, tandis que ces deux dernières variétés se trouvent étroitement liées coefficients de dissimilarités de 0,000. Cette matrice de proximité nous a permis de réaliser le dendrogramme illustré dans la figure 42, où il ressort que les différents génotypes se séparent en deux groupes, le premier groupe est composé des variétés RL et JE qui se distinguent de la variété RA du deuxième groupe par la couleur, jaune d'orée dégradée vers le claire, de leurs HEs.

Tableau 49:Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction des caractéristiques organoleptiques des HEs.

Observation	Carré de la distance Euclidienne		
	RL	JE	RA
RL	0,000	0,000	1,000
JE	0,000	0,000	1,000
RA	1,000	1,000	0,000

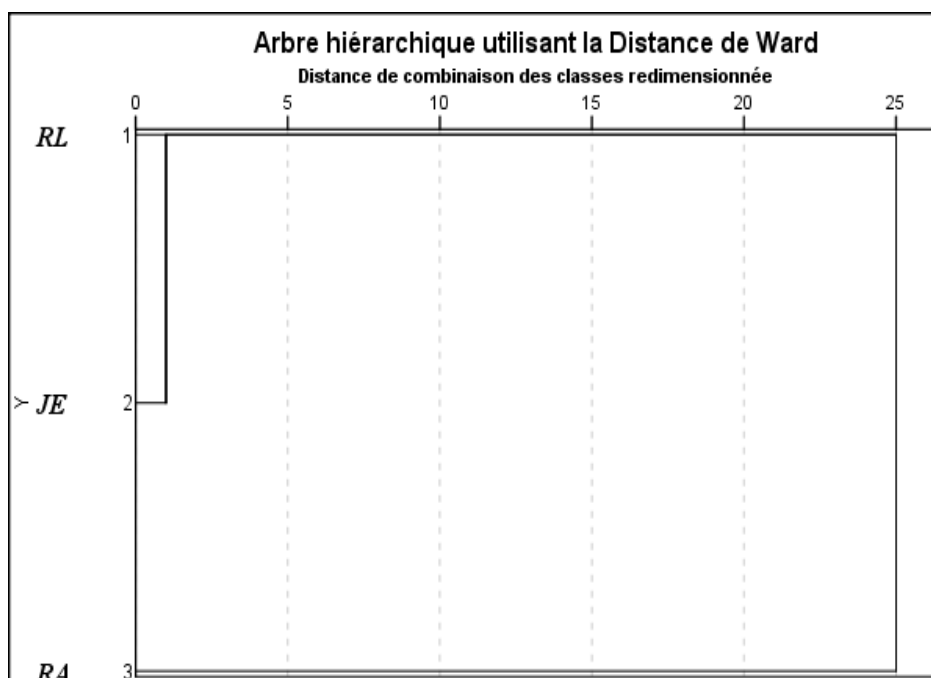


Figure 42 :Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon, basé sur les caractéristiques organoleptiques des HEs.

II.3.4.4. Classification en fonction des paramètres physico chimiques :

✚ *Allium sativum*

Les coefficients de dissimilarité observés dans la matrice de proximité (tableau 50) varient de 0.000 à 1551.963, les coefficients les plus élevés sont observés au sein des variétés qui présentent la différence maximale au niveau de leurs paramètres physico-chimiques. A titre d'exemple les couples de cultivars : (MB, RL*), (MB, Germ), (Mess, RL*), (Mess, Germ) et (MB, Mess) présentent des coefficients de dissimilarité de 1551.963, 1545.846, 245.336, 241.090, 606.226 respectivement. Un faible coefficient de 0.743 est aussi observé, l'exemple de couple de cultivars (RL*, Germ). L'établissement de dendrogramme de proximité a permis de délimiter deux grands groupes qui se différencient par la totalité des paramètres physico chimiques, le premier groupe ne comporte que la variété MB qui se caractérise par un indice d'ester, de saponification, densité à 20°C et une miscibilité à éthanol 70° très élevés. Le deuxième groupe renferme les variétés RL*, Germ et Mess et il se sépare à son tour en deux sous groupes : le premier renferme la variété Mess qui se distingue des autres variétés par certains indices tels que : l'indice d'acide, d'ester et de saponification. Les variétés RL* Germ constituent un deuxième sous groupe. Ces deux variétés se sont groupées ensemble car elles présentent une importante similarité et une faible diversité concernant tous les paramètres physico-chimiques étudiés.

Tableau 50: Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon en fonction du rendement en HE.

Observation	Carré de la distance Euclidienne			
	RL*	Germ	Mess	MB
RL*	0,000	0,743	245,336	1551,963
Germ	0,743	0,000	241,090	1545,846
Mess	245,336	241,090	0,000	606,226
MB	1551,963	1545,846	606,226	0,000

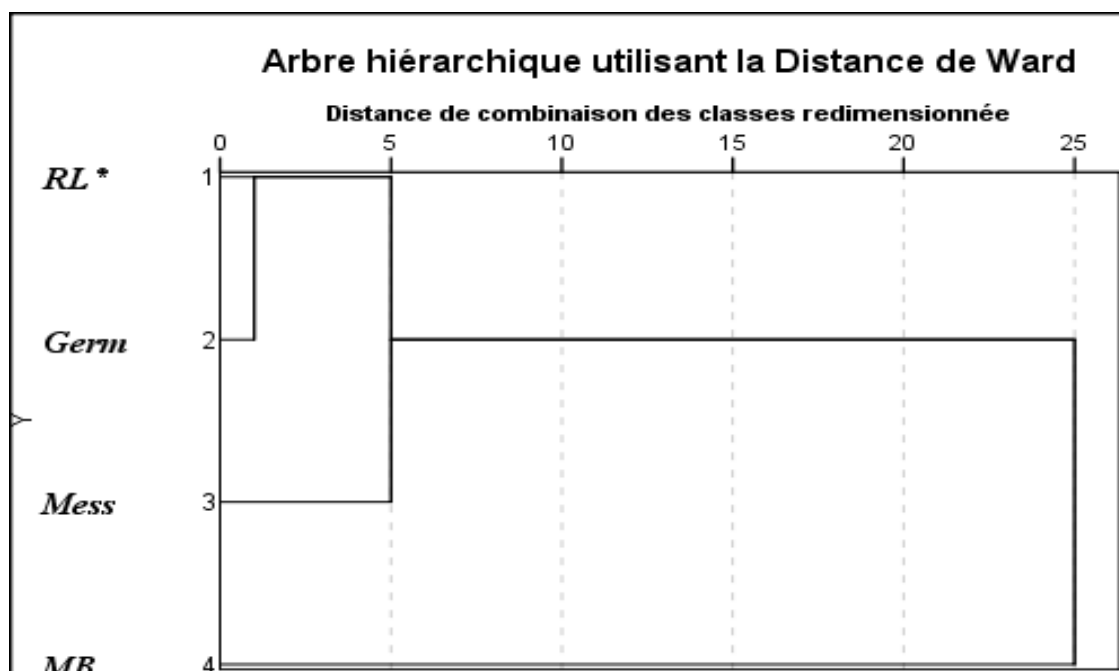


Figure 43 : Dendrogramme de disimilarité génétique entre les géotypes d'ail, basé sur les paramètres physico-chimiques.

✚ *Allium cepa*

Pour les variétés de l'oignon la matrice de proximité (tableau 51), montre que les variétés JE et RL sont trop éloignées à la variété RA avec respectivement des coefficients de dissimilarité de 1078,298 et 2589,931. Cependant la variété RL se sépare de la variété JE par un coefficient de dissimilarité de 332,659. Deux groupes uniquement sont observés en fonction des paramètres physico-chimiques (figure 44) Le premier groupe rassemble les géotypes RL et JE. Ces géotypes sont caractérisés par des valeurs moyennes de l'indice d'ester et de saponification sont très élevées que celles de la variété RA du deuxième groupe.

Tableau 51: Matrice de dissimilarité des variétés d'oignon selon les paramètres physico- chimiques.

Observation	Carré de la distance Euclidienne		
	JE	RA	RL
JE	0,000	1078,298	332,659
RA	1078,298	0,000	2589,931
RL	332,659	2589,931	0,000

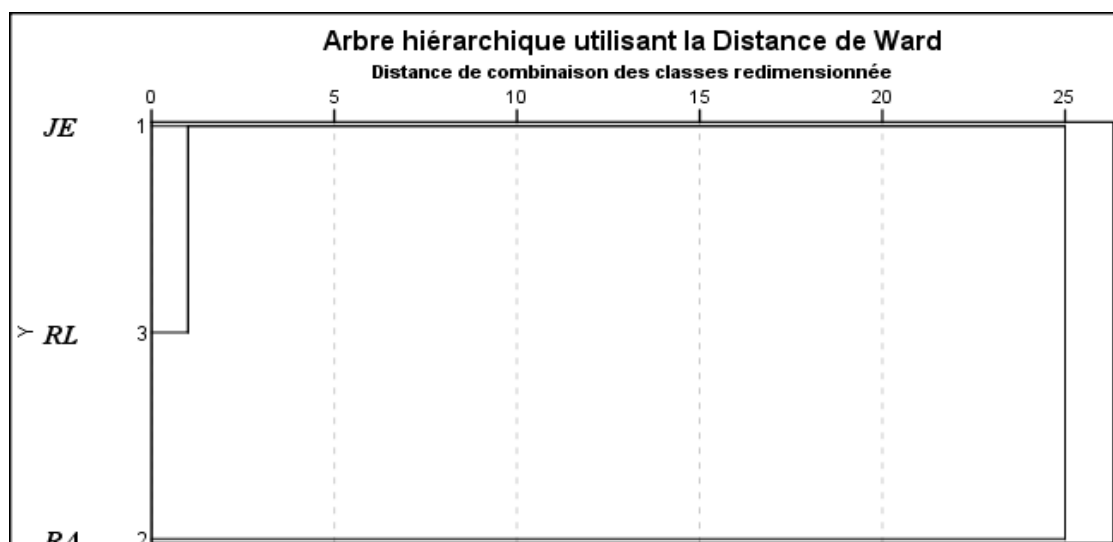


Figure 44: Dendrogramme de disimilarité génétique entre les géotypes d'oignon, basé sur les paramètres physico-chimiques.

II.3.4.5. Classification en fonction de la composition chimique des HEs

✚ *Allium sativum*

L'analyse des résultats de la composition chimique des huiles essentielles obtenues a permis de réaliser la matrice de proximité génétique entre les variétés de l'ail (tableau 52). D'après cette matrice, il ressort que la variété RL* se sépare des variétés Germ, MB et Mess par des coefficients de dissimilarité qui sont respectivement de 11,428, 10,062 et 9,486, tandis que ces deux dernières variétés se trouvent trop éloignées de la variété Germ par des coefficients de 10,38 et 13,41 respectivement, mais elles sont très proches les une avec l'autre (coefficients de dissimilarités de 5,506). Le dendrogramme illustré dans la (figure 45) montre que les différents géotypes se séparent en deux grands groupes, le premier groupe est formé par la variété Germ et le deuxième groupe rassemble les variétés RL*, MB et Mess. Ce deuxième groupe comporte, à son tour, deux sous-groupes : MB et Mess, d'une part et RL*, qui forme un deuxième sous-groupe d'autre part. Probablement le regroupement de ces variétés dans deux grands groupes vient du fait qu'elles se différencient au niveau de leurs constituants majoritaires, leurs concentrations, leurs composés soufrés ou encore par leurs richesses en atomes de soufre, où, par exemple, dans le deuxième groupe la variété RL* du deuxième sous-groupe domine le Trisulfide, di-2-propionyl avec 43,13%, comme elle renferme environ 26 atomes soufrés, par contre pour les variétés du premier sous-groupe Mess et MB le diallyldisulfide prédomine avec respectivement (34,5%) et (33,75%), il est en de même pour la variété du premier groupe Germ avec (27,3%), alors que la Mess et la MB en

contiennent, seule, la (Methylthio)-acetonitrile , cela peut expliquer leur regroupement dans un même sous groupe.

Tableau 52: matrice de proximité des variétés d’ail en fonction de la composition chimique des HEs.

Observation	Carré de la distance Euclidienne			
	RL*	Germ	Mess	MB
RL*	0,000	11,428	9,486	10,062
Germ	11,428	,000	13,141	10,380
Mess	9,486	13,141	0,000	5,506
MB	10,062	10,380	5,506	0,000

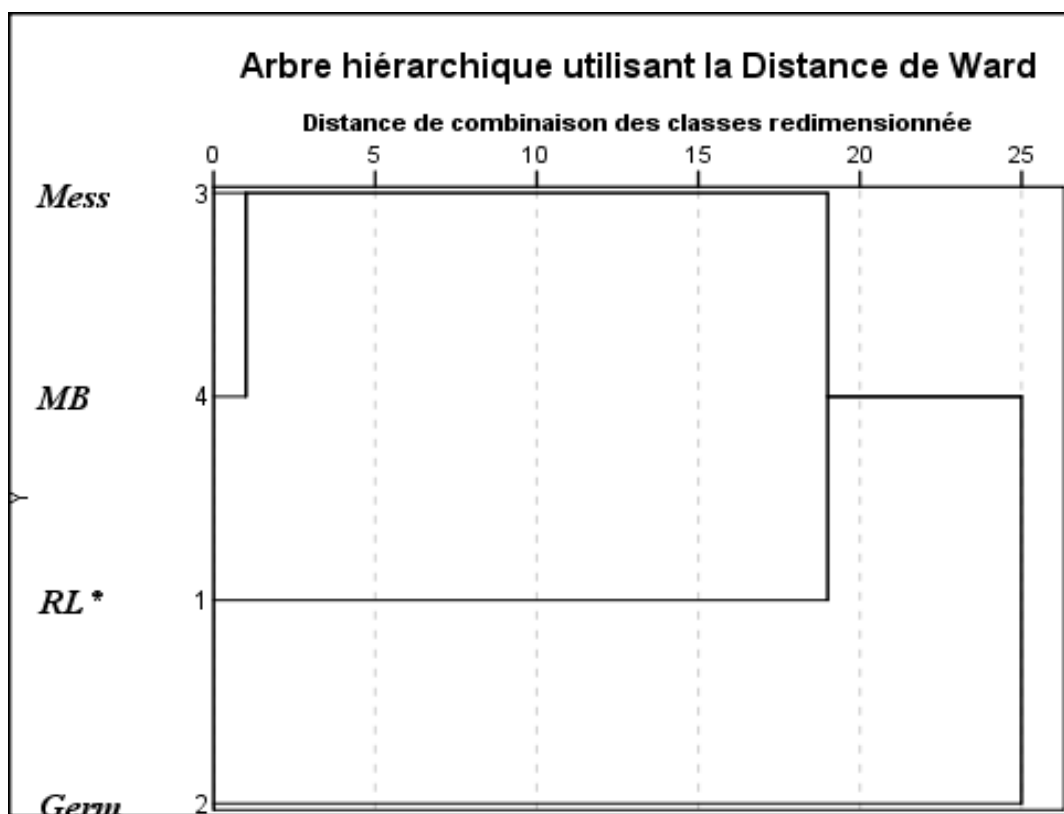


Figure 45 :Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d’ail, Classification en fonction de la composition chimique de leurs HEs.

II.3.4.6. Classification en fonction de tous les paramètres biochimiques étudiés

Les matrices engendrées pour les différents paramètres analysés par le logiciel SPSS basée sur la méthode d’agrégation de ward, a permis d’établir les relations génétiques entre les différentes variétés des deux espèces étudiées.

✚ *Allium sativum*

D'après la matrice de proximité engendrée pour toutes les caractéristiques biochimiques étudiées (tableau 53), il ressort que Les coefficients de dissimilarité observés varient de 0.000 à 6.541, les coefficients les plus élevés sont observés au sein des variétés qui présentent la différence maximale au niveau de leurs paramètres physico-chimiques, organoleptiques et leurs résultats du screening phytochimique. A titre d'exemple les couples de cultivars : (MB, RL*) et (Mess, RL*) présentent des coefficients de dissimilarité de 6.541 et 6.190 respectivement. des faibles coefficients sont aussi observés, par contre les couples de cultivars (Germ,MB),(Germ, Mess),(Mess,MB) (RL*,Germ) présentent de faibles coefficients qui sont respectivement de 4.42, 3.093 et 3.464 .Cela explique leurs regroupement dans le dendrogramme illustré dans la figure 46 qui a permis de délimiter deux grands groupes, le premier groupe ne comporte que la variété RL*, qui se partage avec la variété Germ la plupart des paramètres : physico chimiques, du rendement en HEs ainsi que les constituants chimiques de leurs huiles essentielles. Le deuxième groupe renferme les variétés MB, Mess et Germ et il se sépare à son tour en deux sous groupes : le premier renferme la variété MB qui se distingue des autres variétés par les paramètres organoleptiques et par la composition chimique de leurs HEs. Les variétés Mess et Germ constituent un deuxième sous groupe. Ces deux variétés se sont groupés ensemble car elles présentent une importante similarité surtout au niveau de leurs paramètres organoleptiques (100 % similaire) ainsi que leurs résultats de screening phytochimiques .

Tableau 53: Matrice de proximité des variétés d'ail en fonction de tous les Paramètres biochimiques

Observation	Carré de la distance Euclidienne			
	RL*	Germ	Mess	MB
RL*	0,000	3,293	6,190	6,541
Germ	3,293	0,000	3,093	4,442
Mess	6,190	3,093	0,000	3,641
MB	6,541	4,442	3,641	0,000

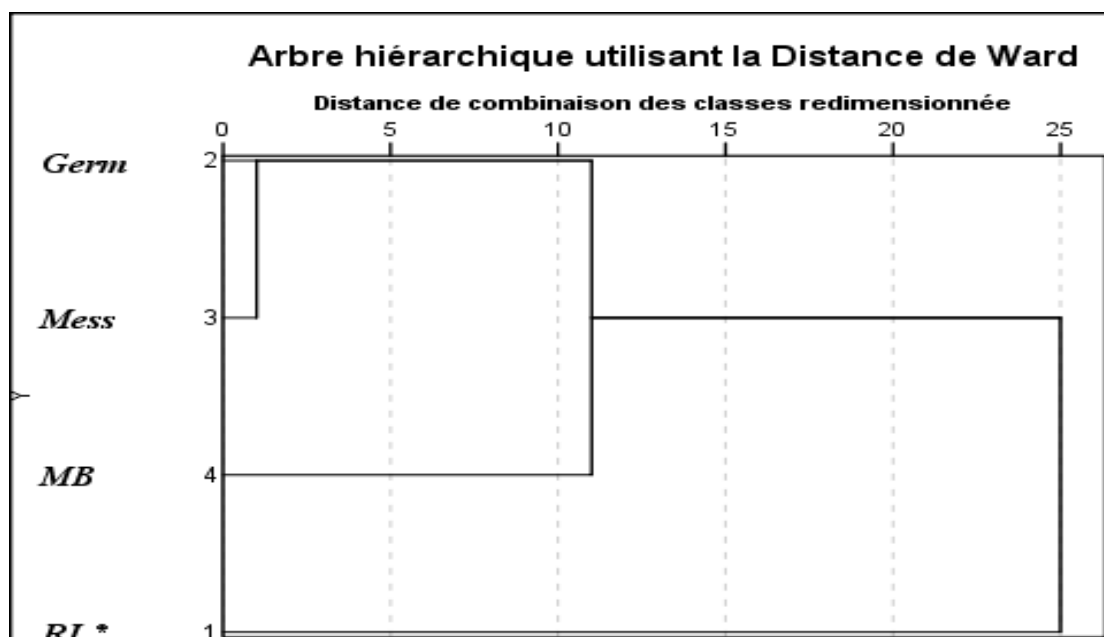


Figure 46 :Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'ail, Classification en fonction de tous les paramètres étudiés.

II.3.4.7. Classification en fonction de tous les paramètres sauf la composition chimique des HEs

✚ *Allium cepa*

Pour les variétés de l'oignon la matrice de proximité (tableau 54), montre que le coefficient de dissimilarité le plus élevé est observé au sein de couple de variétés (RA, RL) qui présentent la différence maximale au niveau de leurs paramètres physico-chimiques et organoleptique. Les couples de variétés (JE, RL) et (JE, RA) présentent des coefficients de dissimilarité sont respectivement de 5,61 8 et 5,669. Deux groupes sont observés en fonction des paramètres : physico-chimiques, organoleptiques rendement en huile et screening phytochimique (figure 47). Le premier groupe rassemble les génotypes RL et JE . Ces deux variétés sont regroupées surtout par les paramètres qui sont les paramètres physico-chimiques, organoleptiques et screening phytochimique. Le deuxième groupe comporte la variété RA qui se caractérise par une différence importante au niveau de ces mêmes paramètres.

