

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**

**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**  
**Département de Biochimie-Microbiologie**



## **Mémoire de fin d'étude**

**En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie**  
**Option : Biochimie Appliquée**

### *Thème*

**Comparaison biochimique des différents extraits  
d'ail « frais, congelé et séché » et évaluation de  
l'activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais**

**Réalisé par :**

**DOUADI Kamélia**

**REKEB Tinhinane**

**Membres de jury :**

**Présidente : M<sup>me</sup> SI AHMED Saliha Maitre de conférences classe A UMMTO**

**Promotrice : M<sup>me</sup> BEDOUHENE Samia Maitre de conférences classe B UMMTO**

**Co-promotrice : M<sup>me</sup> SENANI Nassima Maitre de conférences classe B UMMTO**

**Examinatrice : M<sup>me</sup> SENOUSI Chahra Maitre assistante classe A UMMTO**

**Année : 2020-2021**

## **Remerciements**

*Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.*

*Nous exprimons notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à Madame **BEDOUHENE Samia** Maitre de conférences classe B à l'UMMTO qui nous a honoré en acceptant de diriger ce travail et d'avoir cru en nous dès le début, pour sa grande disponibilité à toute épreuve, sa simplicité, ses pertinents conseils, sa patience et pour les efforts qu'elle a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Nous ne pouvons que sincèrement vous exprimer nos profonds respects et notre gratitude. Nous avons beaucoup appris à vos côtés. Merci de nous avoir fait découvrir les plaisirs du travail rigoureux.*

*Nos remerciements les plus sincères vont également à Madame **SENANI Nassima** Maitre de conférences classe B à l'UMMTO pour sa contribution dans l'élaboration de ce travail, ses conseils, ses orientations, pour son aide si précieuse et son soutien bienveillant ainsi qu'à ses qualités relationnelles et humaines.*

*Nous remercions aussi les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'évaluer et de juger ce travail, tout particulièrement Madame **SI AHMED Saliha** Maitre de conférences classe A à l'UMMTO en qualité de présidente, ainsi qu'à Madame **SENOUSSI Chahra** Maitre assistante classe A à l'UMMTO examinatrice du jury.*

*Nos plus sincères remerciements vont également au professeur monsieur **MATI Abderrahmane** et au professeur monsieur **HOUALI Karim** pour toutes les conditions de travail et le matériel qu'ils ont pu nous conférer afin de réaliser notre travail, ainsi qu'à madame **ALMI Dalila** pour les conseils techniques prodigués au cours de notre stage au laboratoire.*

*Nous remercions tous les profs qui nous ont enseigné depuis le premier palier jusqu'à ce niveau.*

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous les techniciens du laboratoire de biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) et des laboratoires de biochimie de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.*

*Merci à nos familles qui nous ont soutenu et aidé à surmonter toute difficulté en particulier nos chers parents pour leur amour inestimable, leur confiance, leurs sacrifices, nos chères frères et sœurs.*