Tableau 54 :matrice de proximité des variétés d'oignon en fonction de tous les paramètres étudiés sauf la composition chimique

Observation	Carré de la distance Euclidienne		
	JE	RA	RL
JE	0,000	5,669	5,618
RA	5,669	0,000	6,500
RL	5,618	6,500	0,000

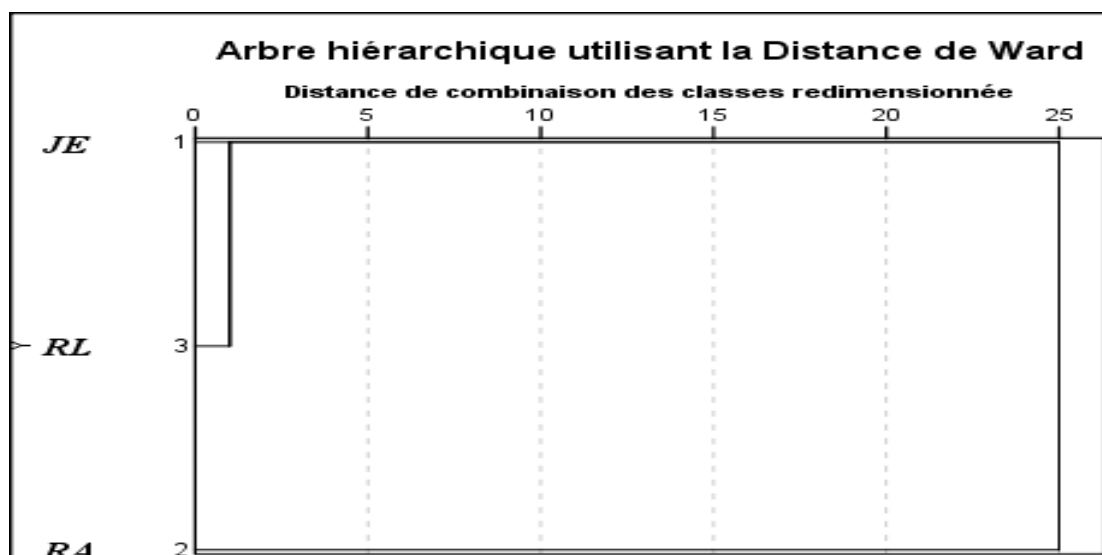


Figure 47:Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon, Classification en fonction de tous les paramètres sauf la composition chimique.

Discussion

Les coefficients de dissimilarité observés sur base des données du screening phytochimique des deux espèces ont révélé une légère variabilité entre les variétés de chacune d'elles ce qui peut s'expliquer par la répartition inégale des glucosides où dans *Allium sativum* ils n'existent que chez la RL*alors que pour *Allium cepa* JE se distingue des deux autres variétés par une présence faible de tanins et de flavonoïdes.

La teneur en huile essentielle, par rapport à la matière fraîche, varie en fonction de la variété, ce qui explique la richesse, des sept variétés des deux plantes, par des taux variables. Le rendement, cependant, le plus élevé est obtenu pour les deux variétés Rouge locale de chaque espèce, alors que le plus faible est observé chez les deux variétés Mess et MB pour l'espèce *Allium sativum* et chez JE et RA pour l'espèce *Allium cepa*. Il faut signaler que les résultats trouvés sont très élevés par comparaison avec ceux obtenus par d'autres recherches,

ainsi, Block, (1992) et Burdock, (1995) par distillation sous vides des Bulbes d'oignons ont trouvé un rendement allant de 0,005 à 0,02% d'huile essentielle Jaune. Cependant, Amagase et al., (2001), ont mentionné que l'ail contient approximativement entre 0,1 à 0,3% d'huile volatile mais peut aller jusqu'à 0,2-0,5%. Alors que Haciseferogullari et al., (2005) ont trouvé un rendement de 0,14%, mais Fabrice, (2009) a obtenu un faible rendement d'essences par distillation de Bulbes d'oignon soit 0,04%. Par contre les résultats obtenus par Emad. A shalaby et al., (2011) sont de l'ordre de (0,073%±0,1) pour *Allium sativum* et de (0,59%±0,0) pour *Allium Cépa*.

Cette variation entre les variétés de chaque espèce, peut-être expliquée d'une part par le comportement génétique de la plante ou encore due au protocole d'extraction suivi au cours de ce travail.

Les paramètres organoleptiques des huiles essentielles extraites sont largement influencés par le facteur variétal. C'est ainsi que, les variétés RL* et MB se distinguent de l'ail Mess et Germ par une couleur très claire. Du même pour la variété RA qui diffère des variétés d'oignon RL et JE par une couleur claire.

Les résultats physico-chimiques des HE en général concordent avec les normes fixées par AFNOR. Selon Demarine, (1985) ; Gilly, (1997) et Lis-Balchin, (2002), ces paramètres physicochimique sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les pratiques culturales pour les constantes chimiques. La densité est, cependant, parmi les caractéristiques généralement utilisées pour la classification des huiles essentielles, mais elle ne peut pas être utilisée seule pour l'identification des huiles. Dans notre étude et d'après les dendrogrammes de proximité l'huile essentielle de la variété MB se caractérise par : un indice d'ester, de saponification et une miscibilité à éthanol plus élevés que les trois autres variétés de l'ail : Mess, RL* et Germ, alors que la Mess se distingue des trois variétés de l'ail par un indice d'acide très élevé. Il en est de même pour la variété d'oignon RA des deux autres variétés d'oignon RL et JE où, les valeurs d'indice d'ester et de saponification sont moins élevés.

L'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acide libre. Les résultats obtenus de cet indice sont certes dans les normes mais demeurent relativement élevés, cela peut donner une explication dans la dégradation de l'huile (hydrolyse des esters durant sa conservation) inversement à un indice d'acide inférieur à 2 qui indique une bonne conservation de l'HE (faible quantité d'acide libre) (Kanko C, 2004).

L'indice de réfraction dépend de la composition chimique, il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Pour certains auteurs le faible indice de réfraction de l'huile essentielle indique sa faible réfraction à la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques. L'indice de réfraction obtenu et les valeurs de la miscibilité à l'éthanol (70%) sont conformes aux normes françaises (A FNOR 2000).

De nombreux facteurs influent le rendement, la teneur, les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimiques des huiles essentielles, en particulier l'espèce, les conditions environnementales, l'organe utilisé, le séchage, la technique d'extraction, la période et le milieu de récolte, les pratiques culturales et l'âge du matériel végétal (Aberchane et al, 2001 et Bourkhiss et al, 2011).

Pour l'espèce *Allium cepa* l'identification par GC / MS a révélé cinq composés soufrés dans l'huile essentielle à savoir le 3,4 Dimethylthiophene, le disulfure, méthylpropyl, le diméthyltrisulfide, disulfuredipropyle et 1,2,4-Trithiolane, 3,5-diethyl- (2.218%). Toutefois, les variétés Rouge d'Ampostet Rouge locale partagent tous deux le disulfure, méthylpropyl, composé soufré, comme constituant majoritaire avec respectivement des pourcentages de (3,01%) et (2,89%). La composition chimique de l'HE de *Allium cepa* rapportée par Dima M et al, (2014) révèle la présence de quatre composés majoritaires qui sont le dipropyldisulfide (30.92%), le dipropyltrisulfide (17.10%), le 1-propenyl propyldisulfide (7.26%) et le méthylpropyltrisulfide (5.20%). Au par avant, Corzomartinez et al., (2007) avaient mentionné que le dipropyldisulfide est le constituant majeur, alors que le profil trouvé par Shalaby et al., (2011) est également différent avec certains composés soufrés qui n'ont pas été détectés dans nos deux variétés. La même source signale que le diisopropyltrisulfide reste le composé prédominant avec (20.69%), sans oublier d'autres constituants soufrés dont les taux sont relativement importants comparativement à ce que nous avons trouvé.

L'identification, par CPG, a révélé vingt composés soufrés des huiles essentielles d'*Allium sativum*. Il ressort, à cet effet, des résultats que ces produits sont répartis dans toutes les variétés. Cependant, le Diallyldisulfide, le Disulfure, méthyl 2-propenyl, le Diméthyltrisulfide, le Tetrasulfure, di-2-propenyl, le sulfure, Allyl méthyl, le Trisulfure, di-2-propenyl et (méthylthio-acetone), sont présents dans toutes les variétés. Par contre, le Tetrasulfure di-2-propenyl et le 1,2-dithiolane ne sont révélés que chez la Messedrome, la

Rouge locale et la Germidour mais la Messedrome et la Mocpta Bulguar en contiennent, seule, la (Methylthio)-acetonitrile. Enfin, le Sulfide Allylmethyl se trouve uniquement dans la variété Rouge locale et Germidour, sans oublier que chez cette dernière, il y a en plus l'Hexadecyloxy-carbonyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylimidazolium ion. Nos résultats concordent avec ceux publiés par O'gara E.A et al., (2000) sur les plantes de la même espèce originaire de l'Inde dont l'huile est riche en diallyldisulfide (53.00%) et le diallyltrisulfide (11.5%). Ces résultats ont une certaine corrélation avec les conclusions de Souad Khamis et al., (2004) en termes de constituants majeurs dans les huiles essentielles de l'ail. Cette composition a été prouvée par Pyun M-S et Shin (2006) avec une plante de Corée dont le profil est presque similaire à ce que nous avons trouvé dans nos variétés.

La composition chimique rapportée par les différentes études Bibliographiques, (Griffiths, L. Trieman, T. Crowther, B. et al., (2002), révèle la présence de résidu d'allyl, comme le principal composé de l'ail et l'absence de résidus de propyle (le résidu d'allyl) et au contraire, dans l'oignon il est totalement absent, alors que le résidu 1-propenyl est le constituant principal.

L'étude de tous les paramètres biochimiques d'*Allium sativum* montrent que la structuration de ces géotypes présente une corrélation entre le polymorphisme de l'ADN et ces paramètres biochimiques. Selon Pellecuer J. (1982) une espèce végétale botaniquement, parfaitement définie peut donner des essences dont la composition chimique est différente suivant les individus. Pour certains auteurs, les chémotypes constituent, à l'intérieur de l'espèce, des variétés chimiques possédant chacune un équipement enzymatique particulier, déterminé génétiquement et qui oriente la biosynthèse vers la formation préférentielle d'un constituant précis (Abdoul Dorso S, 2002). Selon les études menées par LEROY G. (2013), les teneurs des composés soufrés sont influencées par la variété et le lieu de culture, alors que pour le composé GSAC, γ -L-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cystéine l'impact variétal est élevé mais l'environnemental ainsi que l'interaction variété-environnement sont faibles. Tandis que l'impact de la variété est révélé faible pour l'aliine et l'isoaliine, qui sont des composés intéressants du point de vue des professionnels de la transformation puisqu'ils sont les principaux précurseurs de l'allicine, composant majoritaire de l'essence de l'ail et de l'oignon, le responsable de l'odeur piquante de ces deux plantes et de la coloration verte.

Il s'avère que l'ail violet est très riche en GSA et en aliine mais l'isoaliine à faible concentration par rapport à l'ail blanc et chinois, ce qui confirme, à cet effet, nos résultats sur les paramètres qualitatifs (couleur de caïeux).

Conclusion

Les résultats de l'extraction ont révélé une légère variation de la teneur et des paramètres organoleptiques de l'huile essentielle dans les deux espèces étudiées. Cependant, l'étude phytochimique et l'analyse chimique des huiles essentielles testées ont confirmé une variation considérable entre les variétés de chaque espèce, ce qui peut être expliqué par le comportement génétique de la plante du fait que le protocole d'extraction et les conditions environnementales de travail sont les mêmes.

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide, la miscibilité...) est une étape nécessaire pour identifier et obtenir des données sur la composition et le degré de pureté des huiles essentielles. Cette étude reste, malheureusement, insuffisante pour la caractérisation des huiles essentielles.

La classification hiérarchique réalisée sur la base des données de la caractérisation biochimique confirme cette variation entre et à l'intérieur des variétés d'ail, comme elle a permis de les grouper en deux groupes distincts, les variétés formant le deuxième groupe se partagent quelques paramètres biochimiques tels que les paramètres organoleptiques et les résultats de screening phytochimiques.

Pour l'espèce *Allium cepa* la classification hiérarchique sur la base des données de tous les paramètres biochimiques, sauf la composition chimique des HEs a permis de délimiter deux groupes distincts, les variétés du premier groupe sont regroupées surtout par les paramètres qui sont les paramètres physico-chimiques, organoleptiques et résultats de screening phytochimique.

❖ **Compatibilité des données biochimiques avec les données moléculaires et morphologiques**

Pour l'espèce *Allium sativum*, les deux groupes résultants de dendrogramme de proximité sur base de tous les paramètres biochimiques présentent une similarité importante avec les groupes résultants des dendrogrammes de similarité de l'SSR, contrairement aux groupes générés par les axes 1 et 2 de l'ACP

Par ailleurs, pour l'espèce *Allium cepa* il s'avère qu'il n'y a aucune concordance entre les dendrogrammes obtenus suite à la caractérisation biochimique et les deux études : morphologique et moléculaire par l'SSR.

II.4. Résultats de l'activité antibactérienne

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

II.4.1. Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques

Les résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disque de quatre souches testés sont représentés dans le tableau 55 et la figure 48.

Tableau 55 : Diamètres des zones d'inhibition des deux antibiotiques testés.

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

D'après les résultats obtenus (tableau 55) et la (figure 48) nous soulignons une variabilité dans la réponse des souches étudiées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *klebsiella Pneumoniae*) vis-à-vis des deux antibiotiques testés.

La bactérie *E. coli* est extrêmement sensible à Gentamicine (CN10) avec un diamètre de zone d'inhibition de 24mm, alors qu'elle est sensible à la Cotrimoxazol (SXT25) avec un diamètre de 16 mm.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram (-), elle est extrêmement sensible à l'antibiotique Gentamicine (diamètre de zone d'inhibition de 21mm), alors qu'elle a montré une sensibilité vis-à-vis de SXT25 (diamètre de zone d'inhibition de 11 mm).

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram (+), elle est extrêmement sensible aux deux antibiotiques : SXT25(diamètre de zone d'inhibition de 31 mm) et CN10 avec un diamètre de zone d'inhibition de 25 mm.

Klebsiella pneumoniae est extrêmement sensible vis-à-vis de CN10 avec un diamètre de zone d'inhibition de 22 mm, alors qu'elle a montré une sensibilité à l'antibiotique SXT25 (diamètre de zone d'inhibition de 13 mm).

La sensibilité de souche *S. aureus* aux deux antibiotiques testés a montré un meilleur résultat par rapport aux autres bactéries étudiées avec un diamètre de zone d'inhibition de 31mm pour SXT25 , et 25mm pour CN10 .suivi par *E. coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 24mm pour CN10 , et 16mm pour SXT25,et *K.pneumoniae* avec un diamètre de zone d'inhibition de 22mm pour CN10 , et 13mm pour SXT25 ,et enfin *P-aeruginosa* avec un diamètre de zone d'inhibition de 21mm pour CN10 , et 11mm pour SXT25 (Figure 48)

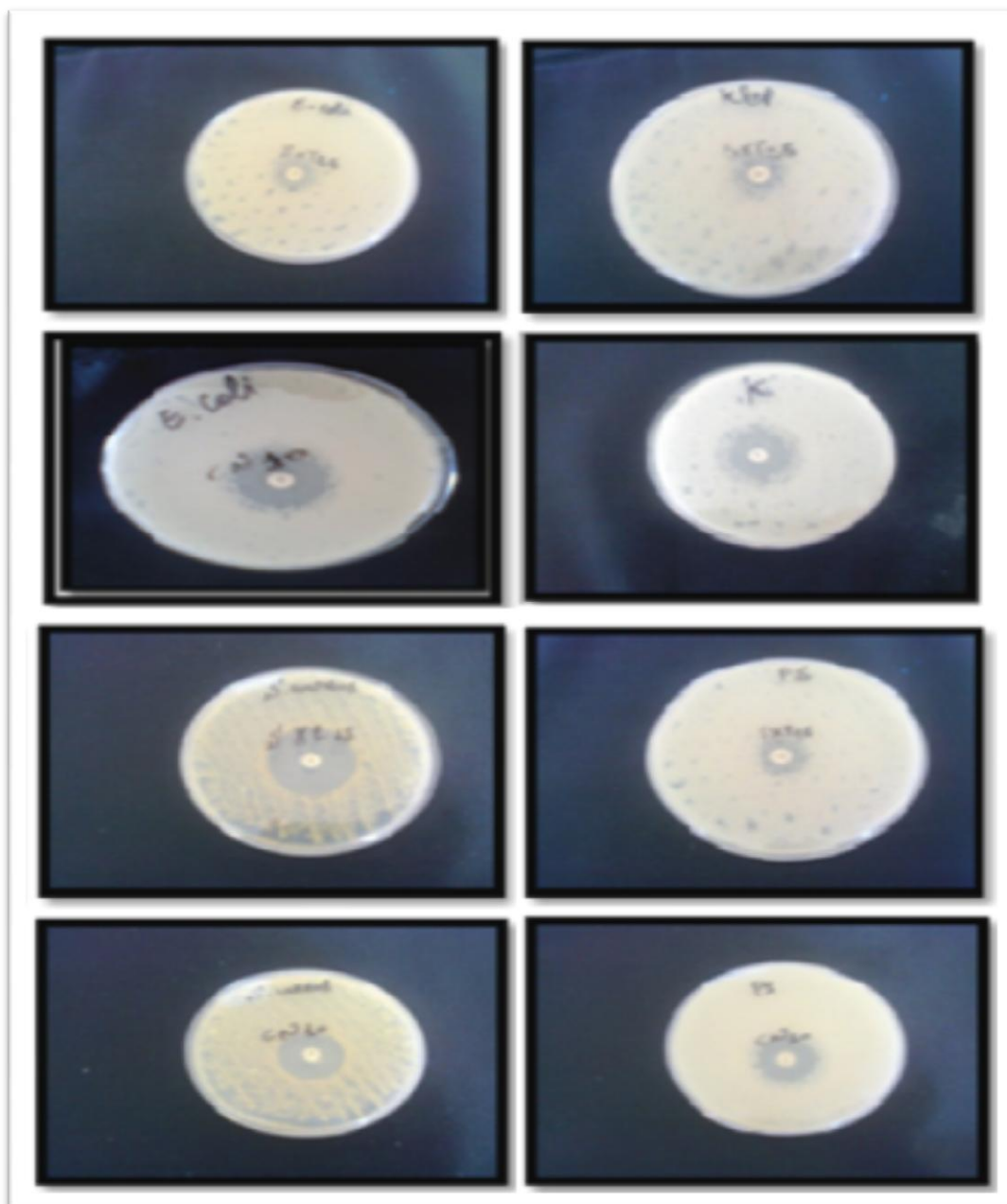


Figure 48: Effet des antibiotiques sur les bactéries testées.

II.4.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut des HEs des variétés de l'ail et de l'oignon :

Allium sativum

Les diamètres des zones d'inhibition des souches étudiées sous l'action de l'extrait brut de l'huile essentielle de l'ail sont représentés dans le tableau 56.

Tableau 56 : Diamètres de zones d'inhibitions en (mm) de l'extrait brut des HEs des variétés d'ail.

variétés bactéries	RL*	Mess	MB	Germ
E. coli	10,67	7,03	9,1	8,07
K .Pneumoniae	8.033	-	8,033	10,2
S. aureus	7,0	-	7,0	8,1
P. aeruginosa	9,17	-	7,67	-

(-): Absence de zoned'inhibition

- **Effet de l'extrait brut des HEs de la variété RL* sur les souches testées :**

Les résultats obtenus indiquent que l'huile brute de l'ail RL* a un effet inhibiteur vis-à-vis toutes les souches testées, avec des zones d'inhibition allant de 07.0 mm à 10.67 mm sont observées. Le meilleur résultat obtenu est celui observé contre la bactérie *E. coli* avec un diamètre de 10.67 mm, suivi par *P. aeruginosa*, puis *K .Pneumoniae* et en fin l'effet vis-à-vis de *S. aureus* avec des diamètres de zones d'inhibition sont respectivement de : 9.17 mm, 8.03 mm et 7 mm.

- **Effet de l'huile brute de la variété Mess sur les souches testées :**

L'activité antibactérienne de L'huile brute de la variété Mess est avérée qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis des *K .Pneumoniae*, *S. aureus* et *P.aeruginosa* .Cependant la souche *E. Coli* donne une légère zone d'inhibition autour de disque estimée par un diamètre de zone d'inhibition de 7.03 mm.

- **Effet de l'huile brute de la variété MB sur les souches testées :**

L'huile brute de la variété MB montre une activité antibactérienne avec toutes les souches testées, il s'est avérée active contre *E. Coli* et *K .Pneumoniae* avec des zones d'inhibition de 9.1 mm et 8.03 mm, respectivement. En revanche *S.aureus* et *P. aeruginosa* une légère zone d'inhibition a été observée autour des disques (7 mmet 7.67mm) respectivement.

- **Effet de l'huile brute de la variété Germ sur les souches testées :**

L'huile brute de la variété Germ présente une activité antibactérienne contre les souches *E.coli*, *k.Pneumoniae*, *S. aureus*. Avec des diamètres de zones d'inhibitions

sont respectivement de 8.07 mm, 10.02 mm, 8.1 mm. Pour la souche *P. Aeruginosa* aucune zone d'inhibition n'a été enregistrée autour de disque.

✚ *Allium cepa*:

Les observations effectuées sur l'effet des HEs d'oignon sur la croissance des souches bactériennes testées : *k.pneumoniae*, *E. coli*, *p.aeruginosa*, *s.aureus*, sont représentées dans la figure 49 et le tableau 57.