*Un grand merci à mon mari Adel (Kamélia).*

# *Sommaire*

## *Sommaire*

### **RESUME**

### **LISTE DES ABREVIATIONS**

### **LISTE DES FIGURES**

### **LISTE DES TABLEAUX**

### **INTRODUCTION..... 1**

### **PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **Chapitre I : L'ail « *Allium sativum* »**

##### 1.1. Généralités ..... 2

##### 1.2. Dénomination de l'ail..... 2

##### 1.3. Description et classification botanique de l'ail..... 2

##### 1.4. Origine géographique de l'ail..... 4

##### 1.5. Situation économique de l'ail ..... 4

##### 1.6. Composition biochimique de l'ail..... 4

##### 1.7. Composés bioactifs de l'ail..... 5

##### 1.7.1. Composés soufrés..... 5

##### 1.7.2. Composés phénoliques..... 6

##### 1.7.3. Peroxydase et catalase..... 7

##### 1.8. Activités biologiques de l'ail..... 8

##### 1.8.1. Activité antioxydante..... 8

##### 1.8.2. Activité anti hémolytique..... 8

##### 1.8.3. Activité anti-inflammatoire..... 8

##### 1.8.4. Activité antibactérienne..... 9

##### 1.8.5. Activité anticancéreuse ..... 9

##### 1.8.6. Effets de l'ail sur les maladies cardiovasculaires..... 9

#### **Chapitre II : La peroxydase**

##### 2.1. Classification..... 11

##### 2.2. Structure..... 11

##### 2.3. Définition..... 12

##### 2.4. Mécanisme réactionnel..... 13

2.5. Rôles et applications.....	13
---------------------------------	----

## **PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>15</b>
1.1. Matériel.....	15
1.1.1. Matériel végétal .....	15
1.1.2. Différents produits chimiques utilisés.....	15
1.1.3. Appareillage.....	15
1.2. Méthodes.....	15
1.2.1. Préparation des échantillons.....	15
1.2.2. Protocole d'extraction.....	16
1.2.3. Analyse quantitatives des composés biochimiques et bioactifs des extraits d'ail	18
1.2.3.1. Dosage des protéines totales.....	18
1.2.3.2. Dosage des sucres réducteurs .....	19
1.2.3.3. Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	20
1.2.3.4. Dosage des flavonoïdes.....	21
1.2.3.5. Dosage de la vitamine C .....	22
1.2.3.6. Dosage de l'activité enzymatique de la peroxydase.....	23
1.2.3.6.1. Cinétique enzymatique.....	23
1.2.3.6.2. Détermination de l'effet dose de la peroxydase et l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur l'activité enzymatique .....	24
1.2.4. Activités biologiques.....	25
1.2.4.1. Evaluation de l'effet d'extrait d'ail frais sur la viabilité des neutrophiles isolés ....	25
1.2.4.1.1. Isolement des polynucléaires neutrophiles humains.....	25
1.2.4.1.1. Effet de l'extrait d'ail frais sur la viabilité des neutrophiles isolés .....	27
1.2.4.2. Evaluation de l'activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais.....	27
1.2.4.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire.....	27
1.2.4.2.2. Activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais contre l'hémolyse induite par le stress osmotique.....	27
1.2.4.2.3. Activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais contre l'hémolyse induite par le stress oxydatif.....	28
1.2.5. Analyse statistique.....	29

## **2. Résultats et discussion**

2.1. Caractérisation biochimique des différents extraits d'ail.....	30
2.1.1. Teneur en protéine totales.....	30
2.1.2. Teneur en sucres réducteurs.....	31
2.2. Détermination de quelques molécules bioactives.....	33
2.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	33
2.2.2. Teneur en flavonoïdes.....	34
2.3. Détermination de la teneur en vitamine C dans les extraits d'ail.....	35
2.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la peroxydase.....	37
2.4.1. Cinétique enzymatique.....	37
2.4.2. Effet dose de l'extrait frais sur l'activité de la peroxydase.....	40
2.4.3. Effet dose de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur l'activité de la peroxydase.....	40
2.5. Activités biologiques.....	41
2.5.1. Evaluation de l'effet d'extrait d'ail frais sur la viabilité des neutrophiles isolés.....	41
2.5.2. Evaluation de l'activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais.....	42
2.5.2.1. Activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais contre l'hémolyse induite par le stress osmotique.....	43
2.5.2.1.1. Observations à l'œil nu.....	43
2.5.2.1.2. Dosage spectrophotométrique de la fuite de l'hémoglobine et le pourcentage de protection.....	44
2.5.2.1.3. Observations microscopiques des érythrocytes.....	44
2.5.2.2. Activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais contre l'hémolyse induite par le stress oxydatif.....	45
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>51</b>
<b>ANNEXES</b>	

## Résumé

L'ail « *Allium sativum* » est une plante largement utilisée par toutes les populations soit comme légume à des fins culinaires, soit comme plante médicinale. C'est une excellente source de substances bioactives, tels que les antioxydants responsables de diverses activités biologiques.

Le but de ce travail est d'évaluer l'effet de deux méthodes de conservation couramment utilisées, la congélation et le séchage, sur les substances biochimiques et bioactives de l'ail, et sur l'activité de la peroxydase, puis l'activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais.

L'étude a été réalisée sur des gousses d'ail soumises à une congélation à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  et un séchage dans une étuve à  $40\text{-}45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Les résultats de dosage spectrophotométrique des protéines, des sucres réducteurs, des polyphénols totaux, des flavonoïdes et de la vitamine C de l'extrait d'ail frais sont respectivement  $2,58\pm 0,11\text{g}/100\text{g}$  de matière végétale (MV),  $1,14\pm 0,04\text{g}/100\text{g}$  de MV,  $94\pm 3,33\text{mg EAG}/100\text{g}$  de MV,  $7,21\pm 0,28\text{mg EQ}/100\text{g}$  de MV et  $66,7\pm 1,93\text{mg}/100\text{g}$  de MV.

La congélation a montré une légère diminution des teneurs de ces composés, tandis que le séchage a induit une diminution importante, qui est de 59,6% des protéines, 72,61% des sucres réducteurs, 58,6% des polyphénols, 38,13% des flavonoïdes et 76,9% de vitamine C.

De même l'activité de la peroxydase persiste après congélation, mais très peu après le séchage (68% de perte). Cependant la congélation est une méthode potentielle pour la préservation de la majorité des substances biochimiques et bioactives de l'ail.

L'évaluation *in vitro* de l'activité anti hémolytique par la mise en contact des globules rouges humains avec l'extrait d'ail frais à différentes concentrations, indique que cet extrait exerce un effet protecteur majeur de 98,74 $\pm$ 1,09% sur la membrane érythrocytaire contre un stress osmotique provoqué par le NaCl à 0,2%, et une protection contre un stress oxydatif provoqué par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à de faibles concentrations et présente une  $\text{CI}_{50}$  avec 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , en raison de sa richesse en polyphénols, flavonoïdes ainsi qu'en composés soufrés qui contrôlent la morphologie de la cellule érythrocytaire et la protègent de l'hémolyse. Ce même extrait ne présente aucun effet cytotoxique sur les neutrophiles humains isolés pour toute la gamme de concentration testée.

La plante sélectionnée dans ce travail *Allium sativum*, en raison de sa non toxicité vis-à-vis des cellules, sa richesse en molécules anti oxydantes et son pouvoir anti hémolytique peut être utilisée à des fins thérapeutiques.

**Mots clés:** Ail, peroxydase, congélation, séchage, substances biochimiques, substances bioactives, activité anti hémolytique.