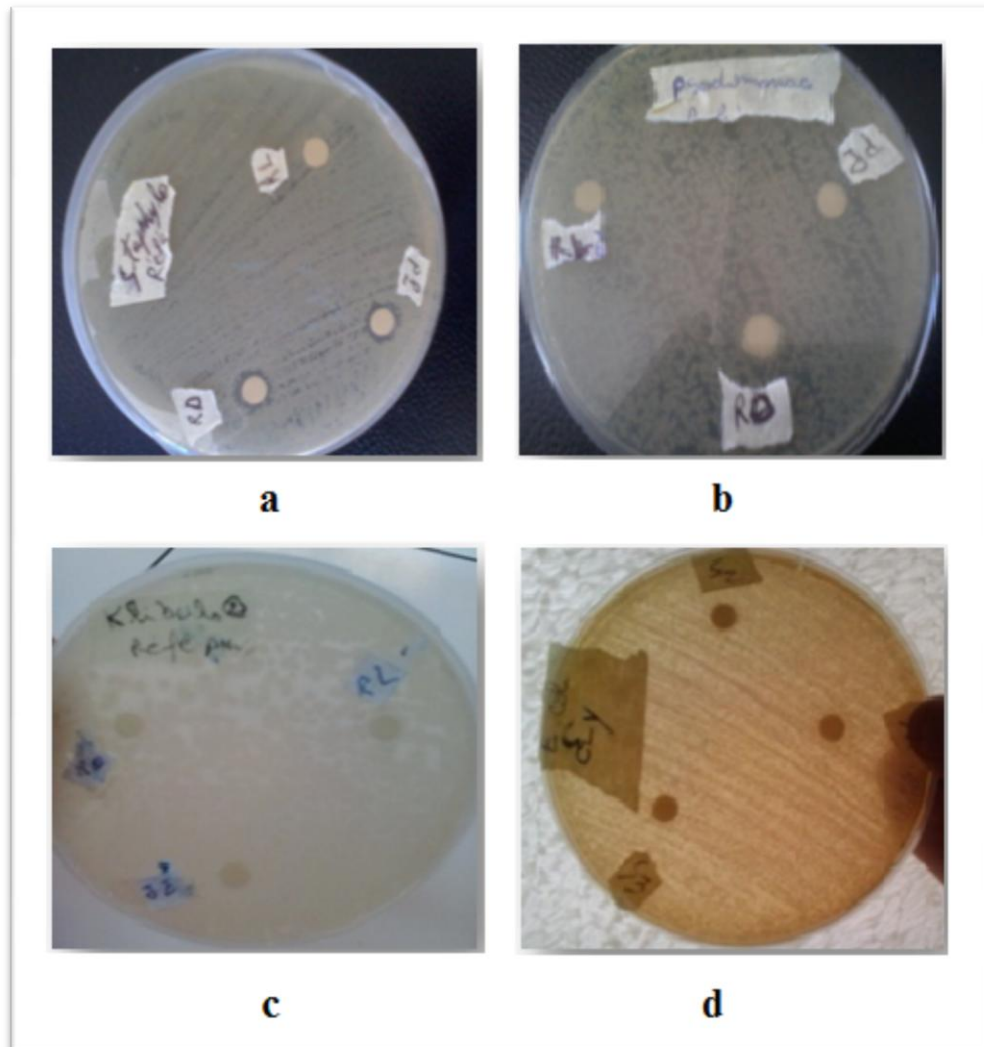


Figure 49 : zones d'inhibition des huiles essentielles des trois variétés d'oignon vis-à-vis les souches testées.

a : *s.aureus*. b : *p.aeruginosa*. c : *k.pneumoniae*. d : *E. coli*.

Tableau 57 : Diamètres (mm) de zones d'inhibition des H.Es des variétés d'oignon

Variétés	RL	JE	RA
Bactéries			
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>K. Pneumoniae</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	8.1	9.13
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-

(-): Absence de zoned'inhibition

La sensibilité des bactéries aux HEs est déterminée selon le diamètre de la zone d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose, pour les HEs des variétés d'oignon aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de : *k. pneumoniae*, *E. coli*, *p. aeruginosa*. Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des HEs d'oignon. La souche *s. aureus* a manifesté une faible sensibilité aux HEs de deux variétés JE et RA avec respectivement des diamètres de 8.1 mm et 9.13 mm, mais aucune sensibilité à l'huile essentielle de la variété RL n'a été enregistré.

II.4.3. Résultats de l'activité antibactérienne des HEs diluées des variétés de l'ail et de l'oignon :

Allium sativum

- **Effet de différentes dilutions de l'HE de la variété RL* sur les souches testées**

Les résultats de différents dilutions de l'HE de la variété RL* montrent que les quatre bactéries manifestent une croissance bactérienne dans toutes les dilutions préparées (tableau 58) et (figure 50), ce qui indique que les huiles diluées de cette variété n'exercent aucun effet antibactérien à l'encontre de ces bactéries.

Tableau 58: Valeurs des CMI de l'huile diluée de RL*

Bactéries	500	250	125
<i>E. coli</i>	+	+	+
<i>K. Pneumoniae</i>	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+

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

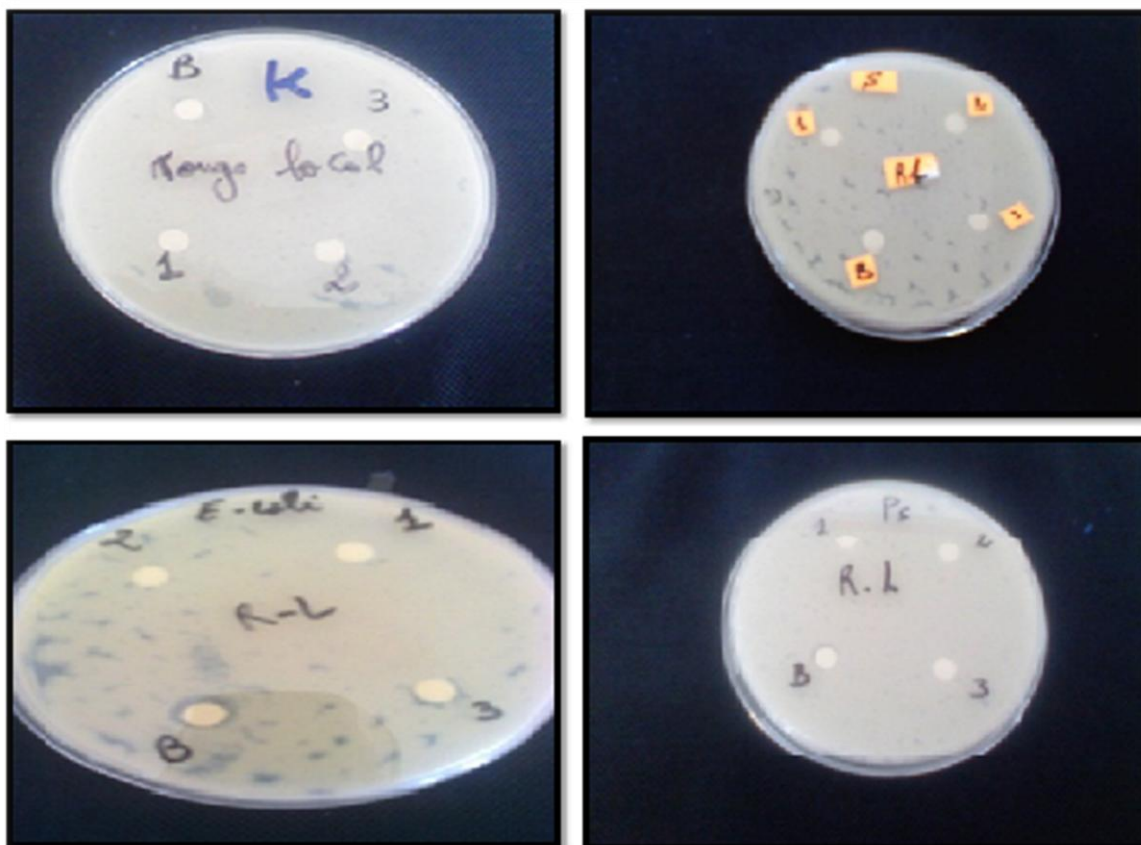


Figure 50 : Effet de l'huile de Rouge Locale sur les bactéries testées.

- **Effet de différentes dilutions de l'HE de la variété Mess sur les souches testées :**

La présence de la croissance de la bactérie *E. Coli* dans la dilution 50% (tableau 59) indique que l'HE de la variété Mess diluée à cette concentration n'a aucun effet antibactérien sur cette bactérie, zone d'inhibition égale presque à celle enregistrée pour l'huile brute de cette variété. Alors que l'absence de la croissance de cette bactérie dans les dilutions 25% (CMI $250\mu\text{l}/\mu\text{l}$) et 12,5% (CMI $125\mu\text{l}/\mu\text{l}$) montre que l'huile de Mess a présenté un effet inhibiteur contre cette bactérie, plus important, que celui obtenu pour la dilution 50% et par l'huile brute de cette variété. Pour les autres bactéries (tableau 59) (figure 51) on note une importante croissance dans les trois dilutions préparées. Cela indique que ces dilutions n'exercent aucun effet inhibiteur contre ces bactéries. D'après ces résultats nous constatons que l'huile brute de la variété Mess a une activité antibactérienne plus faible que celle de leurs huiles diluées.

Tableau 59 : Valeurs des CMI de l'huile diluée de Mess.

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

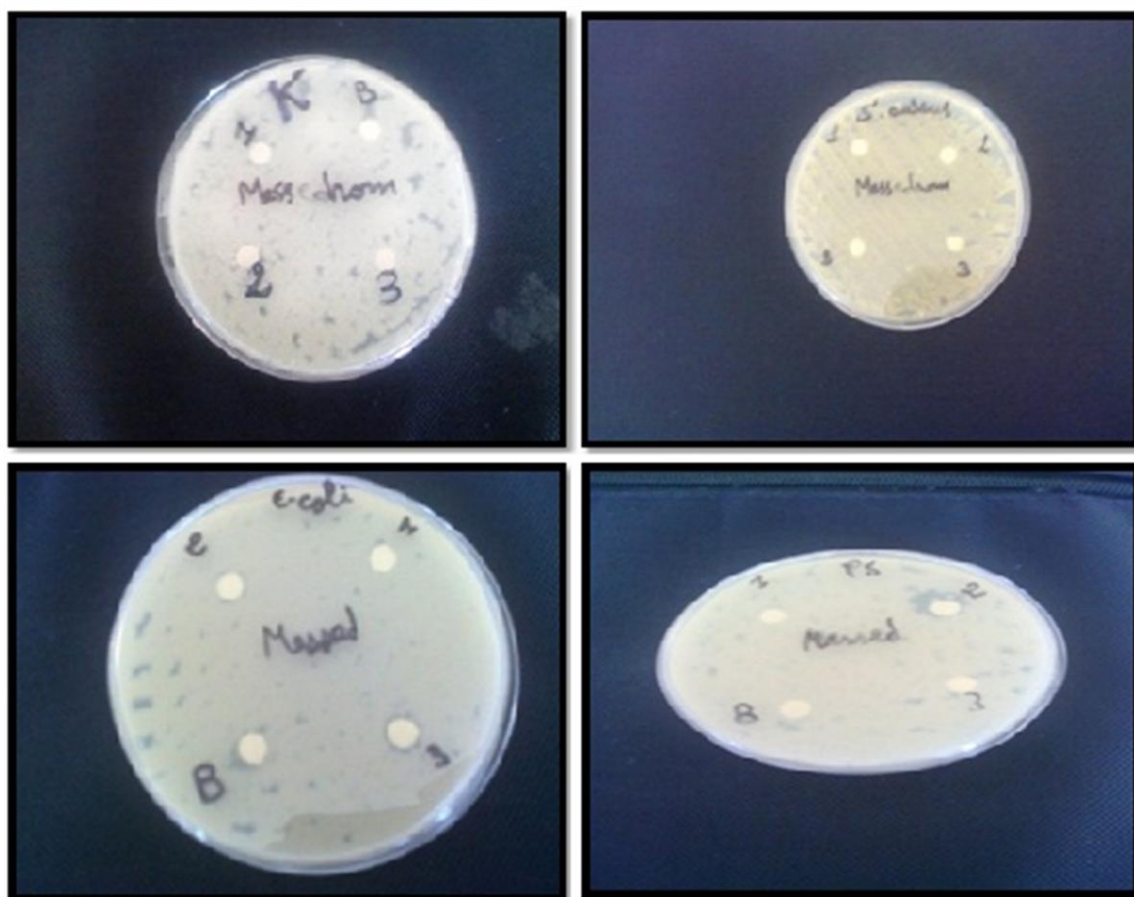


Figure 51: Effet de l'huile de la variété Messur sur les bactéries étudiées.

- Effet de différentes dilutions de l'HE de la variété MB sur les souches testées :

D'après les résultats des dilutions de l'huile de MB (tableau 60) nous remarquons la croissance des bactéries *K. Pneumoniae*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* dans les dilutions 50% et 25% (CMI : $500\mu\text{l}/\mu\text{l}$, $250\mu\text{l}/\mu\text{l}$ respectivement) ce qui nous a permis de conclure que ces concentrations en huiles sont insuffisantes pour inhiber ces souches bactériennes. Cependant la dilution 12,5%, s'est montrée suffisante pour inhiber la croissance de ces bactéries. Concernant l'*E. Coli*, est s'avérée sensible avec toutes les dilutions (figure 52).

D'après les résultats obtenus nous soulignons que l'huile diluée de la variété MB présente un effet sur les bactéries étudiées presque égal à celui donné par l'huile brute.

Tableau 60 : valeurs de CMI de l'HE diluée de MB.

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

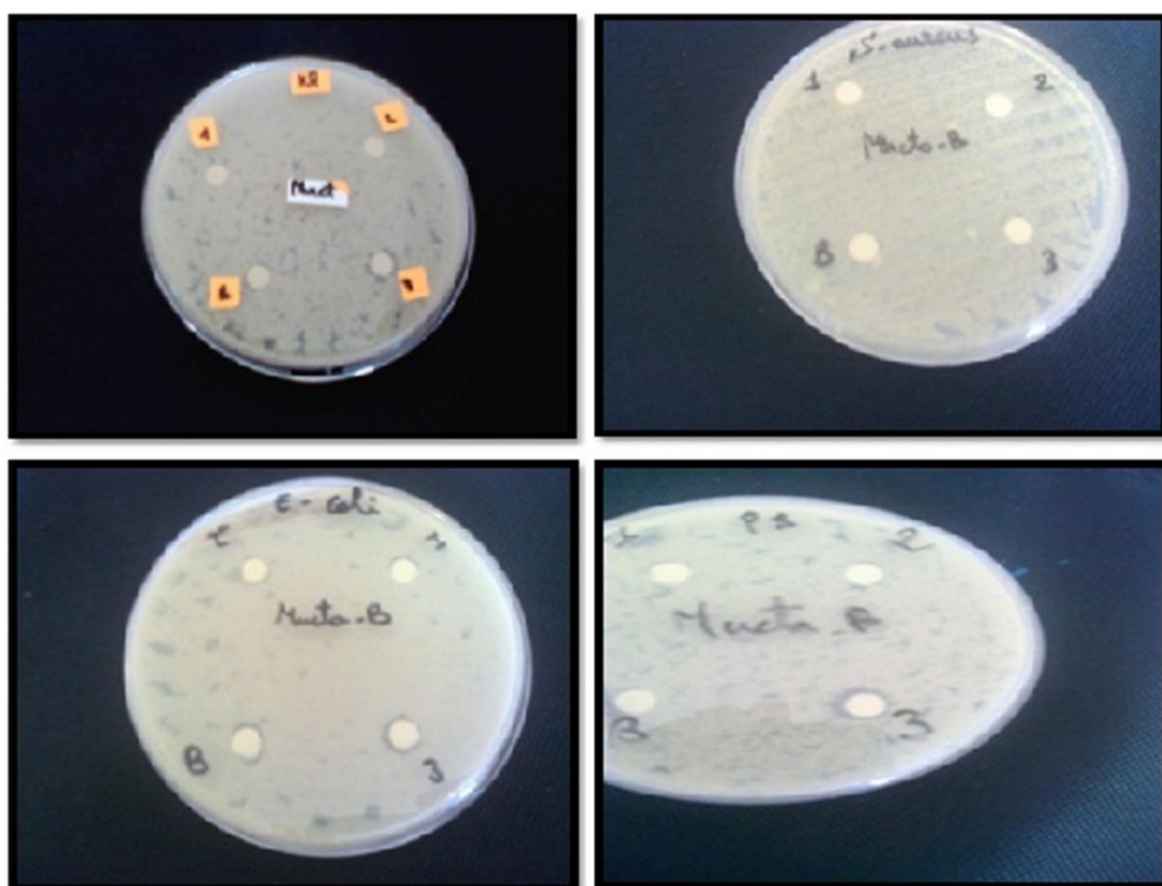


Figure 52: effet de l'huile diluée de MB sur les bactéries testées

- **Effet de différentes dilutions de l'HE de la variété Germ sur les souches testées :**

Nous remarquons la croissance des trois bactéries *K. Pneumoniae*, *S.aureus* et *P. aeruginosa* dans toutes les dilutions (tableau 61) ce qui signifie que l'huile essentielle de Germ ne Possède aucune action sur ces bactéries, alors que les dilutions 50% et 12,5% se révèlent active qu'avec l'*E. Coli*, la dilution 25% ne révèle aucun effet sur cette bactérie

(Figure 53).d'après ces résultats nous pourrons conclure que l'extrait brut de l'HE de la variété *Germ* agisse mieux sur les bactéries que l'huile diluée de cette variété.

Tableau 61 : valeurs des CMI de l'huile diluée de *Germ*.

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

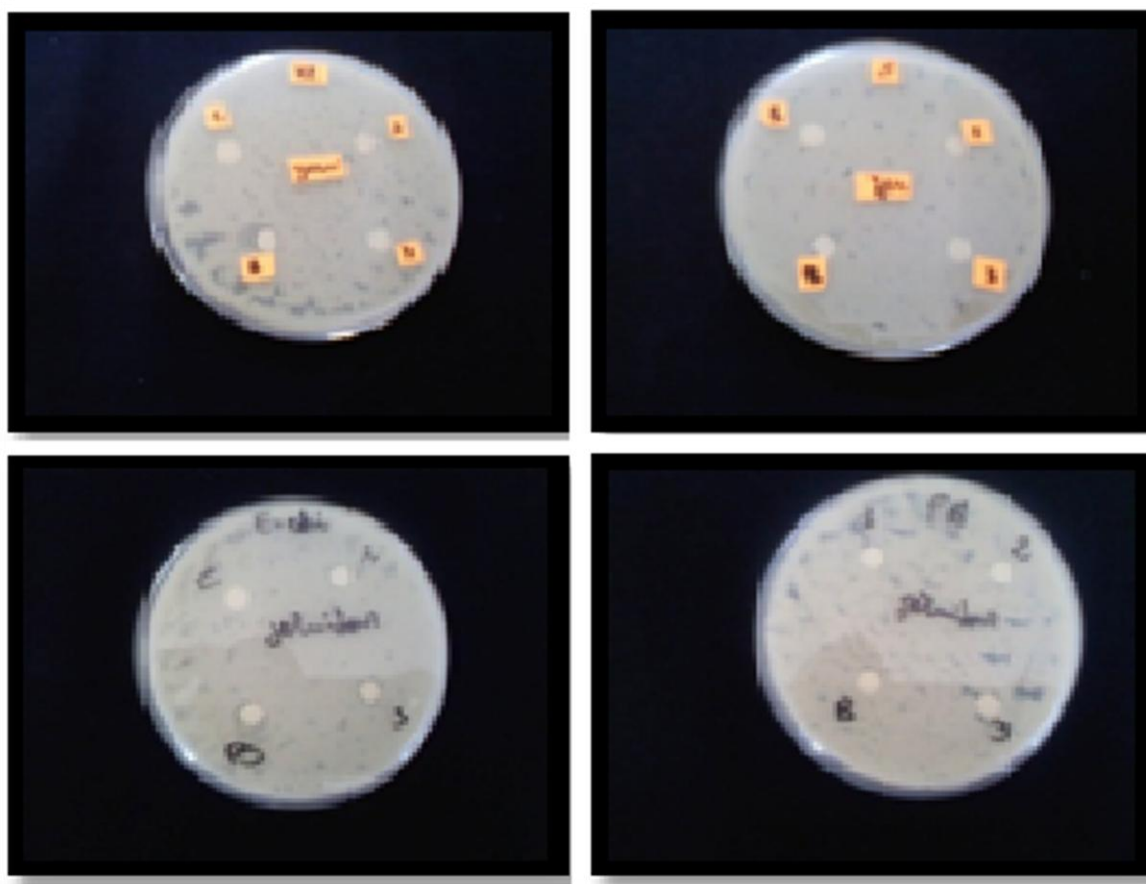


Figure 53 : Effet de l'huile déluée de *Germ* sur les bactéries testées.

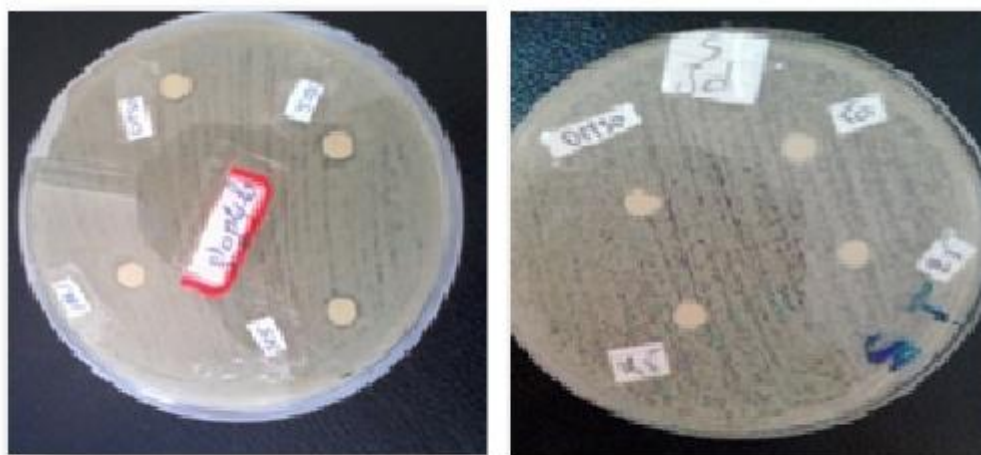
✚ *Allium cepa*

Les huiles brutes de Rouge d' Amposta et Jaune d' Espagne sont caractérisées par une faible activité antibactérienne. En effet les CMI ont été calculées uniquement pour les HEs qui ont préalablement exhibé un effet antibactérien (tableau 62).