## Abstract

Garlic «*Allium sativum*» is a healthy and complete herb used either as a vegetable for culinary purposes or as a medicinal plant. It is an excellent source of bioactive substances, such as antioxidants responsible for various biological activities.

The aim of this study consisted in evaluating the effect of two preservation methods commonly used, freezing and drying, on the biochemical and bioactive substances of garlic and on the peroxidase activity, then the anti-hemolytic activity of fresh garlic extract.

The study was carried out on garlic cloves subjected to freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  and drying in an oven at  $40-45^{\circ}\text{C}$ . The results of spectrophotometric determination of proteins, reducing sugars, total polyphenols, flavonoids and vitamin C of fresh garlic extract are respectively  $2,58\pm 0,11\text{g}/100\text{g}$  of (vegetable matter) VM,  $1,14\pm 0,04\text{g}/100\text{g}$  of VM,  $94\pm 3,33\text{mg EAG}/100\text{g}$  of VM,  $7,21\pm 0,28\text{mg EQ}/100\text{g}$  of VM and  $66,7\pm 1,93\text{mg}/100\text{g}$  of VM.

Freezing showed a slight decrease in the contents of these compounds, while drying induced an important decrease which is 59,6% of proteins, 72,61% of reducing sugars, 58,6% of polyphenols, 38,13% of flavonoids and 76,9% of vitamin C.

Moreover, the peroxidase activity persisted after freezing, unlike drying (68% loss). Hence freezing is a potential method for preserving most of the biochemical and bioactive substances in garlic.

*In vitro* evaluation of anti-hemolytic activity by contacting human red blood cells with fresh garlic extract at different concentrations, indicated that this extract exerts a major protective effect of  $98,74\pm 1,09\%$  on the erythrocyte membrane against osmotic stress caused by 0,2% NaCl, and protection against oxidative stress caused by  $\text{H}_2\text{O}_2$  at low concentrations and presented an  $\text{IC}_{50}$  with  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ , due to its richness in polyphenols, flavonoids and sulfur compounds which control the morphology of erythrocyte cell and protect it from hemolysis. This same extract exhibited no cytotoxic effect on the isolated humans neutrophils for the whole range of concentration tested.

The plant selected in this study *Allium sativum* due to its non toxicity to cells, its richness in antioxidant molecules and its anti-hemolytic activity can be used for therapeutic purposes.

**Key words:** Garlic, peroxidase, freezing, drying, biochemical components, bioactive components, anti-hemolytic activity.

## *Liste des abréviations*

AMP <sub>c</sub>	Adenosine monophosphate cyclique.
BSA	Albumine sérique bovine.
COX-2	Cyclooxygénase-2.
CI <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice médiane.
DNS	Acide 3,5, Dinitrosalicylique.
DO	Densité Optique.
DTT	Dithiothréitol.
DSA	Direction des services agricoles.
EAG	Equivalent acide gallique.
EQ	Equivalent quercétine.
ERO	Espèce réactif d'oxygène.
EXT C	Extrait congelé.
EXT F	Extrait frais.
EXT S	Extrait séché.
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture ; Food and Agriculture Organisation.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène.
HRP	Peroxydase de raifort ; Horseradish peroxidase.
LABAB	Laboratoire de biochimie analytique et biotechnologie.
MV	Matière végétale.
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B.
PBS	Tampon phosphate salin ; phosphate buffer salin.
PCATs	Peroxydase-Catalase.
PCOXs	Peroxydases-cyclooxygénases.
PGE2	Prostaglandine E2.
pH	Potentiel Hydrogène.
PNs	Polynucléaires neutrophiles.
PPT	Polyphénols totaux.
TCA	Acide trichloracétique.
TLR4	Toll-like-4.
Tris	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane.

## *Liste des figures*

Figure	Titre	Page
Figure 1	Plante d'ail (DETHIER, 2010).	3
Figure 2	Structure de base d'un composé phénolique (CHEYNIER, 2005).	7
Figure 3	Structure de base des flavonoïdes (GHEDIRA, 2005).	7
Figure 4	Schéma récapitulatif des différentes activités d' <i>Allium sativum</i> .	10
Figure 5	Représentation tridimensionnelle de la structure cristalline de la peroxydase de raifort(VEITCH, 2004).	12
Figure 6	Schéma des différents rôles de la peroxydase végétale.	14
Figure 7	Diagramme récapitulatif des étapes d'extraction et des dosages réalisés.	17
Figure 8	Réaction chimique du Folin-Ciocalteu sur les protéines.	18
Figure 9	Courbe d'étalonnage d'albumine sérique bovine (BSA).	19
Figure 10	Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs.	19
Figure 11	Courbe d'étalonnage de glucose.	20
Figure 12	Réaction chimique du Folin Ciocalteu sur les polyphénols.	20
Figure 13	Courbe d'étalonnage d'acide gallique.	21
Figure 14	Réaction chimique du chlorure d'aluminium sur les flavonoïdes.	21
Figure 15	Courbe d'étalonnage de la Quercétine.	22
Figure 16	Réaction d'oxydation de la vitamine C.	22
Figure 17	Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.	23
Figure 18	Réaction chimique d'oxydation de l'Ortho-dianisidine.	24
Figure 19	Diagramme représentant les étapes d'isolement des neutrophiles.	26
Figure 20	Diagramme récapitulatif du test de l'activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais.	29
Figure 21	Teneur en protéines dans les différents extraits.	31
Figure 22	Teneur en sucres réducteurs dans les différents extraits.	32
Figure 23	Teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits.	33
Figure 24	Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits.	34
Figure 25	Teneur en vitamine C dans les différents extraits.	36
Figure 26	Réaction d'oxydation de l'orthodanisidine catalysée par les extraits d'ail.	38
Figure 27	Activité enzymatique de la peroxydase dans les différents extraits d'ail.	38
Figure 28	Effet dose de l'extrait d'ail frais sur l'activité de la peroxydase.	40
Figure 29	Effet dose de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sur l'activité de la peroxydase.	40
Figure 30	Observations microscopiques des neutrophiles traités par l'extrait d'ail frais au grossissement X10.	41
Figure 31	Effet de l'extrait d'ail frais sur la viabilité des PNs.	42
Figure 32	Processus d'hémolyse par libération de l'hémoglobine.	43
Figure 33	Taux de protection (%) des érythrocytes traités par le NaCl à 0,2% en présence de l'extrait d'ail frais.	44

Figure 34	Observations microscopiques des érythrocytes traités le NaCl à 0,2% en présence de l'extrait d'ail frais au grossissement X10.	45
Figure 35	Taux d'hémolyse (%) des érythrocytes traités par le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en présence de l'extrait d'ail frais.	46

### *Liste des tableaux*

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Classification botanique de l'espèce <i>Allium sativum</i> (BENZEGGOUTA,2005).	3
Tableau II	Composition biochimique de l'ail (LAWSON, 1996 ; SENNINGER, 2009 ; SELURIA et <i>al.</i> , 2015).	5
Tableau III	Liste et structure de certains composés soufrés de l'ail (BATIHA et <i>al.</i> ,2020).	6
Tableau IV	Tableau récapitulatif des résultats des différents dosages dans les différents extraits d'ail.	37
Tableau V	Activité de la peroxydase dans les différents extraits d'ail.	39

# ***Introduction***

Les antioxydants sont des substances capables d'éliminer et de contrôler le niveau des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ainsi, ils sont capables de retarder, prévenir ou réparer les dommages oxydatifs. En effet, une surproduction des espèces réactives de l'oxygène conduit à un stress oxydatif, qui peut être à l'origine de plusieurs pathologies.

Les antioxydants peuvent être d'origine exogènes et sont généralement apportés par l'alimentation ou d'origine endogène et sont synthétisés par l'organisme. Ces derniers sont de nature enzymatique ou non. L'action anti radicalaire de ces molécules se manifeste par la neutralisation des ERO et résulte d'une synergie entre les antioxydants endogènes et exogènes.

Les plantes médicinales utilisées depuis des siècles contre diverses maladies notamment celles liées au stress oxydatif, sont une des sources majoritaires des molécules antioxydantes. Dans ce contexte l'ail « *Allium sativum* » est une plante largement utilisée par toutes les populations, comme épice et en médecine traditionnelle en raison de ses nombreuses propriétés thérapeutiques dues à ses substances bioactives qu'il renferme.

Afin de pouvoir utiliser l'ail, ce précieux condiment toute l'année, sa conservation est plus qu'indispensable. Le séchage et la congélation sont des méthodes largement utilisées pour le stockage de l'ail, mais le choix de la meilleure méthode se penche vers celle qui permettrait de préserver les composés biochimiques et bioactifs de l'ail. La peroxydase, produite dans l'ail est une enzyme antioxydante qui joue un rôle important dans la neutralisation des ERO spécifiquement le peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme fait actuellement l'objet de plusieurs recherches dans l'ail mais aussi dans d'autres plantes et dans plusieurs contextes.

En plus de sa richesse en peroxydase et son pouvoir antioxydant plusieurs propriétés phytothérapeutiques et activités biologiques sont attribuées à l'ail, notamment l'activité anti tumorale, anti bactérienne, anti inflammatoire et anti hémolytique.

L'objectif de ce travail, était de déterminer en premier lieu l'effet des deux traitements physiques séchage et congélation sur la teneur des composés biochimiques et bioactifs de l'ail et sur l'activité de la peroxydase. Dans un second lieu nous avons évalué l'activité anti hémolytique vis-à-vis des globules rouges humains de l'extrait d'ail frais.

***PARTIE I :***  
***Synthèse***  
***bibliographique***

# Chapitre I:

*L'ail*

« *Allium sativum* »

### 1.1. Généralités

L'ail «*Allium sativum*» est considéré comme l'un des vingt légumes les plus importants, avec diverses utilisations dans le monde, soit comme légume cru à des fins culinaires comme épice pour son goût et son odeur caractéristiques, soit comme ingrédient de la médecine traditionnelle et moderne pour ses activités biologiques. En outre, il a également été proposé comme l'une des sources les plus riches de composés phénoliques totaux parmi les légumes habituellement consommés.

L'*Allium sativum* est disponible sous différentes formes sur le marché international, classées en 3 groupes principaux : l'ail frais, l'ail séché et les extraits d'ail.

### 1.2. Nomenclature de l'ail

Le nom botanique de l'ail cultivé ou l'ail commun en latin *Allium sativum*, «*Allium*» provient du celtique «Ail» qui signifie «brûlant», en raison des propriétés de la plante et de la saveur de son bulbe et «*sativum*» signifie «cultivé» (GIRRE, 1980).

Nom commun : Ail, ail cultivé, ail à tige tendre, thériaque des pauvres.