Cependant, d'après les résultats d'aromatogrammes, *S. aureus* est la seule bactérie parmi l'ensemble des bactéries testées qui a révélé une sensibilité envers les HES d'oignon. Pour l'HE de RA, la bactérie *S. aureus* est avérée sensible avec tous les extraits dilués, avec une CMI de 125 µl/ml (figure 54). Par contre l'HE diluée de Jaune d'Espagne n'a montré aucun effet inhibiteur dans toutes les dilutions (tableau 62) (figure 54).

Tableau 62 : les valeurs des CMI des HES déluées de RA et JE sur *S. aureus*.

CMIs (µl/ml)	500	250	125
Huiles essentielles			
Rouge d'Amposta	-	-	-
Jaune d'Espagne	+	+	+



a

b

Figure 54 : Effet de l'huile diluée de l'HE de **a** : Rouge d'Amposta, **b** : Jaune d'Espagne vis-à-vis de *S. aureus*.

II.4.4. Classification hiérarchique :

Une présentation des géotypes d'ail et d'oignon, basée sur les différents résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de leurs huiles essentielles en fonction de la distance euclidienne au carré, a permis de classer les différentes variétés étudiées en groupes homogènes.

✚ *Allium sativum*

L'analyse des résultats des pouvoirs antibactériens des extraits bruts des huiles essentielles sur les quatre souches bactériennes obtenues a permis de réaliser la matrice de

proximité génétique entre les génotypes de l'ail (tableau 63). D'après Cette matrice il ressort que la variété Mess se trouve trop éloignée des variétés RL*,MB et Germ avec respectivement des coefficients de dissimilarité de 207,380 , 167,743 et 170,718 , Tandis que les couples des variétés (RL*,Germ) et (Germ,MB) se séparent par des coefficients de 94.342 et 56.910 respectivement , Cependant la variété RL* se trouve étroitement liée à la variété MB (coefficients de dissimilarités de 5,548). Cette matrice de proximité nous a permis de réaliser le dendrogramme illustré dans la figure 55 où il ressort que les différents génotypes se séparent en deux grands groupes, le premier groupe est composé de la variété Mees qui ne présente aucun effet anti bactérien, qu'avec l'*E.coli* , mais par une légère zone d'inhibition. le deuxième groupe rassemble les variétés Germ, MB et RL*. Ce deuxième groupe comporte, à son tour, deux sous groupes : MB et RL*, d'une part et la variété Germ , qui forme un deuxième sous groupe d'autre part, cette dernière se distingue des variétés du premier sous groupe par un effet anti bactérien moins important car elle présente un effet inhibiteur qu'avec trois souches bactériennes.

Tableau 63 : Matrice de proximité des variétés d'ail selon leur pouvoir antibactérien

Observation	Carré de la distance Euclidienne			
	RL*	Mess	MB	Germ
RL*	0,000	207,380	5,548	94,342
Mess	207,380	0,000	167,743	170,718
MB	5,548	167,743	0,000	56,910
Germ	94,342	170,718	56,910	0,000

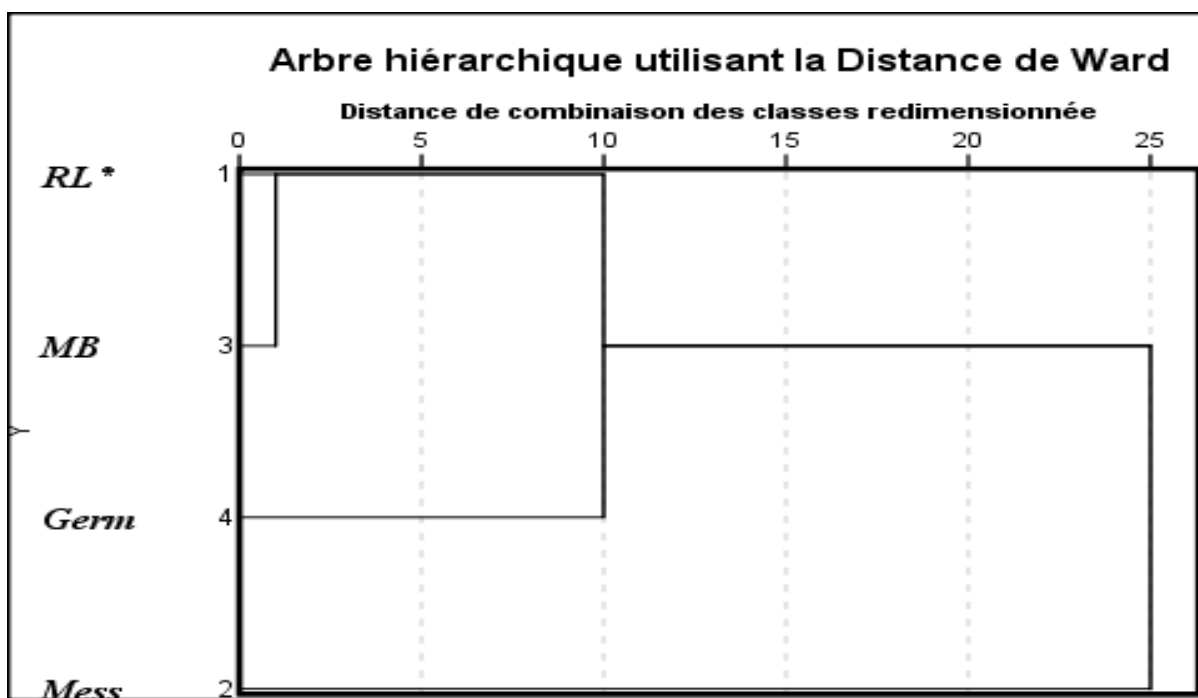


Figure55 :Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d’ail, Classification en fonction de leurs pouvoirs anti bactériens.

✚ *Allium cepa*

Pour les variétés de l’oignon la matrice de proximité (tableau 64), montre que la variété RA se trouve éloignée des deux variétés RL et JE par un coefficient de dissimilarité de 1,000. En se référant au dendrogramme (Figure56), nous remarquons que les génotypes d’oignon étudiés se répartissent en deux groupes. Le premier groupe est composé des génotypes RA et JE . Ces génotypes se sont groupés ensemble car ilsprésentent presqueles mêmes résultats de l’activité anti bacterienne de leurs huiles essentielles vis-à-vis les quatres souches testées. Le deuxieme groupe ne renferme que la variété RL qui n’a aucun effet inhibiteur sur la croissances des souches testées.

Tableau 64 : Matrice de proximité des variétés d’oignonselon leur pouvoir antibactérien.

Observation	Carré de la distance Euclidienne		
	RL	JE	RA
RL	0,000	0,000	1,000
JE	0,000	0,000	1,000
RA	1,000	1,000	0,000

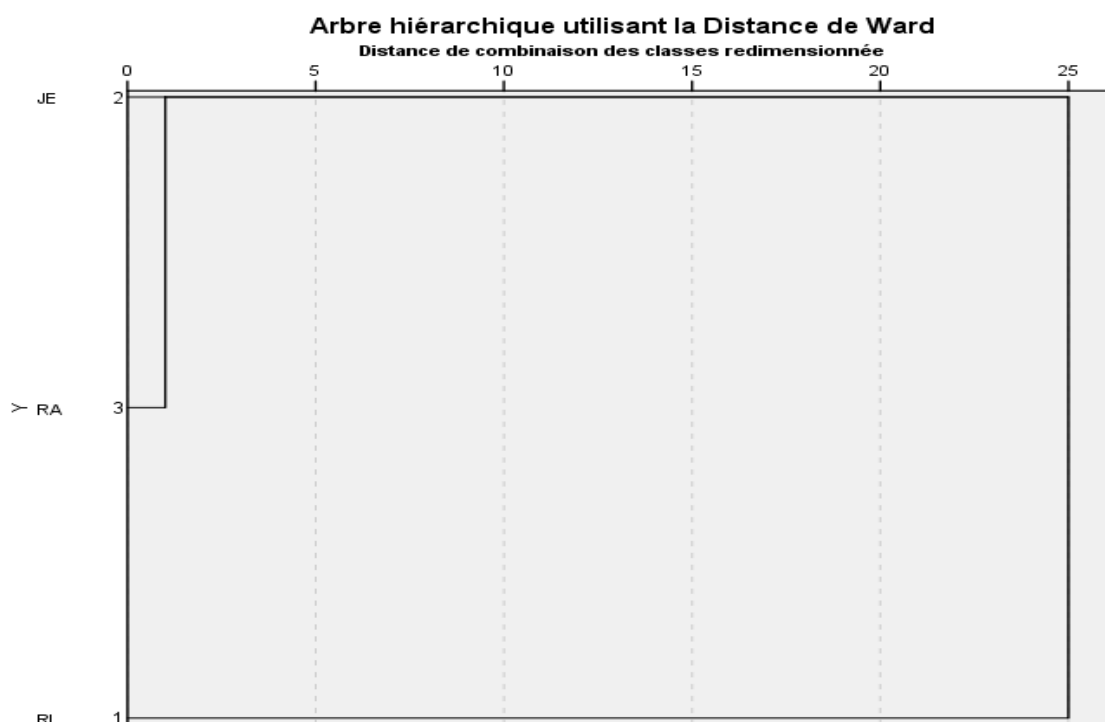


Figure56 :Dendrogramme de disimilarité génétique entre les génotypes d'oignon, Classification en fonction de leurs pouvoirs anti bactériens.

Discussion

Selon Rossi et al., 2007. L'activité antibactérienne des huiles essentielles, qui sont des mélanges complexes de molécules, est généralement inférieure à celle exercée par les molécules antibiotiques, isolées des microorganismes. Cela est corroboré aux nos résultats de l'effet des antibiotiques sur les bactéries testées et les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de l'HE des variétés de l'ail et d'oignon sur les mêmes bactéries qui montrent que le pouvoir antibactérien des HEs des variétés testées est trop faibles (le diamètre de zone d'inhibition le plus important est noté chez RL* et Germ (10mm), par rapport à l'activité généralement trouvées chez les antibiotiques sur les souches testées(grand diamètre de zone d'inhibition 31 mm pour l'antibiotique SXT25 sur la souche *Staphylococcus aureus* et 25mm pour CN10 sur la même souche) .

Les huiles essentielles de quatre variétés de l'ail', à l'exception de celle de la variété Mess qui révèle active qu'avec *E. Coli*, sont actives presque avec toutes les souches testées. Des zones d'inhibition de diamètres variables sont observées, Les diamètres d'inhibition, générés par les huiles essentielles (extrait brut) de la variété RL*, à l'encontre de *E. Coli* et *P.aeruginosa*, sont très nettement supérieurs à ceux produits par les huiles des variétés Mess, MB et Germ. Ainsi l'huile essentielle de Germ était active qu'avec trois bactéries mais elle

produit à l'encontre de *K. Pneumoniae* et *S.aureus* des diamètres de zones d'inhibition supérieurs à ceux produits par les autres variétés (10.2 mm et 8.1mm) respectivement. Cependant l'HE de la MB s'est avéré active sur toutes les bactéries mais avec des zones d'inhibition moins importantes comparativement aux celles obtenus par l'HE de RL* et Germ pour l'espèce *Allium cepa*, les HEs de RA et JE, ont exercé une faible activité antibactérienne à l'encontre de *S.aureus*, mais aucune activité antibactérienne à l'HE de RL.

Pour l'espèce *Allium sativum*, en revanche, Les bactéries à Gram négatives sont plus sensibles à l'action des huiles que les bactéries Gram positives contrairement aux résultats obtenus avec les huiles de l'espèces *Allium cepa*, où on trouve que les bactéries à Gram négatives à savoir *E. coli*, *K pneumoniae*, *p. aeruginosa* ont manifesté une résistance à l'égard de ces HEs. D'après Kalemba et Kunicka (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux H.Es dépend des propriétés de l'HE et le microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram(+) sont plus sensibles aux HEs que les bactéries à Gram (-). Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des HEs confirment ce phénomène (Poole, 2001 ; Burt, 2004b ; Bekhechi et al., 2008).

Selon (Poole, 2001 ; Burt, 2004a ; Busatta et al., 2008), la grande résistance des bactéries à Gram (-) aux HEs est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram (+). Cette activité antibactérienne est attribuée principalement à la richesse des HEs des deux espèces en composé soufrés comme l'allicine. Selon Tsao SM et Yin MC, (2001) la présence des liaisons disulfures, est un facteur important dans l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de l'ail et des autres alliums, dans cet ordre: diallyltetrasulfure > diallyl trisulfure > diallyl disulfure > diallylmonosulfure. Ainsi, les résultats obtenus par les travaux de Kim et al., (2004) ; Tsao SM et Yin MC, (2001) montrent que dans les composés soufrés, un plus grand nombre d'atomes de soufre se révèle entraîner une activité antimicrobienne plus forte. Ceci se rapprochent aux nos résultats obtenus par l'analyse de la composition chimique des HEs des variétés de l'ail et de l'oignon, où la variété RL* et Germ de l'ail et la variété RA de l'oignon contiennent des composés soufrés en plus. Par exemple les variétés de l'ail RL*, Germ, MB et Mess ont du diallyl disulfure dans leurs compositions avec des concentrations sont de (21.43%, 27.3%, 33.75% et 33.5% respectivement). De plus, les huiles essentielles de ces quatre variétés contient également du :

- trisulfure, di-2-propenyl avec des concentrations sont de (43.24%, 15.24%, 4.53 et 26.41%) respectivement.
- Sulfidallyl, méthyl avec respectivement de (20,54%, 7.34%, 0.0% et 0.0%).
- Disulfide, méthyl-2-propenyl avec des concentrations sont respectivement de (4.80%, 19.11%, 30.15% et 12.73%). Ceci explique le bon effet antibactérien de la variété RL*, Germ et MB.

Pour l'espèce *Allium cepa*, Kim et al., (2004) a démontré que le trisulfure de dipropyle a présenté une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et qui est similaire à nos résultats. L'HE de la variété RA contient le disulfure méthylpropyl (3,01%), le disulfure dipropyl (0,979%), alors que la variété RL n'en contient que le disulfure de méthylpropyl (2,89%). Ceci nous a permis de penser que l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles peut être liée aux dérivés de propyl.

À côté de ces dérivés de propyl la variété RA se distingue de la RL par une présence de quelques composés soufrés en plus. Cette répartition inégale des composés soufrés entre les HEs de ces variétés a bien expliqué leurs activités inhibitrices.

L'huile brute de l'ail RL* a une activité antibactérienne plus forte que celle de leur huile diluée. Cette dernière perd son efficacité mais l'extrait brut possède un pouvoir puissant vis-à-vis de toutes les souches étudiées. Alors que l'extrait brut de l'HE de la variété *Germ* agisse mieux sur les bactéries que l'huile diluée dans la concentration 50% et 12,5%, contre l'*E.Coli*, de cette variété. Par contre l'huile brute de la variété *Mess* présente une activité antibactérienne plus faible que celle de leurs huiles diluées, Ainsi, que l'huile diluée 12,5%, de la variété MB présente un effet sur les bactéries étudiées presque égal à celui donné par l'huile brute. Selon Leclerc et al., (1995), La présence de faible croissance bactérienne alternative avec une inhibition, est due à des souches bactériennes résistantes qui ont pu se développer en présence de l'agent antibactérien et qui sont en conflit avec celui-ci, ou bien l'instabilité de l'extrait. Parce qu'il est connu que toutes les espèces ne sont pas également sensibles vis-à-vis d'une substance et dans une population bactérienne il peut exister des différences individuelles de sensibilité, ainsi, Berche et al., (1989) ont montré que l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il est observé une reprise de la croissance bactérienne. Ce phénomène dit de rebond peut être dû à une instabilité de l'agent antibactérien *in vitro*, à une hétérogénéité de la population bactérienne qui peut comporter des bactéries génotypiquement plus résistantes que l'ensemble

de la population ou à une induction d'enzymes conférant une résistance des bactéries à l'extrait antibactérien.

Nos résultats de l'activité antibactérienne restent très faibles comparativement aux ceux obtenus par plusieurs chercheurs travaillant sur les HEs de l'ail et de l'oignon récoltées au printemps et au début de juin (plantes encore fraîches et vertes). Citant à titre d'exemple : Moumene F. et al.,(2016) et Benmeddour T. et al., (2015), dont ils ont révélé une activité des HEs plus importante que la notre avec les bactéries suivantes : *E.Coli*, *P.aeruginosa* et *S. aureus* . Cela confirme les résultats de D'Anna et al., (1999) qui ont montré que la plantation et la récolte précoce (au printemps) de l'ail donne : un bon rendement, une bonne qualité de bulbe et une richesse en allicine en comparant avec la plantation et la récolte tardive (en fin d'été) .

Conclusion

D'après ces résultats nous pouvons conclure que l'extrait brut de l'HE inhibent mieux que l'HE diluée, Ainsi, les huiles essentielles des variétés de l'ail et de l'oignon étudiées possèdent une activité antibactérienne sur les bactéries testées, mais cette activité reste très faible comparativement à celle des antibiotiques testés.

Les pouvoirs antibactériens, des HEs, qu'on a observés sont relativement cohérents et compatibles au regroupement des génotypes selon les paramètres biochimiques car ils sont principalement attribués à la présence des composés soufrés dans leurs compositions. De plus, la variabilité de la composition, de la structure et de la concentration des différents sulfures présents dans les huiles essentielles jouent un rôle important dans la détermination de leurs activités antibactériennes.

Le bon pouvoir antibactérien de l'HE de la RL* est peut être attribué à sa richesse en trisulfure, di-2-propionyl et en Sulfideallyl, méthyl et encore par sa richesse en atomes de soufre. Ce qui peut contribuer à l'efficacité de l'activité des huiles essentielles.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des variétés d'oignon peut être liée aux dérivés de propyl.

Conclusion générale
et
Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Il y a une grande diversité au sein des espèces *d'Allium* qui s'étend du bassin méditerranéen à l'Asie central et Pakistan. Aux seins de cette diversité, les deux espèces *Allium cepa* et *Allium sativum* nous offrent une gamme de variétés dotée de caractères d'adaptation à certaines adversités biotiques et abiotiques. Toutefois jusqu'à présent, l'exploitation de ces ressources génétiques permettant une bonne adaptation aux différents milieux écologiques et aux différents modes d'exploitation reste insuffisante.

Une étude morphologique des caractères quantitatifs et qualitatifs de bulbe est entreprise sur des variétés d'ail et d'oignon fournies par l'ITCMI d'Om El Bouaghi, où aucune étude n'a été menée sur la biodiversité de ces deux espèces. Cette étude nous a permis de prévoir une importante variabilité aux seins des géotypes des deux espèces étudiées.

L'analyse en composantes principales des paramètres morphologiques ont bien montré que le rendement en bulbe, le nombre de bulbe par kilogramme, le poids d'un bulbe, le nombre de points végétatifs par kg et le nombre des écailles sèches jouent un important rôle dans la classification des variétés d'oignon. Pour l'espèce *Allium sativum*, l'ensemble des analyses portant sur les caractères quantitatifs a permis d'identifier une importante variabilité entre les variétés d'ail à partir du rendement en bulbe, du nombre de bulbe par kilogramme et du poids d'un bulbe.

La caractérisation morphologique des cultivars étudiés sur la base des paramètres qualitatifs a mis en évidence un polymorphisme phénotypique important. Les différentes notations descriptives des écailles sèches du bulbe d'oignon (adhérence des écailles après récoltes, couleur de fond, intensité de la couleur des écailles et couleur de l'épiderme des écailles sèches) montrent une large variabilité variétale pour la présentation des bulbes.

Les observations effectuées après la récolte pour la description des bulbes présentent une importante variabilité entre les variétés d'oignon pour chaque descripteur mais l'épaisseur du colle de bulbe peut être considérée comme un important indicateur pour différencier les trois géotypes d'oignon étudiés.

Pour l'espèce *Allium sativum* une importante variabilité variétale est enregistrée pour la présentation des caïeux. En effet, les différentes notations descriptives des caïeux indiquent que certaines catégories telles que la position des caïeux à l'extrémité supérieure du bulbe, compacité des caïeux, distribution des caïeux et couleur de la chair sont spécifiques pour la

Conclusion générale et perspectives

variété Germidour, tandis qu'un polymorphisme phénotypique moins important a été observé pour les différentes notations descriptives des bulbes.

L'analyse moléculaire de la diversité génétique des variétés de l'espèce *Allium cepa* nous a permis de compter au total 48 fragments d'ADN amplifiés avec des dimensions variant entre 90 et 296 pb pour les variétés d'oignon et 48 fragments d'ADN amplifiés avec des dimensions variant entre 169 et 410 pb pour les variétés d'ail. Le taux moyen de polymorphisme varie de 33% à 100 % chez les cultivars de l'oignon et de 75% à 100% pour les variétés d'ail ; ce qui montre l'importante diversité génétique du patrimoine génétique de ces deux espèces.

Les résultats de l'extraction ont révélé une légère variation de la teneur et des paramètres organoleptiques de l'huile essentielle dans les deux espèces étudiées. Cependant, l'étude phytochimique, la caractérisation physico chimique et l'analyse chimique des huiles essentielles testées ont confirmé une variation considérable entre les variétés de chaque espèce, ce qui peut être expliqué par le comportement génétique de la plante du fait que le protocole d'extraction et les conditions environnementales de travail sont les mêmes.