Nom en anglais : Garlic.

Nom en arabe : ثوم .

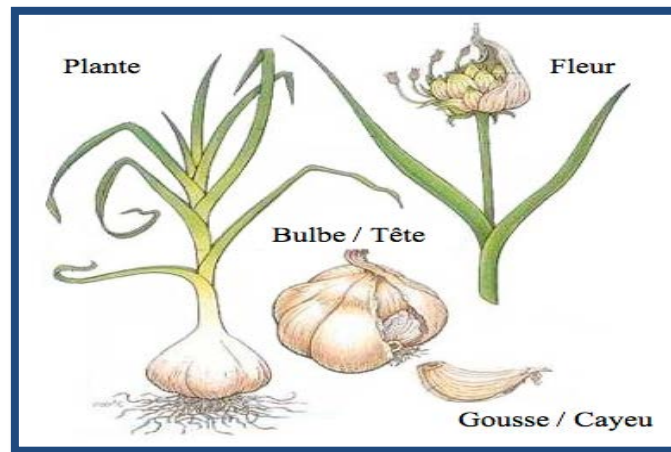
Nom en kabyle : Ticert.

### 1.3. Description et classification botanique de l'ail

C'est une espèce de plante potagère, vivace et monocotylédone (DETHIER, 2010). Le bulbe se prolonge à la surface en une tige pourvue de feuilles engainantes, linéaires, planes et lisses, porte une inflorescence en ombelle, composée de petites fleurs blanches ou rosées (Figure 1).

Le bulbe et les gousses sont entourés de pellicules très fines de couleur blanche ou rose à pourpre, ils ont une odeur et un goût fort (GERGES GEAGA, 2015). Il existe 700 variétés d'ail qui varient selon leur grosseur, leur saveur et leur couleur. La reproduction d'*Allium sativum* est strictement végétative à partir d'une gousse. L'ail s'adapte à tous les climats, mais, il donne les meilleures récoltes dans les pays tempérés (CAVAGNARO et al., 2007). Il ya 2 sous-espèces, qui se plantent à deux périodes différentes de l'année en automne et au printemps. Les deux sous-espèces sont respectivement appelées «ail d'automne» et «ail de printemps». Indépendamment de la couleur réelle du bulbe, l'ail dit blanc est généralement l'ail d'automne, l'ail rose est l'ail du printemps (DOUAOUYA, 2016).

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 (DUFRESNE et OUELLET, 2010). C'est une plante médicinale par excellence. Il est sans danger pour un usage domestique et se révèle efficace pour traiter une multitude de problèmes de santé (ISERIN, 2001).



**Figure 1 : Plante d'ail (DETHIER, 2010).**

L'ail appartient à l'ordre des Liliales, à la famille des Liliacées et au genre *Allium*. Le genre *Allium* est le plus répandu, avec 600-900 espèces. Il existe différentes variétés d'ail, *Allium sativum* qui se diffère par la taille, la forme du bulbe, ou encore par la couleur de l'enveloppe (GOETZ et GHEDIRA, 2012). La classification taxonomique d'*Allium sativum* est montrée dans le tableau I.

**Tableau I : Classification botanique de l'espèce *Allium sativum* (BENZEGGOUTA, 2005).**

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

#### 1.4. Origine géographique de l'ail

L'ail provient à l'origine d'Asie centrale (BERTHET, 2014). Les premières traces de l'utilisation de l'ail remontent à plus de 5000 ans, cela a été confirmé par des analyses phylogénétiques basées sur des marqueurs moléculaires et biochimiques, elles sont localisées au bord de la mer Caspienne, dans les plaines des pays qui la bordent à l'Est (Kazakhstan, Ouzbékistan actuels) (KRCMAR, 2008 ; SENNINGER, 2009). Il s'est répandu progressivement en Extrême-Orient, en Arabie, en Égypte et dans le Bassin méditerranéen. Il est transporté par les marchands au gré des routes commerciales. Il est aujourd'hui cultivé partout dans le monde (Anonyme 1).

#### 1.5. Situation économique de l'ail

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) la production de l'ail au niveau mondial est estimée à un peu plus de 28 millions de tonnes, dans le genre *Allium*, la consommation d'ail se trouve en deuxième position après l'oignon.

Sa production est très élevée en Asie. Ce continent arrive en première place avec 26 millions de tonnes d'ail produit en 2018. Suivi par l'Europe, l'Amérique, l'Afrique et pour finir par l'Océanie. L'Algérie occupe la 11<sup>ème</sup> place dans le monde et la 2<sup>ème</sup> place au niveau africain en terme de production d'ail.

Selon les estimations de 2018-2019 des statistiques horticoles de la Direction de Service Agricole (DSA), les wilayas potentielles en matière de production de l'ail sont Mila, Batna, Biskra, El Oued, Skikda, M'sila, Médéa, Tizi Ouzou, Boumerdes, Ouargla, Guelma, Constantine et Oum El Bouaghi.

#### 1.6. Composition biochimique de l'ail

Le bulbe d'ail renferme de nombreux composés bénéfiques pour la santé, la composition chimique varie en fonction de la variété cultivée, du lieu de culture, du moment de la récolte, et des conditions de stockage des bulbes. Cette variation peut être très importante (BRUNETON, 2009). Ceci permettrait d'expliquer les écarts de composition et de valeurs nutritionnelles rencontrés dans les différents ouvrages et publications.