La classification hiérarchique des génotypes d'oignon, selon les paramètres biochimiques se trouve controverser à celles qui sont effectuées selon, les paramètres moléculaire et l'analyse en coordonnée principale. Alors que la séparation de ces accessions selon les paramètres morphologiques descriptifs des écailles sèches (adhérence après récolte, couleur de fond, intensité de la couleur et couleur de l'épiderme) montre que ces variables constituent les éléments les plus stables et les plus significatifs pour caractériser et distinguer les variétés de cette espèce. Par ailleurs, la structuration génétique des génotypes d'ail selon les paramètres physico-chimiques et organoleptiques ainsi que la composition chimique de l'huile essentielle montrent que ces paramètres constituent les éléments les plus significatifs pour caractériser et distinguer les variétés de cette espèce.

L'évaluation de l'effet antibactérien montre que la plupart des bactéries utilisées sont très sensibles aux antibiotiques utilisés. Les HEs des variétés d'oignon : Rouge d'Amposta et Jaune d'Espagne ont exercé une faible activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus*, mais aucune activité antibactérienne de l'HE de Rouge locale n'a été observée. Les quatre variétés de l'ail sont révélées actives contre toutes les bactéries étudiées à l'exception de la variété Messidrom qui n'a aucun effet avec toutes les bactéries à l'exception d'*E.Coli*. Les extraits

Conclusion générale et perspectives

bruts des HE de la variété Rouge Locale et de la variété Mocpta Bulgare étaient les plus actifs. Cela est expliqué par leur composition chimique.

Notre présente étude a confirmé l'importante diversité génétique des variétés des deux espèces étudiées, mais elle pourrait être plus fiable en essayant d'élargir encore le nombre de caractères morphologiques étudiés, ce qui pourrait améliorer la concordance entre les dendrogrammes obtenus suite à l'analyse moléculaire et celui de l'étude morphologique et biochimique.

Cette étude a également prouvé l'existence de génotypes non encore connus, malgré leur importance thérapeutique et leur remarquable productivité, c'est le cas de la variété rouge locale de l'espèce *Allium sativum*. Ces génotypes sont menacés d'érosion génétique due aux échanges de semences entre producteurs et à la mise au point de nouvelles variétés par la voie des programmes de l'amélioration génétique. En guise de solution, la conservation *ex situ* dans des banques de gènes des génotypes d'oignon et d'ail est essentielle pour une exploitation durable de cette diversité.

En outre, il est également noté qu'il est primordial de connaître l'organisation de l'ail et de l'oignon de notre pays afin de pouvoir classer les variétés et de récupérer les génotypes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdoul D Samat , 2002 : Composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone Soudanienne du Burkina Faso : Valorisation Thèse de doctorat .Université d'Ouagadougou, p.24 -2 .

Aberchane M., Fechtal M., Chaouche A., Bouayoune T., 2001 : influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica manetti*). Annales de la recherche forestière au Maroc ISSN 0483-8009 Coden Afrma : 34,110-118.

Abramson C.I., Wanderley P.A., Wanderley M.J.A., Silva J.C.R. and Michaluk L.M, 2007: The Effect of essential oils of sweet fennel and pignut on mortality and learning in africanized Honeybees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) *Neotropical Entomology* 36 (6), pp. 828-835.

AFNOR. 2000 :Association Française de Normalisation, Huiles essentielles essentielles, Tom2, Monographie relatives aux huiles.6 ième édition. AFNOR, Paris.

Aharonson Z, Shani J Mishkinsky, Sulman FG.1969: Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) - a Feeding source of the sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetologia*. 5: 379-383.

Al-Achi A. Herbs.2005: Athat affect blood glucose levels. *Women's Health in Primary Care*; 8(7): 325-330.

Al-Zahim , M., Newbury, H.J., Ford-Lloyd, B.V. 1997: Classification of genetic variation in garlic *Allium sativum* L. revealed by RAPD. *Hortscience*: p p. 32:-102

Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y. 2001: Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition*. 131, 955s-962s.

Anton R. and Lobstein A., 2005 : Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. *Tec. &Doc.*, Paris, 522p.

Aprotosoia A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V. and Stanescu U. 2010: The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, Vol. 58 (1); pp. 46-54

Références bibliographiques

Astley, D., N.L. Innes and Q.P van der meer, 1982: resources of allium species, International board for plants genetic resources, Rome, Italy.

Avato, P., V. Miccolis & F. Tursi . 1998: Agronomic evaluation and essential oil content of garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes grown in Southern Italy. *Adv Hort Sci* 12(4): 201–204.

B

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

Balz rodolphe. 1986 : Les huiles essentielles et comment les utiliser. Ed Lavoisier. Paris.

Barry N. 2001 : Art d'extraire les huiles essentielles. De parfum à faire soi-même, pp. 125-128. *In* Belaagoune S. et Himed L. (2007). Etude de l'activité antioxydant d'une huile essentielle de *Schinus molle*. *Mémoire d'Ingéniorat*. INATAA, Université Constantine. 57p.

Baser K.H.C. and Buchbauer G.2010: Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994p.

Bekhechi C., Atik-Bekkara F et Abdelouhid D.E. 2008 : Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles *d'origanumglandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6, 153-159.

Bekhechi Ch., Abdelouhid D.2010: Les huiles essentielles, Offices des publications Universitaires. p20.

Belaiche, P.1979 : Traité de phytothérapie et d'aromathérapie :l'aromatogramme paris : maloine.204pp.

Belyagoubi L. 2006 : Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. *Mémoire de magister*. Université Abou Bekr Belkaid, 110p.

Benayad N. 2008 : Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.

Références bibliographiques

Benayad N. 2008 : Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.

Benini C., 2007 : Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. *Mémoire d'ingénieur*. Université Gembloux, 109p.

Benmeddour T, Laouer H, Benabdi AA et Brahimi S. 2015: Evaluation of antibacterial and antifungal activity of extracts from three species of the genus *Allium*: *A. cepa*, *fistulosum* and *sativum* grown in agricultural area of Doussen (wilaya of Biskra). *Courrier du Savoir* 19: 09–14.

Berche P, Gaillard J-L, Simonet M. 1989: Bactériologie: bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences Flammarion.

Bernadet M. 2000 : Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles, Editions Dangles.

Besombes C. 2008 : Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289p.

Bezanger Beauquesne L, Pinkas M, Torck M et Troutin F .1990 : Plantes médicinales des régions tempérées. Maloine édition.ET. 10- Block E, Ahmed S, Jain MK, Crecely RW, Apitz-Castro R and Cruz MR (1984) (E,Z)-

Bezanger-Beauquesne L, Pinkas M, Torck M et Troutin F. 1990: Plantes médicinales des régions tempérées. Edition Maloine.

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

Block E. 1992:the organosulfur chemistry of the genus *Allium*. Implication for the organic chemistry of sulphur. *Angew.Chem. Int*, Ed. Engl.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW . 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331

Références bibliographiques

- Boukary H. et al. 2012 :** Interactions entre la variabilité des écotypes de l'oignon (*Allium cepa* L.) et les facteurs agro-climatiques au Niger. *Tropicultura*, **30**(4), 209-215.
- Bourkhis B., Ouhssine M., Hnach M., Bourkhiss M., Satrani B. & Farah A . 2007:** Composition chimique et bio activité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. *Bull.Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, pp. 75-84..
- Bourkhiss M., Hnach M., Lakhilifi T., Boughdad A., Farah A., Satrani B.2011** Effet de l'Age et du stade végétatif sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de thuya de Berbere . *Les technologies de laboratoire : 2011*,6 (23) ,64-68.
- Boz I., Burzo I., Zamfirache M.M., Toma C. and Padurariu C., 2009.** Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (*Lamiaceae*). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, pp.36-39.
- Bradley, K.F., Rieger, M.A., Collins, G.G. 1996:** Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. *Aust J. Exp. Agri.* 36: pp. 613-618.
- Bruneton J. 1999 :** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème Ed. Tec&Doc, Lavoisier, Paris.
- Bruneton J. 2009 :** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Tec et Doc. Lavoisier 4ème édition, Paris.
- Bruneton J., 1993 :** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. &Doc.* Lavoisier, 2ème édition, Paris. 915p.
- Buchbauer G., Jirovetz L. 1994:** Aromatherapy-use of fragrances and essential oils as medicaments. *Flavour and Fragrance journal* 9(5):217-222.
- Burba J.L., 1995 :** Panorama mundial y nacional de variedades de ajo : posibilidades de adaptacion. IV corsotaller sobre produccion, comercializacion y industrializacion del ajo. Estacion exp. agropecuaria La Consulta Mendoza - Argentine. 27 pp.
- Burdock G.A., Fenaroli S.1995:** Handbook of flavor Ingredients, CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C.

Références bibliographiques

Burt S. 2004: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.

Busatta C., Vidal R.S., Popilski A.S., Mossi A.J., Dariva C.,Rodriguez M.R.A., Corazza M.L., Vladimir O.J. et Canslan R.L. 2008 : Application of *origanum majorana*L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food microbiology*, 25, 207-211.

C

Caree P.1953 : Précis de technologie et de chimie industrielle. T3, Ballière JB. et fils.

Carette A.S. 2000 : La lavande et son huile essentielle. In Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle.p 289.

Cavaleiro C., Palmeira A., Rodrigues A. and Martinez-de-Oliveira J. 2006: Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 55, pp. 1367–1373.

Cavallito C.J., Buck J.S., Suter C.M. 1944: Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 66:1950–1951

Chae SC, Park YJ .2010 : Development of SSR markers to study diversity in thegenus *Cymbidium*. *Biochem. Syst Ecol* 38:585–594.

Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J .1997: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9: 67-75

Chiasson et al. 2001: Chiasson H., Bélanger A. and Bostanian N., 2001. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction, *J. Econ. Entomol.* 94: pp.167-171.

Chitra Shenoy, Patil M.B., Ravikumar. Swati P.2009: Preliminary phyaochemical investigation and wound healing activity of *Allium Ceba* LINN (Liliaceae). *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.* 2. Issue 2. 167-175.

Références bibliographiques

Claisse-Dauchy R. 1996 : Médecine traditionnelle du Maghreb.

Colorado B. and Stashenko E. 2010: Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(4): pp.568-574.

Corzo-Martinez M., Corzo N. & Mar Villamiel. 2007: Biological properties of onions and garlic, *Trends in Food Science & Technology*, 18, 609-625. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.011>.

Cowan M.M. 1999: Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*; 12(4): 564-582.

Cramer C.S. et Havey M.J. 1999: Morphological, biochemical, and molecular markers in onion. *Hortic. Sci.*, **34**, 589-593.

Cryder C.M., Corgan J.N., Urquhart N.S. & Clason D. 1991: Isozyme analysis of progeny derived from (*Allium fistulosum* × *Allium cepa*) × *Allium cepa*. *Theor. Appl. Genet.*, **82**, 337-345.

Currah . 2002: Onions in the tropics: cultivars and country reports. *In:* Rabinowitch H.D. et Currah L., eds. *Allium crop science: recent advances*. Wallingford, UK; New York, USA: CABI Publishing, 379-408.

D

Davis G.N. et El-Shafie M.W. 1967: Inheritance of bulb color in the onion (*Allium cepa* L.). *Hilgardia*, **38**, 607-622.

De Lannoy G. 2000: Oignon *Allium cepa* L. *In:* Raemaekers R.H., ed. *Agriculture en Afrique tropicale*. Bruxelles : DGCI, 518-526.

De Vienne D. et Causse M .1998 : La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs *In:* De Vienne D (eds) *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologie végétales*. INRA éditions, pp 89-118.

Degryse A.C., Voinier M.A., Delpla I. 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, p 87.

Références bibliographiques

Demarine FE. 1985 : « Le géranium rosat ». Parfums, Cosmétiques et Arômes, n°62.

Dey lucey MD, Anoja S, Attele DDS, Chun-Su Yuan MD. 2002: Alternative thérapies for type 2 diabètes. *Alternative medicine Review.* 7(1): 45-58.

Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N,2003 :N. , screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, thymelaea lythroides. *bull. Soc. Pharm. Bordeaux,* 142. 61.

Domart A., Bourneuf J. 1988 : Nouveau Larousse des plantes médicinaleLibrairie Larousse. Paris.

Dossier I.G.P.2005 : Demande d'enregistrement d'une Indication Géographique Protégée "AIL DE LA DROME ".

Ducros V, Favier A. 2004 : Métabolisme du sélénium. *EMC-Endocrinologie.* 1(1): 19- 28.

E

Emad A. Shalaby, Nasr N.F., Samia M. El Sherief. J. 2011: An in vitro study of the antimicrobial and antioxidant efficacy of some nature essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(6), pp. 922-931.

Engeland R.L., 1991. Growing great garlic. 213 pp. illustr. + suppl. 1995, 33 pp. Filaree Farm productions R.2. Box 162. Okanogan WA 98840 U.S.A.

Etoh T, Simon PW .2002: Diversity, fertility and seed production of garlic. In: Rabinowitch HD (ed) *Allium crop science: recent advances.* CABI Pub, Wallingford, pp 101–117.

Etoh T., 1988: Comparision of the peroxydases enzymes between fertile and sterile clones of Garlic. *Proc. 4thEucarpia Allium symp.* 6-9 Dec. 88, Wellesbourne - Warwick U.K. 115-119.

Etoh T., Noma Y., Nishitarumitsu Y., Wakamoto T., 1988: Seed productivity and germinability of various garlic clones collected in Soviet central Asia. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* 24-29-39.

Evans GW, Bowman TD. 1992: Chromium Picolinate Increases Membrane Fluidity and rate of Insulin Internalization. *J of Inorganic Biochemistry.* 46: 243-250.

Références bibliographiques

Eymard S. 2003 : Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conversion et de la transformation de chinchrd (*trachurus trachurus*), choix des pvocedés.

F

F. Moumene F. Benali-Toumi M. Benabderrahman A. Benyamina H. Selem, M. H. Selem , M. Dif .2016 :Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Allium vineale* et *Allium sativum* de l'Ouest Algérie. Phytothérapie Doi:10.1007/s10298-016-1038-3.

Fabrice B., Les huiles essentielles-Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale; Fernand Lanore ; ISBN : 978-2-85157-566.

FAOSTAT. 2013 :Base de données statistiques agricoles FAO, http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countries_by_commodity/F, (12/05/2015).

Fischer D. et Bachmann K. 2000: Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus *Rhizirideum*. *Theor. Appl. Genet.*, 101, 153-164.

Fossen T. et al. 1996: Characteristic anthocyanin pattern from onions and other *Allium* spp. *J. FoodSci.*, **61**, 703-706.

Foury C.& Schweisguth B. 1992: L'oignon.In :Gallais A. &Bannerot H.,éds.Amélioration des espèces végétales cultivées.*Paris : INRA, 406-419.*

Fritsch R.M. & Friesen N. 2002: Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch H.D. & Currah L., eds. *Allium crop science: recent advances*. Wallingford, UK; New York, USA: CABI Publishing, 5-30.

G

Garnéro J. 1991 : Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. *Encyclopédie des médecines naturelles*, Paris, France, pp. 2-20.

Gerhard K.H. Przemeck, Jim Mattsson, Christian S. Hardtke, Z. Renee Sung and Thomas Berleth. 1993: Studies on the role of the *Arabidopsis gene* monpteros in vascular development and plant cell axialization. *Journal of physiological Plant*. Vol 11 P 165-170.

Références bibliographiques

Gilly G. 1997: « Les plantes à parfums et huiles essentielles à Grasse ». L'harmattan, Paris 1997, pp : 11-19.

Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B.2000: Onions –A Global Benefit h Health. *Phytother .Res*, 16: 603-615 (ref. 6224).

Guerin-Fauble V et Carret G.1999 : L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV-INRA. p 512.

H

Hacisferogullari H., Ozcan M., Demir F.et Calisir S. 2005: Somenutritional and Technological properties of garlic. *Journal of Food Engineering*; 68: 463- 469

Hammer K.A. 1999: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *journal of Applied Microbiology*, 86, 895 990.

Hayes, A. and B. Markovic. 2002: Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* Part 1 antimicrobial activity and invitro cytotoxicity.*Food Chem. Toxicol.*, 4: 949-964.

Hazzit M., 2002 : Arômes alimentaires. Thèse magister, *USTHB*, Alger. 96p.

Hellal Z. 2011 : Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus, Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire magister, Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou.p 5.

Hemingway R.W. 1992: Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: *Lpantpolyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E Hemingway R.W* New York.

Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., and Van de Putte, B. 1993: Content of potentially anticarcinogenic flavonoïds of tea infusions, wine and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, . 1242-6.

Hong –J. 1999: Fundamental studies on the crossbreeding in garlic, *Allium sativum* L. dissertation, Kagoshima University, Kagoshima , Jap.

Hong, C. J., Watanabe, H., Etoh, T., & Iwai, S. 2000: A Search of Pollen Fertile Clones in the Iberian Garlic by RAPD Markers. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Japan*, Vol. 36, pp. 11-16.

Références bibliographiques

Huang et al. 1987 : Perfumer and flavorist, Vol. 13, N° 2, 67p. *In* Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 41p.

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

I

Iburg.A .2007 : les plantes medicinales;Grund;19P.

Inouye S.,S.Abe,repot. 2003: Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of Selected essential oils by gaseous and Solution contacts *International journal of Aromatherapy* vol13p33-41.

Ipek, M., Ipek, A., Simon, P. (2003). Gene Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: pp. 246-252.

IPGRI . 2001:Descriptors for Allium (Allium spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome,Italy.

Isrin.P. 2001 : Larousse encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soins.

J

J., VMemelink erpoort R., Kijne J.W. 2001 : Organisation of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism,Trends plant sci 6 -212-219 T2, Monographie relatives aux huiles, 6 ème édition, Paris.

Johnson AW .2003 : Invitation à la chimie organique. Editions De Boeck, Paris Bruxelles.

K

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

Références bibliographiques

Kamenetsky R, London Shafir I, Khassanov F, Kik C van Heusden AW, , Vrieling-van Ginkel M , Bueger-Meijer K, Auger J, Arnault I Rabinowitch HD .2005 : Diversity in fertility potential and organo-sulphur compounds among garlics from Central Asia . *Biodivers Conserv* 14: 281-295.

Kamenetsky R, London ShaWr I, Baizerman M, Khassanov F, Kik C, Rabinowitch HD . 2004: Garlic (*Allium sativum* L.) and its wild relatives from Central Asia: evaluation for fertility potential. *Acta Hort* 637:83–91.

Kanko C., Sawaliho B.E., Kone S., Koukoua G., N'guessant Y.T. 2004 .: «Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus* , *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». *Comptes rendus Chimie* 7(2004) 1039-1042.

Kaufmann B. and Christen P. 2002: Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem.Anal.*13, pp.105-113.

Kharl A., Lawande K.E. & Negi K.S. 2010: Microsatellite marker based analysis of genetic diversity in short day tropical Indian onion and cross amplification in related *Allium* spp. *Genet. Resour. C.ropEvol.*, **58**, 741-754.

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

Kim S. et al.. 2009: Identification of two novel inactive DFR-A alleles responsible for failure to produce anthocyanin and development of a simple PCR-based molecular marker for bulb color selection in onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **118**, 1391-1399.

Kim, J.W.; Huh, J.E.; Kyung, S.H.; Kyung, K.H. 2004: Antimicrobial activity of alk(en)yl sulfides found in essential oils of garlic and onion. *Food Sci. Biotechnol.*, **13**, 235–239.

King J.J., Bradeen J.M. & Havey M.J. 1998: Variability for restriction fragment-length polymorphisms (RFLPs) and relationships among elite commercial inbred and virtual hybrid onion populations. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **123**, 1034-1037.

Références bibliographiques

Klaas M. & Friesen N. 2002: Molecular markers in *Allium*. In: Rabinowitch H.D. & Currah L., eds. *Allium crop science: recent advances*. Wallingford, UK; New York, USA: CABI Publishing, 159-186.

Kuhl J.C. et al. 2004: A unique set of 11,008 onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders Asparagales and Poales. *Plant Cell*, **16**, 114-125.

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

L

Lacaille-Dubois, M. A. 2000: Biologically and Pharmacologically active saponins from plants: recent advances in Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal plants. Marston A. and Oleszek W., Ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 205.

Lallemand J., Messiaen C.M., Briand F., Etoh T., 1994. Delimitation of varietal groups in Garlic by morphological and physiological characters, verified by isozyme method. Symposium on edible Alliaceae. Mendoza (Argentina), Mars 1994.

Lallemand J., Messiaen C.M., Briand F. and Etoh E. 1997: Delimitation of varietal groups in garlic (*Allium sativum* L.) by morphological, physiological and biochemical characters. In: Burba J.L. and Galmarini C.R. (eds), Proceedings on First International Symposium on Edible Alliaceae. Acta Horticulturae 433, pp.123–129.

Lamarti A., Badoc A. & Carde J.P. 1993 : Etude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de fenouil amer (*Foeniculum vulgare* Mill.) ; caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, pp 73-132.

Lampasona GS, Marti'nez L, Burba JL. 2003: Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). *Euphytica* 132: 115–119.

Langerano, P., D. De Carlo, V. Candido, G. Martelli, V. Miccolis & I. Greco, 1995: Analisi della variabilità genetica con marcatori biochimici in *Allium sativum* L. Proc.

Références bibliographiques

‘L’orticoltura in Basilicata: situazione attuale e prospettive.’ Metaponto 2 March 1994. In: Vito Radio (Eds.), pp. 107–119.

Larousse. 2001 : Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation et soins. 2ème Edition, Edition Larousse. Paris.

Leclerc H, Gaillard J-L, Simonet M. 1995 : Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.

Lee MK, Lim YP, Bang JW. 2002: Genetic analysis of garlic (*Allium sativum* L.) cultivars using AFLP. Korean J Genet 24: 75–81.

Leung A.Y. 1980: Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics, Wiley-Interscience Pub., NY.

Li ZK, Yu SB, Lafitte HR, Huang L, Courtois B, Hittalmani S, Vijayakumar CHM, Liu GF, Wang GC, Zhuang JY, Shashidhar HE, Zheng KL, Singh VP, Sidhu JS, Srivantaneeyakul S, Khush GS . 2003: QTL x environment interactions in rice. I. Heading date and plant height. Theor Appl Genet 108: 141–153.

Liolios C.C., Gortzi O., Lalas S., Tsaknis J., Chinou I. 2009: Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. Food Chemistry; 112: 77-83.

Lis-Balchin M. 2002: « Géranium and pelargonium: the genera *Geranium* and *Pelargonium* ». CRC Press, Taylor & francis, London,; pp: 116-131, 149-165, 184-217.

Liu X.C., Lu X.N., Liu Q.Z., Liu Z.L. 2014: Evaluation of insecticidal activity of the essential oil of *Allium chinense* G. Don and its major constituents against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. Journal of Asia-Pacific Entomology 17(4):853–856.

Lombard. 2000 : Estimation de la proximité génétique de variétés de colza sur la base de marqueurs moléculaires : conséquences pour l’inscription et la protection variétale PH.D thesis, Institut national agronomique paris- Grignon, France. pp.136.

Lucchesi M. E. 2005 : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l’extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat*. Université de La Réunion, 72p.

Références bibliographiques

Lucchesi M.E., Chemat F. and Smadja J. 2004: Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs. Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr.A* 1043, pp. 323-327.

M

Maass H., Klaas M. 1995: Intraspecific differentiation in Garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. *Theor.appl. Genetics*, 91, 89-97.

Maffeur et Sacco. 1987: Perfumer and flavorist. Vol. 13, N° 5, 61p. *In* Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289p.

Mahmoud B.S.M., Yamasaki K., Miyashita K., Il-Shik S., Dong-suk C., Suzuki T.2004: Bacterial microflora of carp (*Cyprius carpis*) and its Shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*; 21: 657-666.

Maire René.1958 : Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara). Volume V: Monocotyledonae: Liliales, Liliaceae. Editions Paul Lechevalier Paris (VIe).

Mangambu M.J de Dieu., Mushagalusak F., Kadima N.J.,Contribution à l'étude phytochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de Bukavu, R.D.Congo. *J. Appl. Biosci.* 75. 2014 : 6211.

Mann .L. 1962 : méthodes artisanales de tannage, p53.

Marles RJ, Farnsworth NR. 1994: Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ Med Plant Res.*; 6:149-187.

Marriott P.J., Shellie R. and Cornwell C. 2001: Review: Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936; pp. 1-22.

Martin W.J. et al. 2005: Genetic mapping of expressed sequences in onion and *in silico* comparisons with rice show scant colinearity. *Mol. Genet. Genomics*, 274, 197-204.

Références bibliographiques

Marzoukia H., Elaissib A., Khaldic A., Bouzidd S., Falconierie D., Marongiu B., Pirasa A. and Porcedda S. 2009 : Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Natural Products Journal*, Vol. 2; pp. 86-91.

Maurice N. 1997 : de l'herbosterie d'antan à la phytothérapie moléculaires du XXI^e siècle. Ed: Lavoisier, Paris, p12.

McCallum J. et al. 2008: Genetic diversity analysis and single-nucleotide polymorphism marker development in cultivated bulb onion based on expressed sequence tag-simple sequence repeat markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **133**, 810-818.

Meireles MAA. 2002: Experimental Results for extraction of essential oil from *Lippia sidoides* cham. Using pressurised carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19(02): 229-241.

Messiaen C.M., Cohat J., Leroux J.P., Pichon M., Beyries A, 1993: Les *Allium* alimentaires reproduits par voie végétative. INRA Editions. 230 pp.

Messiaen, C.M. 1996 : La variabilité chez l'ail. INRA. Sauve qui peut N° 9: 7-10.

Messiaen, C.-M. et Rouamba, A .2004 : *Allium sativum* L. In: Grubben, G.J.H. & Denton, O.A. (Editeurs). PROTA 2: Vegetables/Légumes. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Pays Bas.)

Messiaen, C.M.; Lallemand, J. y Briand, F. 1994: Varietal groups in garlic cultivars. *Acta Horticulturae* (358): 157-159.

Moe KT, Zhao W, Song HS, Kim YH, Chung JW, Cho YI, Park PH, Park HS, Jo ManHyun; Ham InKi; Moe KyawThu; Kwon SoonWook; Lu FuHao; Park Yong Jin, Kim Woon Seob; Won MiKyoung; Kim Taell; Lee EunMo. 2012: Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) using SSR markers. *Australian Journal of Crop Science* Vol. 6 No. 4 pp. 625-631.

Mohamed N.A.B. 2005: Study on important parameters affecting the Hydro-distillation for ginger oil production. *Master Thesis*, Universiti Teknologi Malaysia, 172p.

Références bibliographiques

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

Mohammedi Z. & Fouzia A. 2007 : Pouvoir fongistatique de l'huile essentielle d'une plante aromatique sur la croissance des champignons. Université Abou Bakr Belkaïd –Tlemcen, Algérie. 3p.

Morgante M. et Olivieri A.M. 1993: PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.*, 3(1), 175-182.

Moumouni A. D. 2006 : Les effets de la réappropriation de la culture du Violet de Galmi par les producteurs d'oignon de la région de Tahoua – NIGER, sur la dynamique du territoire local, l'organisation sociale et économique, Thèse Université De Toulouse - Le Mirail, 281 p.

Moura L.S., Marchese J.A. and Sousa L.A. 2006: b. Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, Vol.8, pp.193- 198.

N

Nabos J. 1976 : L'amélioration de l'oignon (*Allium cepa* L.) au Niger. *Agron. Trop.*, 31(4), 387-397.

Najimi, B., Boukhatem, N., Jaafari, S. E., Jlibène, M., Paul, R., and Jacquemin, J. 2002 : Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of markers associated with H5 and H22 Hessian fly resistance genes in bread wheat. *Biotechnology, Agronomy, Society, and Environment* 6(2): 79-85.

Najjaa, H., Neffati, M., Zouari, S., & Ammar, E. 2007 : Essential oil composition and antibacterial activity of different extracts of a North African endemic species. *Comptes Rendus de Chimie*, 10, 820-826.

Nei M, Li WH. 1979: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76, 5269–5273.

Références bibliographiques

Nowitz T., Bottet J. 2000 : Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Edition Larousse.

O

O’Gara E A. Hill DJ. Maslin DJ.2000: Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl Constituents against *Helicobacter pylori* , *Appl Environ Microbial* 66.5:2269-2273.

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

OMS. Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO /EDM /TRM /2002.1.

Oussla M, Caillet S, Saucier L, Lacoix M. 2006: Antimicrobienne effects of selectd plant essential oils on the growth of a *pseudomonas putida* strain isolated from meat-meat science: vol 73 PP 236-244.

P

Padma S Vankar. 2004: Essential Oils and Fragrances from Natural Sources. P31-34, 106.

Panthee DR, KC RB, Regmi HN, Subedi PP, Bhattarai S, Dhakal J (2006) Diversity analysis of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm available in Nepal based on morphological characters. *Genet Resour Crop Evol* 53: 205–212.

Peffley E.B. et Hou A. 2000: Bulb-type onion introgressants possessing *Allium fistulosum* L. genes recovered from interspecific hybrid backcrosses between *A. cepa* L. and *A. fistulosum* L. *Theor. Appl. Genet.*, **100**(3-4), 528-534.

Peffley E.B. et Orozco-Castillo C. 1987: Polymorphism of isozymes within plant introductions of *A. cepa* L. and *A. fistulosum* L. *HortScience*, **22**, 956-957.

Références bibliographiques

Pellecuer J.1982 : de la plante vers le médicament : plantes médicinales et médecine populaire en Bas Languedoc, Document édité par l'ODAC, supplément à études sur l'Hérault, 13 (3), p.29-35.

Penge A.O., Mwelo J.N., Mbenza A.P., Tshilumbu P.K., Ngombe N.K., Kalenda N.T., Duki A., 2005: Contribution à l'analyse chimique préliminaire et à la détermination de la valeur nutritionnelle de *Cyrtosperma senegalensis* (Araceae). *Annales de Pharmacie*, 3(1) : 153-158.

Pibiri MC.2005 : Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctoral. Polytechnique Fédérale de Lausanne.

Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Gonçalves M.J., Costa-de-Oliveira S., Hettiarachchi D.S. 2008: Volatile oil content determination in the Australian sandalwood industry: Towards a standardised method. *Sandalwood Research Newsletter*, Issue 23; pp.1-4.

Piochon M. 2008: Étude des huiles essentielles d'espèce végétale de la flore laurentienne : composition chimique, activité pharmacologique et hémi-synthèse. Mémoire université du Quebec à Chicoutimi, Canada.

Poole K. 2001: Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current opinion in microbiology*, 4, 500-508.

Pooler M.R., Simon P.W. 1993: Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. *Euphytica*, 68, 121-130.

Pousset J.L. 1989 : Plantes médicinales africaines. Edition Ellipses.

Pyun, M.S. and Shin, S. 2006: Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*.13, 394-400.

R

Raven, Evert, Eichhomm .2007: Ed.de boeck université.

Reiman H. 1931:Genetic factors for pigmentation in the onion and their relation to disease resistance. *J. Agric. Res.*, **42**, 251-278.

Références bibliographiques

Renata P.S., Edson P.N., Ronaldo F.N., Gilvandete M.P.S., Gustavo H.M.A., Edilberto S.R. & Otilia D.L. 2006 : Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 17, № 5, pp. 1027-1030.

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

Richard Brand, Charles-Marie Messiaen. 1996 : L'Ail, une semence à part. INRA. Sauve qui peut ! n°9. GEVES - Cavaillon, 84300 Les Vignères

Richard H. 2005 : Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse. Edition L'harmattan p53-64.

Ricroch A, Rouamba A & Sarr A, . 1996: Valorisation de la production de l'oignon en Afrique de l'Ouest par la gestion dynamique de ses ressources génétiques. *Acta bot. Gallica* 143 (2/3) : 101-106.

Robert-Demuet S. 1995 : Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes, 131-137. Montréal-canada.

Robinson T .1991: The organic constituents of higher plants. The chemistry and interrelationships. Cordus Press, MA, USA.

Rossi PG, Berti L, Panighi J, Maury J, Muselli A, de Rocca Serra D, Gonny M, Bolla JM .2007: Antibacterial action of essential oils from Corsica. *J. Essent. Oil Res.* **19**: 176-182

Rouamba A. & Ricroch A. 2006 : La phosphoglucoisomérase et la malate deshydrogénase : deux nouveaux systèmes enzymatiques polymorphes chez l'oignon. *Agron. Afr.*, **18**(2), 135-144.

Rouamba A., Sandmeier M., Sarr A. & Ricroch A. 2001: Allozyme variation within and among populations of onion (*Allium cepa* L.) from West Africa. *Theor. Appl. Genet.*, **103**, 855-861.

Références bibliographiques

Rouamba A., Sarr A. & Ricroch A .1997 : Dynamic management of genetic resource of *Allium cepa* L. (onion) in west Africa. *Acta Hortic.*, **433**, 185-189.

S

S, Faivre - Rampant P, prdo E, prat D.2000 : Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures*, 9 :311-327.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989 : Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Samouelian F., Gaudin V., Boccara M. 2009: Génétique moléculaire des plantes. France, Éditions QUÆ, 208 P.

Sampath Kumar K.P., Debjit B., Chiranjib, Biswajit, J.2010: *Allium cepa* : A traditional medicinal herb and its health benefits. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2(1): 283-291

Sanjay K.B., subir K.M. 2002: Effect of garlic on cardiovascular disorders. *Nutrition Journal.*, 1 1-14.

Semen E., Hiziroglu S. 2005: Production, Yield and Derivatives of Volatile Oils from Eastern Redcedar(*Juniperus Virginiana* L.) . *American Journal of Environmental Sciences*; 1 (2): 133-138.

Shankar NRayana ,M.L.,Raghavan,B.,Abraham,K.O.,Naterajan.C.P.1982: sulfur compounds in flavours.In : food flavours part A.Introduction,(D.norton,A.j.Macleod, eds) . Elsevier .Amterdam,pp.169-281.

Shigyo M. & Kik C .2008 : Onion. In: Prohens J. & Nuez F., eds. *Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*. New York, USA: Springer, 121-159.

Silano V. and Delbò M. 2008: Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller. *EMEA*, European Medicines Agency, London , 23p.

Silou T. 2003 : Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles d'*E. citriodora* acclimaté à Pointe-Noire (Congo-Brazzaville). Université Marien Ngouabi. Faculté des sciences, pp.1-6.

Références bibliographiques

Skandamis, P., Nychas, G.-J.E. 2001 :Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of mince meat stored in air and modified atmospheres, *J. Appl. Microbiol*, 91, 1011–1022.

Sousa EMBD., Chiavone –Filho O., Moreno MT., Silva DN., Marques M.O.M., WILLEM J.P. 2004 : Les huiles essentielles, médecine d’avenir. P 318.

Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Facanali R., Meireles M.A.A., Olle M. and Bender I. 2010: The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research* 8 (3), p p, 687-696.

Suad khamis S Al-Burtamani ,Majekodunmi O Fatope,Ruchi G Marwah, Anthony K Onifade And Salim H Al-Saidi .2004: chemical composition,antimicrobial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* form Oman .*journal of ethnopharmacology* 96: 107 -112.

T

Takagi H., 1990 : (Garlic). In : R. & B. 1990, III, 6,109-146.

Tautz D .1989: Hyper variability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers, *Nuc. Acid.Res.* 17:6463-6471.

Teisseire P.J. 1991 : Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France.480p.

Teuscher E., Anton R., Lobstein A. 2005 : Plantes aromatiques : épices, condiments, aromates et huiles essentielles. Edition Tec et Doc. Paris.

Thompson KH, Godin DV. 1995: Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutrition Research.* 15(9): 1377-1410.

Trease E., Evans W.C.1987: Pharmacognosy. Billiare.Tindall.London 13 Edn, 61-62.

Tsao, S.; Yin, M. 2001:*In vitro* antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J. Med. Microbiol.*50, 646–649.

V

Références bibliographiques

Verdrager J. 1978 : Ces médicaments qui ne nous viennent des plantes ou les plantes médicinales dans le traitement modernes. Edition Maloine SA. Paris.

Virginia L. 2006 : the analysis of onion and garlic. Journal of chromatography A, 1112, 3-22.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper, M Zabeau M .1995 : AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl Acids Res. 21: 4414-4470.

W

Weinreich & Nitz.1996 : Perfumer and flavorist. Vol. 25 №4, 55p. In Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289p.

Wichtl M., Anton R. 2003 : Plantes thérapeutiques. Edition Tec et Doc.

Wilkie S.E., Isaac P.G. & Slater R.J. 1993: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor. Appl. Genet., **86**, 497-504.

Annexes

Annexes

Annexe : 1

1. Résultats des mesures des paramètres morphologiques quantitatifs des deux espèces

✓ *Allium sativum*.

Poids d'un Bulbe :

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL*	26,58	31.56	24.00	27.38
MB	16.09	21.86	15.07	17.67
Mess	25.88	28.95	23.97	26.27
Germ	25.40	30.16	24.02	26.53

Poids d'un cai :

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL*	2.85	1.92	2.92	2.56
MB	1.72	1.46	2.90	2.03
Mess	4.33	1.75	2.29	2.79
Germ	2.67	2.00	3.08	2.58

Nombre de cai/bulbe :

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL*	14	13	14	13.67
MB	11	13	10	11.33
Mess	12	12	14	12.67
Germ	12	14	12	12.67

Annexes

Nombre de bulb /Kg :

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL*	40	31	42	37.67
MB	61	47	66	58
Mess	41	33	40	38
Germ	42	33	45	40

Rdt :

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL*	47,253127	55,999755	42,66648	48,639787
MB	28,604319	38,862052	26,790994	31,419122
Mess	46,008688	51,466442	42,613147	46,696092
Germ	45,155358	53,617543	42,702035	47,158312

✓ *Allium cepa.*

Poids d'un Bulbe

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	155.5	154.83	163.5	157.94
JE	364	309	188	316
RA	365	284	275	308

Annexes

Nombre de bulbe/Kg

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	6	6	6	6
JE	4	5	4	4.33
RA	3	4	4	3.66

Longueur de bulbes

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	9.67	10.33	9.5	9.83
JE	9.33	10.83	9.33	9.83
RA	11.67	11	10.5	11.05

Diamètre de bulbes

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	11	10	10	10.33
JE	10.5	12.33	10.33	11.05
RA	12.67	12	11	11.89

Rdt

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	27,555435	27,880767	29,066540	28,167581
JE	64,710828	54,933093	33,422076	51,021999
RA	64,888605	50,488668	48,888675	54,755316

Annexes

Nbre des écailles sèches

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	2	2	3	2.33
JE	2	2	1	1.67
RA	5	5	6	5.33

Nbre de tuniques internes

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	9	9	7	8.33
JE	6	7	7	6.67
RA	7	7	8	7.33

Nombre de points végétatifs par Kg

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	11	12	12	11.67
JE	30	24	28	27.33
RA	20	24	21	61.67

Annexes

Annexe 02 : Etude moléculaire

1. Solutions utilisées

CTAB (2x)

Produit	Poids moléculaire	Concentration finale	Qsp 1000ml
CTAB	364.09 g/mol	2%	20g
Tris	157.65 g/mol	100mM	12.11g
EDTA	372.24 g/mol	20mM	7.44g
NaCl	58.44 g/mol	1.4M	81.76g

Ethanol 70%

Produit	Poids moléculaire	Concentration finale	Qsp 1000ml
Tris	10mM	157.65 g/mol	0.44g
EDTA	1mM	372.24 g/mol	0.152g
dH2O up qsp	-	-	400ml

TBE (10x) pH=8

Produit	Poids moléculaire	Qsp 1000ml
Tris Base	121.14 g/mol	107.8g
Acide Borique	61.83 g/mol	55g
EDTA	372.24 g/mol	5.8g
dH2O up qsp	-	1000ml

BET

Produit	Poids moléculaire	Concentration finale	Qsp 1000ml
BET (10mg/ml)	2 μ g/ml	394.3 g/mol	200 μ l
dH2O up qsp	-	-	1000 ml

Annexes

Gel (1.5%)

Produit	Poids moléculaire	Qsp 1000ml
Agarose	1.5%	3g
TBE	-	20ml
BET	-	5 μ l
dH ₂ O up qsp	-	180ml

Bleu de migration (6x)

Produit	%
Bleu de bromophénol	0.25%
Xylene Cyanol FF	0.25%
Glycerol	40%

Annexes

Annexe 3 : Tableaux du rendement en huile essentielle des deux espèces

Messedrom-Ail-	0,49	0,44	0,45
Roge locale -Ail-	0,53	0,51	0,52
Germidour- Ail-	0,73	0,70	0,74
Mupcta bulgare- Ail-	0,62	0,60	0,61
Roge locale-oignon-	0,51	0,50	0,52
Jaune d'Espagneoignon-	0,42	0,39	0,40
Rouge d'Amposta-oignon-	0,68	0,63	0,62

✓ **Réactifs utilisés pour le screening phytochimique :**

• **Réactif de MAYER :**

Chlorure de mercure.....1,36 g

Iodure de potassium.....5 g

Eau distillée.....qsp 100 ml

• **Réactif de WAGNER :**

Iodure de potassium.....2 g

Iode.....1,27 g

Eau distillée.....qsp 100 ml

• **Liquor de Fihling :**

Solution A

• sulfate de cuivre.....40 g

• Eau distillée100 ml

1.2. Solution B

• tartrate de sodium et de potassium200g

• hydroxyde de sodium150g

• Eau.....100 ml

Mélanger lentement, en agitant doucement, les deux solutions (A et B) avec un volume égale (v /v).