Le bulbe d'ail contient en moyenne 60 à 65% d'eau (SULERIA et *al.*, 2015), 6% de protéines, 30% de glucides, 3% de fibres. L'ail est riche en éléments minéraux: P, K, S, Zn, Ca, Cu, Mg et en oligo-éléments comme le sélénium et le germanium. Cette plante renferme aussi des vitamines A, B1, B2, B3, B5, B6, B9, C et E (SENNINGER, 2009), et une faible proportion d'acides gras essentiels (MINKER, 2012) (Tableau II).

**Tableau II : Composition biochimique de l'ail (LAWSON, 1996 ; SENNINGER, 2009 ; SULERIA et al., 2015).**

Composés	Teneurs (%en poids frais)
Eau	60-65
Protéines	6
Glucides	30
Fibres	3
Vitamines	0,015
Minéraux	0,7

## 1.7. Composés bioactifs de l'ail

### 1.7.1. Composés soufrés

Les bulbes d'*Allium Sativum* contiennent des centaines de composés phytochimiques, y compris des composés soufrés qui sont principalement responsables des effets bénéfiques de l'ail pour la santé.

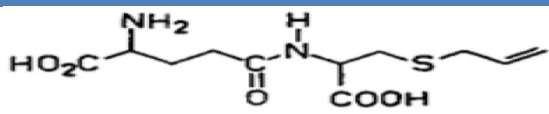
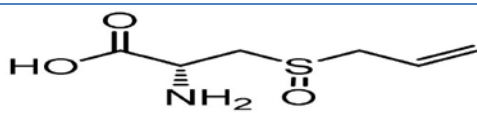
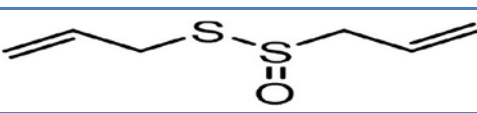
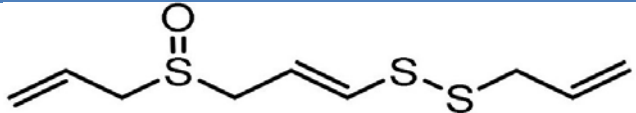
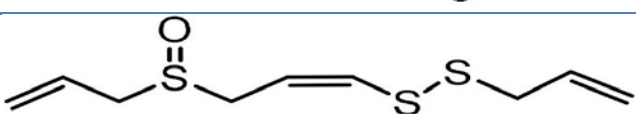
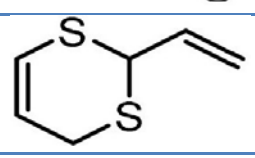
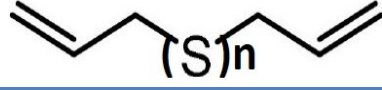
Les  $\gamma$ -glutamyl peptides majoritairement le  $\gamma$ -glutamyl-S-allylcystéine (SANTHOSHA et al., 2013) sert de source de réserves pour la formation des S allylcystéinesulfoxydes car ils entrent dans l'une de leur voie de synthèse (SENDL, 1995).

L'alliine, le principal sulfoxyde de cystéine, représente 24% du poids total du bulbe (XU et al., 2015) est transformée en allicine par l'action d'une enzyme nommée alliinase après avoir coupé l'ail et décomposé le parenchyme car les deux composés se trouvent dans des compartiments cellulaires différents (ZENG et al., 2017).

L'allicine connue aussi sous le nom de diallylthiosulfinate est considérée comme l'une des plus importantes molécules bioactive de l'ail. C'est un composé extrêmement instable, il se décompose rapidement en d'autres composés soufrés bioactifs tels que les ajoènes (E-ajoène, Z-ajoène), les vinyldithiines (2-vinyl- (4H) -1 , 3-dithiine, 3-vinyl- (4H) -1,2-dithiine) ou les sulfides(allyl-sulfides) (SENDL, 1995).

Les structures des différents composés sont représentées dans le tableau III.

Tableau III : Liste et structure de certains composés soufrés de l'ail (BATIHA *et al.*, 2020).

Composés	Formule moléculaire	Structure
$\gamma$ -glutamyl-S-allylcystéine	$C_{11}H_{18}N_2O_5S$	
Alliine	$C_6H_{11}NO_3S$	
Allicine	$C_6H_{10}OS_2$	
E-ajoène	$C_9H_{14}OS_3$	
Z-ajoène	$C_9H_{14}OS_3$	
2-vinyl- (4H) -1, 3-dithiine	$C_6H_8S_2$	
Les sulfides	$C_6H_{10}(S)_n$	

### 1.7.2. Composés phénoliques

Le terme composé phénolique ou polyphénols est utilisé indifféremment pour désigner tout produit du métabolisme secondaire des végétaux, Les composés phénoliques constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Ils possèdent au moins un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles libres, ou engagés dans une autre fonction tels que : éther, ester ou hétéroside (LUGASI *et al.*, 2003).

Selon le nombre d'unités phénoliques présent, ces composés sont classés en phénols simples, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignines et les xanthones (STALIKAS, 2007). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse molaire peut atteindre 9000 KDa (MONPON *et al.*, 2009). Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 9000 composés différents, se rencontrent à la fois sous forme libre, mais sont très souvent liés avec des sucres. Ils sont localisés dans divers organes (SAFFIDINE, 2015). Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques C6 reliés par une chaîne en C3, le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrane (MILANE, 2004).