Annexes

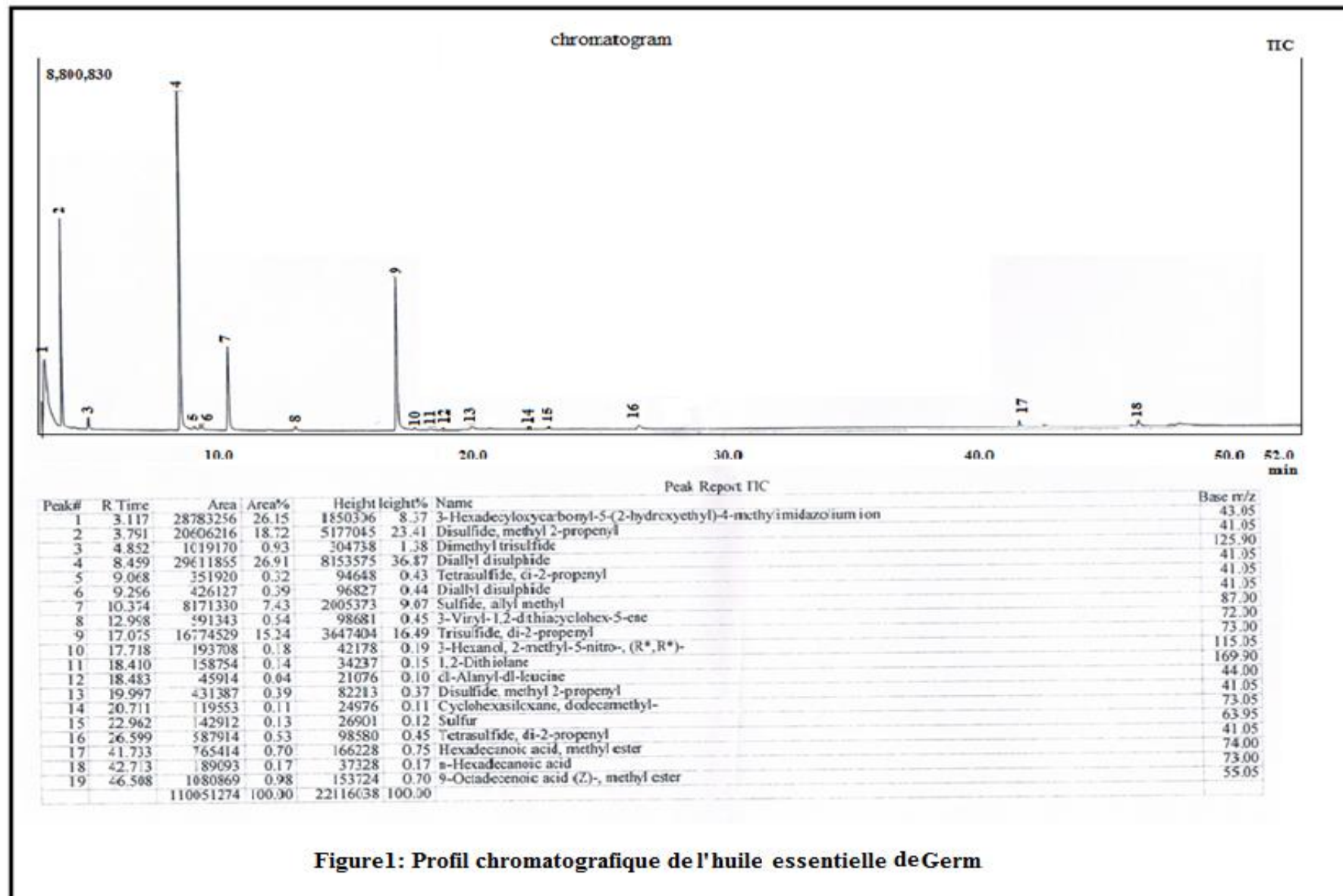
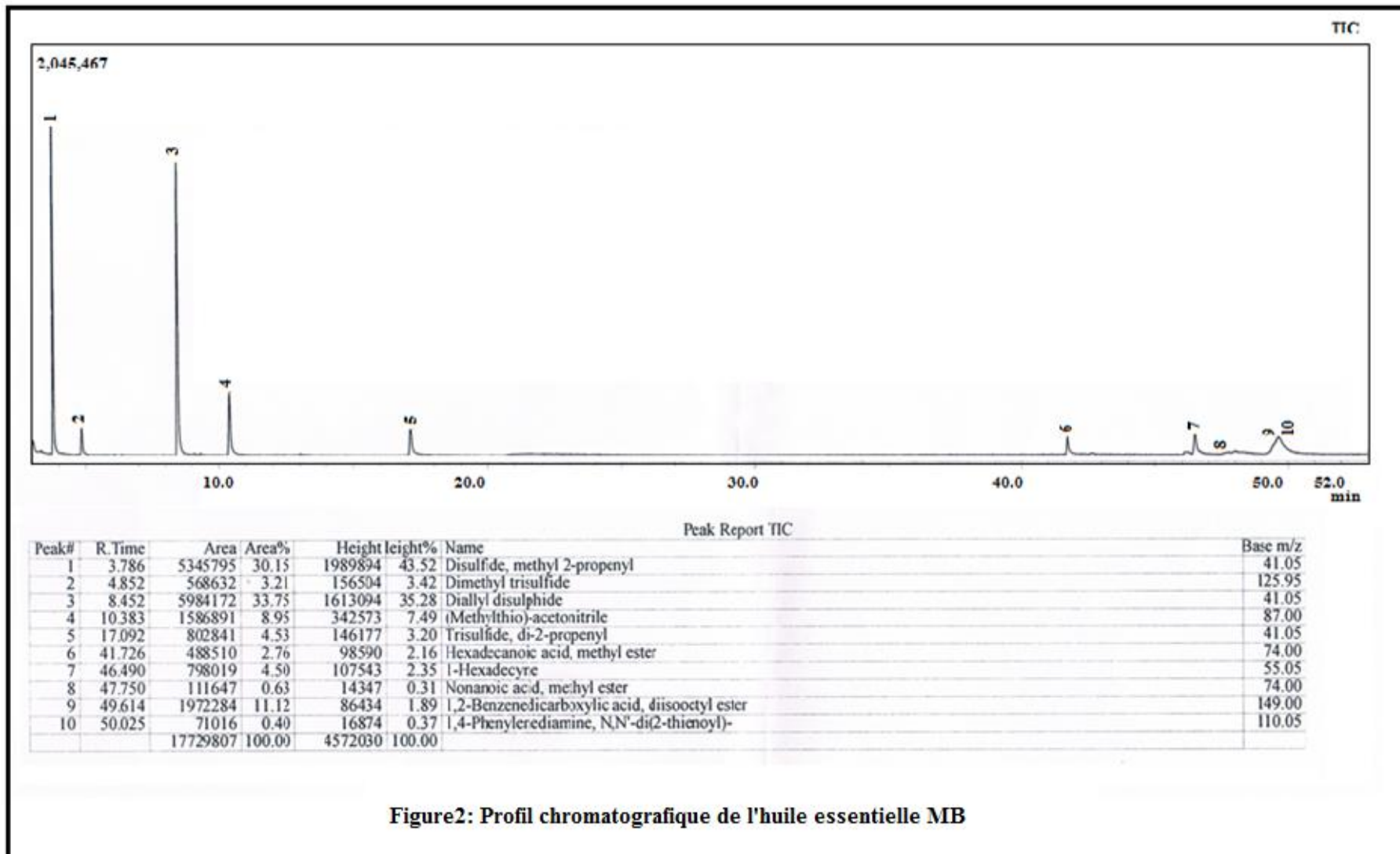


Figure1: Profil chromatographique de l'huile essentielle de Germ

Annexes



Annexes

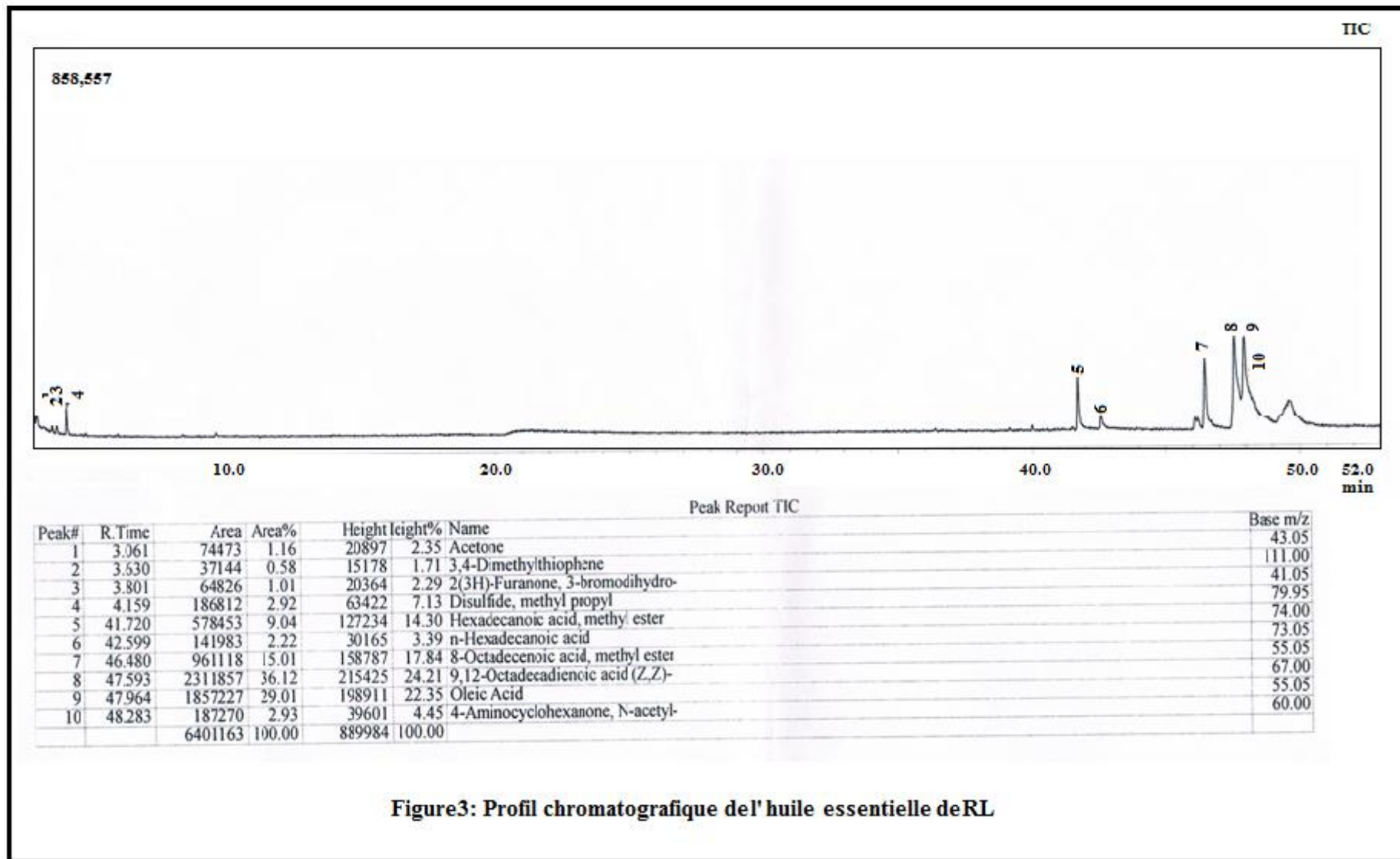


Figure3: Profil chromatographique de l'huile essentielle de RL

Annexes

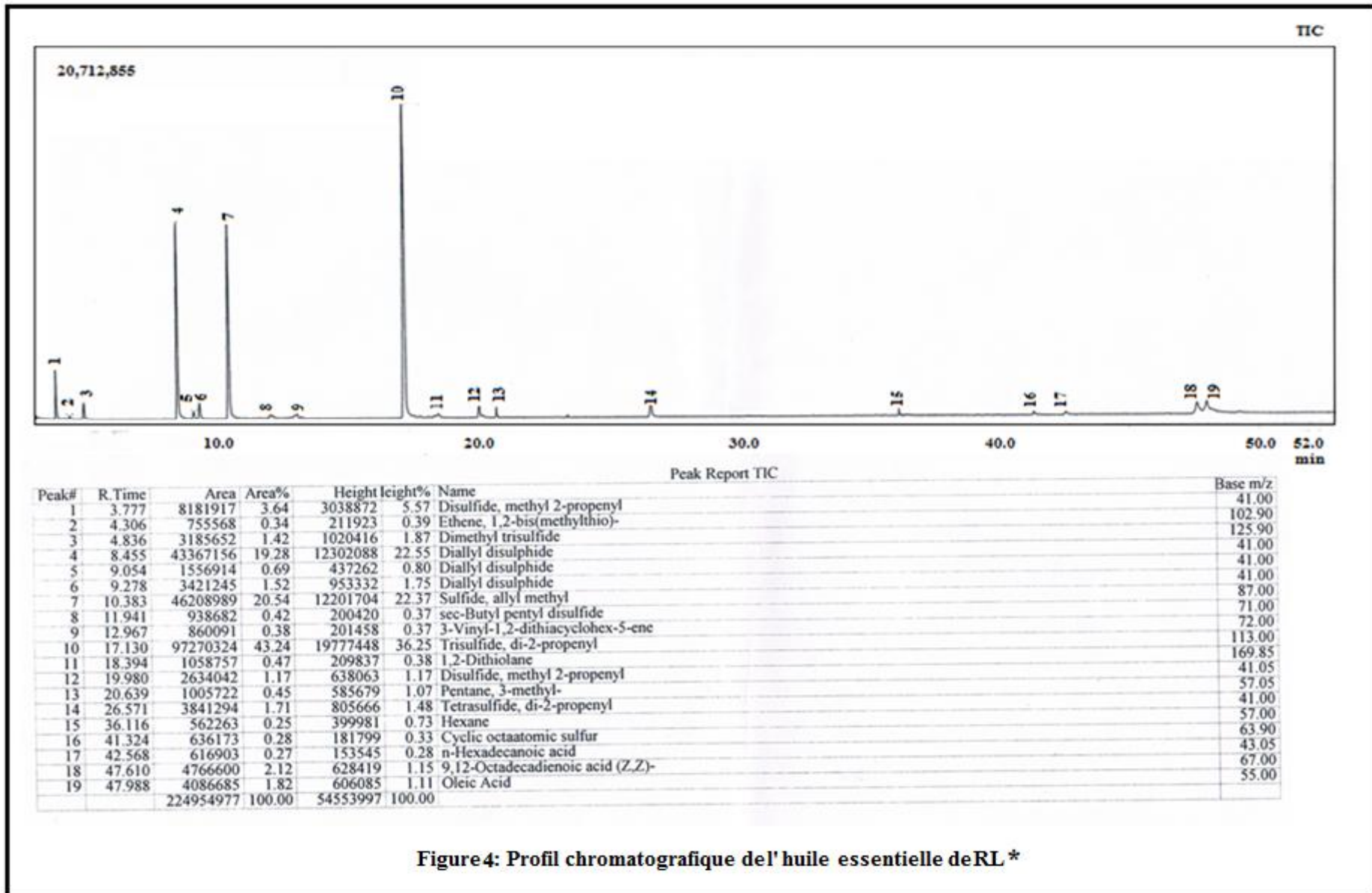


Figure4: Profil chromatographique de l'huile essentielle de RL *

Annexes

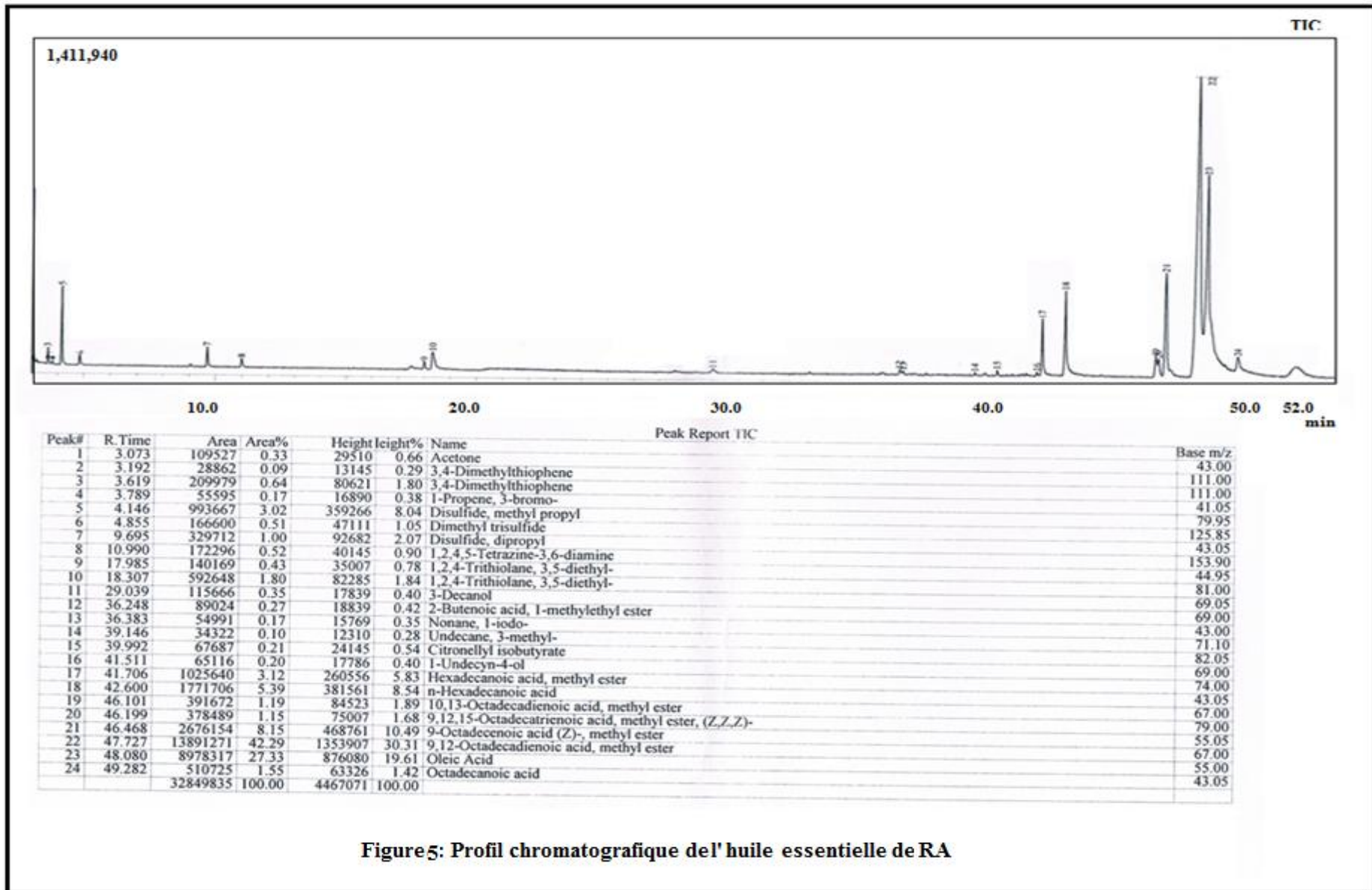


Figure 5: Profil chromatographique de l'huile essentielle de RA

Annexes

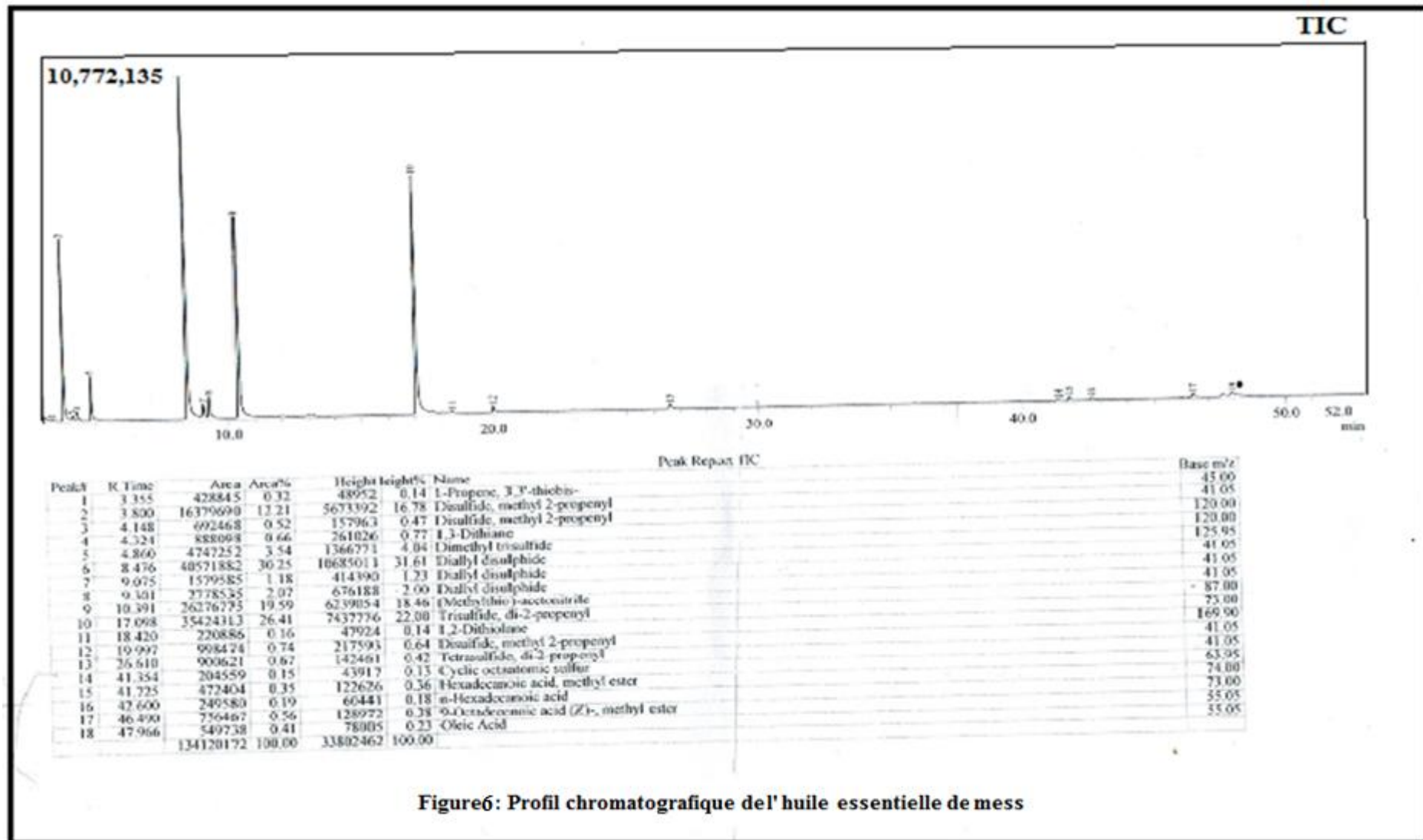


Figure6: Profil chromatographique de l'huile essentielle de mess

Annexes

Annexe 4 : produits utilisés pour l'évaluation de l'activité anti bactérienne

- **Composition des principaux Milieux de culture utilisés**

- ✓ **Milieux liquides**

Eau physiologique stérile Composition en g/l.

Chlorure de sodium (NaCL).....0,9g
Eau distillée..... 100ml.

Bouillon nutritive (BN) Composition en g/l:

Bouillon nutritive poudre.....12g
Eau distillée.....600ml
PH=7.2 Stérilisation à 121°C/15min

- ✓ **Milieux solides**

Gélose Muller Hinton (MH) Composition en g/l Gélose Mueller Hinton

poudre.....38g Eau
distillée.....1 L
PH =7.3
Stérilisation à 121°C/15min.

- **Tableaux de zones d'inhibitions :**

- ✓ **Zones d'inhibitions des variétés d'ail**

E.coli

Répétition	R1	R2	R3	M
Variétés				
RL*	10,2	10	10,3	10,67
MB	9,1	9,2	9	9,1
Mess	7	7, 1	7	7 ,033
Germ	8	8,1	8,1	8,07

Annexes

K .Pneumoniae

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL*	8	8	8,1	8,033
MB	81	8	8	8,033
Mess	0	0	0	0
Germ	10,2	10,1	10,3	10,2

S.aureus

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL*	7	7	7	7
MB	7	7	7	7
Mess	0	0	0	0
Germ	8	8,1	8,2	8,1

P.aeruginosa

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL*	9	9,2	9,3	9,17
Mess	0	0	0	0
MB	7,2	7	7	7,67
Germ	0	0	0	0

Annexes

✓ Zone d'inhibitions des HEs des variétés d'oignon

E.Coli

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	0	0	0	0
JE	0	0	0	0
RA	0	0	0	0

S.aureus

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	0	0	0	0
JE	8	8.1	8.2	8.1
RA	9.2	9.1	9.1	9.13

K .Pneumoniae

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	0	0	0	0
JE	0	0	0	0
RA	0	0	0	0

P.aeruginosa

Répétition Variétés	R1	R2	R3	M
RL	0	0	0	0
JE	0	0	0	0
RA	0	0	0	0

Annexes

- programme des calculs statistiques SPSS 21





University Mohammed Premier



JMES

Journal of Materials & Environmental Science



Vol. 1 N° 2
ISSN 2028 - 2508



Phytochemical and physicochemical characterization of *Allium sativum* L. and *Allium cepa* L. Essential oils

S. Boukeria^{*1}, K. Kadi³, R. Kalleb¹, A. Benbott⁴, D. Bendjedou², A. Yahia¹

¹Laboratory of natural sciences and materials, Mila University centre, Algeria

²Laboratoire de biologie, water and the Environment Department of Biology, University 08 May, 1945 Guelma, Algeria

³Institute of Biology, University of Khenchla, Algeria

⁴Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Larbi Ben M'hidi University, OEB, Algeria

Received 09 Sep 2015, Revised 12 Feb 2016, Accepted 29 Mar 2016

*Corresponding author. E-mail: boukeriasabah@gmail.com (S. Boukeria); Phone: +213773345521

Abstract

This study aims to investigate, the phytochemical and physicochemical characterization of the essential oils of *Allium sativum* and *Allium cepa* varieties. The varieties used for the study were graciously provided by the Technical Institute of Horticultural and Industrial Crops (ITCMI), Bir Rogaa Experimental Station, OEB (Algeria). The extraction of essential oils by steam distillation from bulbs gave high yields compared to what is reported in the literature. Red Local varieties of both species showed the highest yield with 0.72 % \pm 0,015 for garlic and 0.64% \pm 0,032 for onion. Organoleptic and physico-chemical characteristics observed comply with AFNOR's standards. The results of phytochemical screening showed the presence of some chemical groups in one species and their absence in the other species. This was the case of the presence of saponins, alkaloids and glycosides traces in *A. sativum*, and the presence of tannins, glycosides, sterols, triterpene alkaloids and flavonoids in *A. cepa*.

Keywords: *Allium cepa*, *Allium sativum*, phytochemical screening, essential oils, physico-chemical properties

1. Introduction

Medicinal plants are sources of many active chemical compounds such as alkaloids, flavonoids, polyphenols, triterpenes, saponins, sterols, tannins, and essential oils known for their therapeutic properties. These metabolites are synthesized substances having different therapeutic properties exploited in the treatment of various diseases [1]. Plant essential oils are generally of quite complex composition containing volatile principles more or less modified during preparation [2]. They volatilize at room temperature when exposed to air [3], they are rarely colored, having a density generally lower than that of water. They have a high refractive index, are soluble in common organic solvents, in fats, in water and are easily drivable in water vapor [2].

Onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.), are herbaceous monocots of, the *Amaryllidaceae* family, characterized by a bulb at the base of the leaves [4]. They are among the oldest cultivated plants, used as food and in the treatment of many diseases. They have beneficial actions on cardiovascular system and on cancer [5, 6, 7]. *A. sativum* and *A. cepa* possess a large number of varieties varying in sizes, colors, flavors, and a diversified chemical composition rendering them very useful in many aspects. This research aimed to investigate the phytochemical and physicochemical characterization of the essential oils of four varieties of *A. sativum* and three varieties of *A. cepa* species.

2. Experimental

2.1. Biological material

Four garlic bulbs (*Allium sativum* L.), varieties: Messidrom, Germidour, Mocpta Bulgare and Red local and three onion bulbs (*Allium cepa* L.) varieties: Yellow of Spain, Red local and Red Amposta, were graciously provided by the Technical Institute of Horticultural and Industrial Crops (ITCMI), Bir Rogaa Experimental Station, Oum El Bouaghi, Algeria, (25°51' N, 5°49' E, 950 masl). This Institution had national mandate to preserve the purity all garlic and onion varieties (PGRFA: Plant Genetic Resources for Food and Agriculture 2006). The characteristics of the varieties used as plant material are given in Table 1

Table 1: Characteristics of the seven varieties tested.

<i>Species</i>	<i>Variety name</i>	<i>Origin</i>	<i>Earliness</i>	<i>Bulb</i>
<i>A. sativum</i>	Messidrome	White of Drôme	Early	Large bulb cream Caïeu
	Germidour	Purple of Cadours	Very early planting autumn	Large bulb brown Caïeu
	Mocpta Bulgare	-	Medium late	Regular bulb (13 Caïeu)
	Rouge Locale	-	Medium late	Regular bulb (14 caïeu)
<i>A. cepa</i>	Red Amposta	Algeria, Morocco	Early	Large bulb, purplish, transverse narrow, elliptic
	Yellow Spain	West Africa, Benin	Early	Large bulb, yellowish, transverse narrow, elliptic
	Local Red	Algeria	Early	Medium bulb, red brownish, transverse Medium, elliptic

2.2. Phytochemicals screening

Bulbs were used as plant material, ground with a manual grinder and weighted with an electric balance. Chemical analyses were performed in the laboratory of the Mila University Center. The different chemical groups were characterized according to procedures described in Mangambo *et al.*, [1]; Dohou *et al.*, [8]; Pange *et al.*, [9]; Trease and Evans [10] and Memelink *et al.*, [11]. The phytochemical characterization tests used are shown in table 2.

2.3. Extraction of essential oils

Essential oils have been obtained by the method of steam distillation using a Clevenger type distiller for 2h30 min. After extraction, essential oils are recovered, and stored, at 4°C, in sealed opaque bottles.

Yield calculation

Essential oils yield was determined according to AFNOR [12] using the following formulae

$$Y(\%) = 100 \left(\frac{MHE}{MP} \right)$$

Y: Essential oil yield, in %, MHE: Extract recovered quantity, in grams and MP: Amount of plant material subjected to extraction in grams.

2.4. Analytical study of the essential oils

The different sensory characteristics: appearance, odor, taste and color, of garlic and onion essential oils were checked and noted. Acid index, specific gravity, Miscibility in ethanol and refractive index were also determined to apprehend the quality of the extracted essential oils. These tests were applied according to procedures outlined in AFNOR [12].

Table 2: Reagents used in the identification of the various secondary metabolites.

Secondary metabolites	Reagents	Indicator
Saponosides	Foam Index > 1cm	Appearance of a persistent foam
Flavonoïdes	- Isoamyl alcohol --Hydrochloric acid (HCl) - Magnesium shavings	Orange or purplish coloration cherry red
Alcaloïdes	- Mayer & Wagner - Hydrochloric acid HCl (10%) - Ammonium hydroxide (10%) - Di ethyl ether, HCl (2%) - Alcohol 60 °	Reddish brown color Turbidity Precipitate or orange color
Tannins	- Ethanol (50%) - Ferric chloride FeCl ₃ 2%	Black blue color
Sterols and tri-terpenes	- Acetic anhydride - Chloroform - Concentrated sulfuric acid	Purple ring turning to blue then to green
Glycosides (reducing sugars)	- Feeling Solution - Ethanol, distilled water - Sodium-potassium tartrate	Red brick color

2.4.1. Determination of physical index

- **Specific Gravity** [AFNOR 75-111.2000]

The density of the essential oil is the ratio of the mass of a certain volume of the essential oil and the mass of same volume of water taken at the same temperature. The measure the density of the E O was conducted by using a pycnometer and calculated from the following formulae

$$D_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : The mass in grams of the empty pycnometer, m_1 : The mass in grams of the pycnometer filled with distilled water and m_2 : The mass in grams of the pycnometer filled with oil

- **Refractive index** [AFNOR 75-112-2000]

The refractive index is the ratio between the sine of the angle of incidence of the light beam in the air and the sine of the refraction angle of the refracted ray in the considered environment. We have conducted the measurement of refractive index of the EO using a conventional refractometer of OPTECH brand. The refractive index is given by a direct reading on the refractometer; temperature set at 20 ° C.

- **Miscibility in ethanol** [AFNOR 75-101.2000]

In an Erlenmeyer flask containing 1 ml of EO, through fraction of 0.2 ml and using a buret of 20 ml we pour ethanol (70%) stirring after each addition. When a limpid solution is achieved we register directly the volume of alcohol added.

2.4.2. Determination of chemical indices

- **Acid index** [AFNOR -NFT-60-2000]

The acid index (I_a) is the number of milligrams of potassium hydroxide (KOH) necessary to neutralize the free acids contained in (01) gram of the EO. The acid index is determined by the following formulae

$$I_a (\%) = v.c. \frac{56,11}{m}$$

V: volume in ml of the KOH solution used for the titration, C: concentration in mol / L of the KOH solution and m: mass in g of the test sample

- **Ester index** [AFNOR NFT 75-104/1994]

The ester index is the number of milligrams of potassium hydroxide (KOH) necessary to neutralize the liberated acid by a hydrolysis operation of the esters in basic environment.

$$I_e = \frac{28.05}{m} (V_0 - V_1)$$

V_0 : Volume in ml of HCl solution (0.5N) in the blank test, V_1 : Volume in ml of the HCl solution (0.5 N) measured for the calculation of I_e , m: Mass in g of the test sample and I_e : Ester index value.

- Saponification index

The saponification index is the number of milligrams of potassium hydroxide (KOH) necessary to convert into soap the fatty acids and triglycerides with an (01) gram of fats. The principle is to titrate the excess of potassium hydroxide in solution by hydrochloric acid.

Saponification index is given by the following formulae

$$I_s = \frac{N.(V_0 - V)}{W} \text{ (mg KOH/gEO)}$$

V_0 : Volume in ml of the hydrochloric acid solution to the blank test, V: volume in ml of the hydrochloric acid solution used for the testing sample, N: exact normality of the hydrochloric acid solution and W: weight grams of the testing sample

- Peroxide index:

The peroxide value is the number of milliequivalents of oxygen per kilogram of fat and oxidant potassium iodide, with liberation of iodine .The principle is based on the treatment of a test sample in solution in acetic acid and chloroform, by a potassium iodide solution, then the titration of iodine with a standard solution of sodium thiosulfate.

The peroxide index is given by the following formulae

$$I_p = \frac{V_0 - V}{P} \times 10 (\text{m} \acute{e} \text{q. } o_2 / \text{KgEO})$$

V: volume of sodium thiosulfate solution used for the test, V0: volume of sodium thiosulfate solution used for the blank test and P: portion tested (test sample) in grams

3. Results and discussion

3.1. Results

3.1.1. Phytochemical screening:

Results of the phytochemical characterization of the seven varieties tested are presented in table 3.

Table 3: Results of the phytochemical analysis of garlic and onion varieties.

Metabolites	Garlic				Onion		
	Messidrom	Germidour	Mupcta Bulguar	Red local	Red local	Yellow Spain	Red Amposta
Saponosides	+	+	+	+	-	-	-
Tannins	-	-	-	-	+	±	+
Glycosides	-	-	-	+	±	±	+
Flavonoïdes	-	-	-	-	+	+	+
Alcaloïdes	+	+	+	+	+	+	+
Sterols and triterpenes	-	-	-	-	+	+	+

(+): presence, (-): absence, (±): trace.

3.1.2. Essential oil yield

Average oil yields, based on 1000g of fresh plant material treated were 0.46% ± 0.026, 0.72 % ± 0.015, 0.61 % ± 0.01 and 0.51% ± 0.01for Messidrom, Local Red, Germidour and Mocpta Bulguar garlic varieties, respectively ;

and $0.64\% \pm 0.032$, $0.40\% \pm 0.015$ and $0.52\% \pm 0.01$ for local Red onion , Yellow Spain, Red Amposta onion varieties, respectively.

3.1.3. Analytical study of the essential oil

3.1.3.1 Organoleptic characteristics of essential oils extracted

A part from spicy flavor and liquid mobile appearance of the essential oils which are the same in both species, color is different from one variety to the other whereas odor is different from one species to another (table 4).

Table 4: Organoleptic characteristics of essential oils extracted

Varieties	Color	Odor
Garlic local Red	Yellow very pale	Strong, unpleasant ,Alliaceous
Garlic Messidrom	Yellow edge (Brownish)	Strong, unpleasant ,Alliaceous
Garlic Germidour	Yellow edge (Brownish)	Strong, unpleasant ,Alliaceous
Garlic Mocpta Bulgare	Yellow edge (dark)	Strong, unpleasant, Alliaceous
Onion Local Red	Yellow edge degraded clear	Strong,unpleasant, sulfur odor
Onion Yellow Spain	Yellow edge degraded clear	Strong, unpleasant, sulfur odor
Onion Red Amposta	Pale Yellow	Strong, unpleasant, sulfur odor

3.1.3.2 Analytical study of the essential oil

The main physicochemical characteristics of garlic and onion varieties essential oil are summarized in table 5. The results of the physicochemical analyzes indicated that the characteristics of essential oils were in the range of the AFNOR standards.Except Messidrom variety wich had a high acid index value compared to other varieties.

Table 5: Physical and chemical characteristics of garlic and onion varieties essential oil

Parameters	Garlic varieties				Onion varieties		
	LRD*	GER	MES	MOB	YSP	RAM	LRD
Acid index	6.63	6.78	10.35	7.68	5.13	4.18	8.28
Ester index	86.24	86.21	94.96	113.55	125.98	103.25	137.01
Saponification index	92.87	92.99	105.31	121.23	131.11	107.43	145.29
Peroxide index	7.97	7.13	7.13	7.15	7.12	7.11	7.14
Refractive index	1.4650	1.4640	1.4691	1.4640	1.4691	1.4651	1.4700
Specific Gravity: at 20°C	1.026	1.025	1.028	1.029	1.028	1.029	1.030
Miscibility in Ethanol 70 °	2.75	2.75	2.75	3.0	3.0	3.0	2.95

*LRD = Local red, GER = Germidor, MES = Messidrom, MOB= Mocpta Bulgar, YSP= Yellow Spain, RAM= Red Amposta, LRD= Local red.

3.2. Discussion

Results of phytochemical analyzes are consistent with those of Manganbu *et al.*[1] and Chitra Shenoy *et al.*[13]. The tests used show the presence of alkaloids in all varieties studied. However, tannins, flavonoids, sterols and triterpenes , are present in onion varieties and absent in garlic varieties. For saponins, the test is positive for garlic varieties. According to the results of the tests, glycosides (reducing sugars) content differs from one variety to another we notice an important presence in two varieties one for garlic (*LRD) and another for onion (RAM); however there had been a weak presence in the other two varieties of onion (LRD) and (YSP). Essential oils yield differs significantly between varieties of both species, being high in Red local variety of each species, and low in Yellow Spain onion variety and Messidrom garlic variety. Oil yields found in the present study are higher

compared to those reported in the literature. Richard [14] and Block [15] mentioned that, in onion, traces of volatile oils are found: the simple distillation of 5000g of onion is needed to obtain 233g (0.005%) of essential oil. By vacuum distillation of onion bulbs, essential oil yield found by Burdock and Fenaroli [16] and Block [15] varied from 0.005% to 0.02%, while Fabrice [17] obtained a low yield of 0.04% through simple distillation of onion bulbs. According to Amagase *et al.* [18], garlic contains approximately 0.1% to 0.3% volatile oil, in some cases up to 0.2- 0.5%, while Haciseferogullari *et al.* [19] found a yield of 0.14%. The results obtained by Emad Shalaby *et al.* [20] were as the following of (0.073% \pm 0.1) for *Allium sativum* and (0.59% \pm 0.0) for *Allium cepa*. We can say that variation observed in essential oils yield, between varieties of each species, may be explained by the differences in genetic background of the targeted plant and/or to the extraction protocol followed during the experiment.

Aberchane *et al.* [21] and Bourkhiss *et al.*[22] mentioned that many factors may influence yield, content, physicochemical characteristics and chemical composition of essential oils, Among these factors the species, environmental conditions, plant organ used, drying method, extraction technique, period of harvest, cultural practices and growth age of the plant material.

The results of the physicochemical tests of the essential oils are consistent with those of AFNOR standards. Specific gravity is a characteristic used in the classification of essential oils. Specific gravity of the oil is defined as the mass ratio of a volume of oil to that of an equal volume of distilled water, both held at 20 °C [12]. Measuring the Specific gravity of different essential oils showed a higher density than water allowing them to be below the water during extraction.

The acid index gives an idea about the content of free acids. Our results obtained of this index appear according to AFNOR standards, but it's somehow higher; this can be explained by the degradation of the essential oils by hydrolysis of the esters during their storage, in contrast to an acid number less than 2 which indicates proper preservation of these oils weak quantity of free acid [23].

The refractive index depends on the chemical composition of the sample and varies essentially with the oxygenates content and monoterpenes, of which a high level of the latter gives a high index. According to Caree [24], a low refractive index of essential oils indicates low refraction of light which could promote their use in cosmetic products. Refractive index and miscibility with ethanol are in agreement with AFNOR's standards [12].

Conclusions

The extraction results revealed a low variation of the content and the chemical composition of the essential oils of the two species tested. The phytochemical study shows, however, considerable variation among varieties of both species. This variation is explained by difference in the genetic background of the plant material tested, rather than by differences in the extraction protocol and environmental conditions which are the same. Determination of physico-chemical properties is a necessary step to identify and obtain data on the composition and purity of essential oils. This study remains unfortunately insufficient for characterization of essential oils, which need to be completed by a qualitative analysis.

Acknowledgments The authors are thankful to the research laboratory team of the Mila University Centre, Algeria, and especially Dr. Nourddine Metatla and Salha Benaissaa the teacher of English for help their help.

References

1. Mangambu M.J de Dieu., Mushagalusak F., Kadima N.J., *J. Appl. Biosci.* 75 (2014) 6211.
2. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème Ed. Tec&Doc, Lavoisier, Paris, (1999).
3. Leung A.Y. Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics, Wiley-Interscience Pub., NY, (1980).
4. Fritsch R.M., Friesen N. Evaluation, domestication and taxonomy. IN: Rabinowitch D., Currahl., *Allium crop science: Recent Advance.* Wallingford, CAB International, (2002) 5.
5. Virginia L., *J. chromatography A.* 1112 (2006) 3.
6. Sanjay K.B., subir K.M., *Nutr. J.*, 1 (2002) 1-14.

7. Sampath Kumar K.P., Debjit B., Chiranjib, Biswajit, *J. Chem. Pharm. Res.* 2 (2010) 21.
8. Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N., *bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142 (2003) 61.
9. Penge A.O., Mwelo J.N., Mbenza A.P., Tshilumbu P.K., Ngombe N.K., Kalenda N.T., Duki A.M, *Annales de Pharmacie*, 3 (2005) 153.
10. Trease E., Evans W.C. *Pharmacognosy*. Billiare.Tindall., London, (1987) 61.
11. Memelink J., Verpoort R., Kijne J.W. Organisation of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism, *Trends plant sci* 6 (2001) 212-219.
12. AFNOR, Association Française de Normalisation, *Huiles essentielles*, T2, Monographie relatives aux huiles. 6^{ème} édition, Paris, (2000).
13. Chitra Shenoy, Patil M.B., Ravikumar. Swati P., *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2. Issue 2. (2009) 167-175.
14. Richard H. *Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse*, L'harmattan, (2005).
15. Block E. The organ sulfur chemistry of the genus *Allium*. Implication for the organic chemistry of sulphur. *Angew. Chem. Int, Engl*, (1992).
16. Burdock G.A., Fenaroli S., *Handbook of flavor Ingredients*, CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C. (1995).
17. Fabrice B., *Les huiles essentielles-Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale*; Fernand Lanore ; ISBN : 978-2-85157-566
18. Amagase H., Petesch B.L., Matsuura H., Kasuga S., Itakura Y., *J. Nutr.* 131 (2001) 955s.
19. Haciseferogullari H., Ozcan M., Demir F., Calisir S., *J. Food Eng.* 68 (2005) 463.
20. Emad A. Shalaby, Nasr N.F., Samia M. El Sherief., *J. Medicinal Plants Res.* 5 (2011) 922.
21. Aberchane M., Fechtal M., Chaouche A., Bouayoune T., *Annales de la recherche forestière au Maroc* 34 (2001) 110.
22. Bourkhiss M., Hnach M., Lakhilifi T., Boughdad A., Farah A., Satrani B., *Les Technologies de Laboratoire*, 6 (2011) 64.
23. Kanko C., Sawaliho B.E., Kone S., Koukoua G., N'guessant Y.T., *Comptes rendus Chimie* 7 (2004) 1039.
24. Caree P. *Précis de technologie et de chimie industrielle*. T3, Ballière JB. et fils, (1953).

(2016) ; <http://www.jmaterenvironsci.com>