Les polyphénols sont omniprésents dans le règne végétal. Cependant, ces composés peuvent considérablement varier tant qualitativement que quantitativement d'une plante à une autre (MANACH *et al.*, 2004). Cette variation est aussi due à plusieurs facteurs environnementaux, tels que la lumière, le climat et les variations saisonnières (ERDMAN *et al.*, 2007), les facteurs génétiques (AHERNE *et O'BRIEN*, 2002).

Les composés phénoliques sont associés à la couleur des fleurs, des fruits, des feuilles et à la qualité sensorielle des aliments. Jouent un rôle essentiel dans la structure et la protection des plantes et ils offrent également, pour la santé humaine, une protection contre plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (SUN *et al.*, 2011).

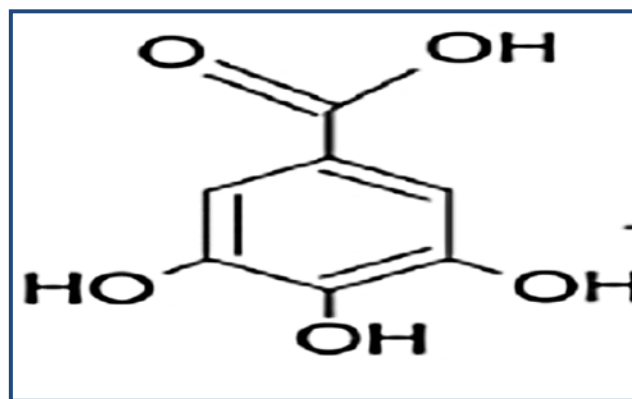


Figure 2 : Structure de base d'un composé phénolique (CHEYNIER, 2005).

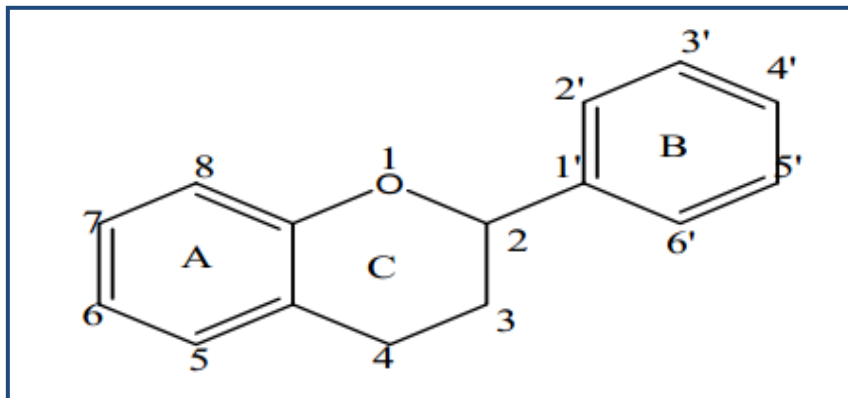


Figure 3 : Structure de base des flavonoïdes (GHEDIRA, 2005).

### 1.7.3. Peroxydase et catalase

Les gousses d'ail sont une importante source des enzymes antioxydantes (Catalase et peroxydase) utilisées dans plusieurs champs.

**La catalase** (E.C.1.11.16) Est une enzyme antioxydante importante qui joue un rôle dans la protection de la cellule contre le stress oxydatif. Elle catalyse efficacement la

décomposition du peroxyde d'hydrogène, qui est un sous-produit nocif de nombreux processus métaboliques, en d'autres substances moins dangereuses.

La peroxydase (EC 1.1.11.7) est largement distribuée dans les plantes (Voir chapitre 2).

## 1.8. Activités biologiques de l'ail

### 1.8.1. Activité antioxydante

La consommation fréquente d'ail augmente la synthèse antioxydante endogène et réduit la production d'oxydants tels que les ERO (ASDAQ et INAMDAR, 2011).

L'ail renferme plusieurs composés responsables de son pouvoir antioxydant. Les composés soufrés possèdent une activité de piégeage des radicaux élevée (JANG et *al.*, 2017), contrôlent la génération de ERO en inhibant la voie de leur production (CHUNG, 2006 ; CHEN et *al.*, 2016).

Les polyphénols peuvent agir également par le piégeage direct des ERO ou par l'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des ERO (LEE et *al.*, 2004 ; GHEDIRA, 2005).

### 1.8.2. Activité anti hémolytique

Les érythrocytes sont les cellules les plus abondantes dans le corps humain, possèdent des caractéristiques physiologiques et morphologiques souhaitables. Les dommages oxydatifs de la membrane érythrocytaire (lipides/protéines) peuvent être impliqués dans l'hémolyse (JAMS et *al.*, 2014).

La consommation d'extrait d'ail vieilli améliore significativement la déformabilité des érythrocytes chez le rat dans des conditions osmotiques élevées. Ce résultat suggère que cet extrait protège et augmente la stabilisation des membranes érythrocytaires, donc préserve la structure et la fonction des érythrocytes et améliore la microcirculation et les propriétés rhéologiques du sang. L'extrait d'ail vieilli peut être utile pour prévenir plusieurs maladies vasculaires périphériques telles que la drépanocytose, l'artériosclérose et l'hyperlipidémie (MORIGUCHI et *al.*, 2001). De plus l'extrait d'ail fournit la plus haute protection contre l'hémolyse due à la lyse des globules rouges induite par les radicaux (AZANTSA et *al.*, 2019).

### 1.8.3. Activité anti-inflammatoire

D'après certaines études les extraits d'ail et ses composés phytochimiques associés possèdent une activité anti-inflammatoire.

L'ail noir vieilli présente de puissantes activités antioxydantes qui peuvent être responsables de son activité anti-inflammatoire. Agit en réduisant l'activation du NF- $\kappa$ B ce qui empêche la production de cyclooxygénase-2 (COX-2) et de prostaglandine E2 (PGE2) (JEONG et *al.*, 2016). L'ail prévient aussi en bloquant l'activité NF- $\kappa$ B, la neuroinflammation et l'amyloïdogenèse, et peut donc être utilisée pour traiter les troubles neurodégénératifs (la maladie d'Alzheimer) liés à l'inflammation (JIN et *al.*, 2013).

L'activité anti-inflammatoire de l'ail est induite aussi par la diminution de l'expression des cytokines inflammatoires, et la génération des ERO (ABDEL-DAIM et *al.*, 2020), et par l'inhibition de la migration des granulocytes et neutrophiles dans l'épithélium (HOBBAUER et *al.*, 2000 ; GU et *al.*, 2013). Elle peut être attribuée à la suppression directe de l'activation de la cascade de signalisation du récepteur toll-like 4 (TLR4) dans les macrophages (YOU et *al.*, 2019). L'allicine inhibe la migration transendothéliale des neutrophiles (SELA et *al.*, 2004).

#### 1.8.4. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'ail est largement étudiée. L'ail a démontré *in vitro* et/ou *in vivo*, une activité antibactérienne sur plusieurs espèces, il a été utilisé comme antiseptique, et pour traiter toutes sortes d'infections (SCHOU, 2000 ; SENNINGER, 2009).

Les extraits d'ail inhibent la croissance de plusieurs bactéries pathogènes avec divers degrés de sensibilité (MIKAILI et *al.*, 2013) et prévient les toxines produites par l'infection bactérienne (SHOKRZADEH et *al.*, 2006).

L'activité antimicrobienne de l'ail est attribuée à l'activité de l'allicine sur une grande variété de micro-organismes, y compris les bactéries résistantes aux antibiotiques, Gram-positives et Gram-négatives telles que *Shigella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (ROSS et *al.*, 2001 ; KUDA et *al.*, 2004 ; MERIGA et *al.*, 2012), par son interaction chimique avec des enzymes contenant un groupe thiol (BATIHA et *al.*, 2020).

#### 1.8.5. Activité anticancéreuse

L'ail joue un rôle important dans la prévention de la survenue de certains cancers (notamment digestifs), et il possède aussi lui-même des propriétés anticancéreuses. L'ail diminue le risque de cancers au niveau de plusieurs organes (CORZO-MARTINEZ et *al.*, 2007 ; OMAR et ALWABEL, 2010). L'activité anticancéreuse et protectrice de l'ail est attribuée à ses composés soufrés, le sélénium et les vitamines qu'il contient.

L'extrait d'ail cru s'est avéré être le médicament anticancéreux le plus efficace et le plus spécifique par rapport à 33 extraits végétaux crus contre différentes cellules cancéreuses sans affecter les cellules non cancéreuses (LI et *al.*, 2018). Les mécanismes anticancéreux des extraits d'ail étaient attribués à l'inhibition de la croissance et de la prolifération cellulaire, à la régulation du métabolisme cancérogène, à la stimulation de l'apoptose, à la prévention de l'angiogenèse, de l'invasion et de la migration, réduisant ainsi les effets négatifs de l'agent anticancéreux (CHANG et *al.*, 2019).

#### 1.8.6. Effets de l'ail sur les maladies cardiovasculaires

L'ail et ses préparations sont largement reconnus comme agents de prévention et de traitement des maladies cardiovasculaires. La consommation d'ail a des effets significatifs sur l'abaissement de la tension artérielle, la prévention de l'athérosclérose, la réduction du

cholestérol sérique et des triglycérides, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et l'augmentation de l'activité fibrinolytique (CHAN *et al.*, 2013).

L'extrait aqueux d'ail a un effet antihypertenseur en réduisant le niveau de thromboxane B2 et de prostaglandine E2, et en inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine (DUBEY *et al.*, 2016). Le mécanisme de l'effet antihypertenseur des extraits d'ail est dû aux nombreuses molécules de soufre actives qui stimulent les facteurs de constriction et de relaxation de l'endothélium entraînant une baisse de la pression artérielle. Également l'ail stimule la production d'oxyde nitrique (NO) et de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) qui conduit à la vasodilatation (RIED et FAKLER, 2014).

Les extraits d'ail augmentent l'activité fibrinolytique chez les personnes saines et atteintes d'infarctus du myocarde aigu (SOBENIN *et al.*, 2012). L'ail joue un rôle important dans l'inhibition de la thrombose ainsi que de l'adhésion ou de l'agrégation plaquettaire chez l'homme en inhibant le récepteur GPIIb/IIIa et en augmentant l'AMPc (RAHMAN *et al.*, 2016). L'ail réduit le risque de viscosité plasmatique et augmente l'élasticité des vaisseaux sanguins et la perfusion des capillaires (BAYAN *et al.*, 2014).

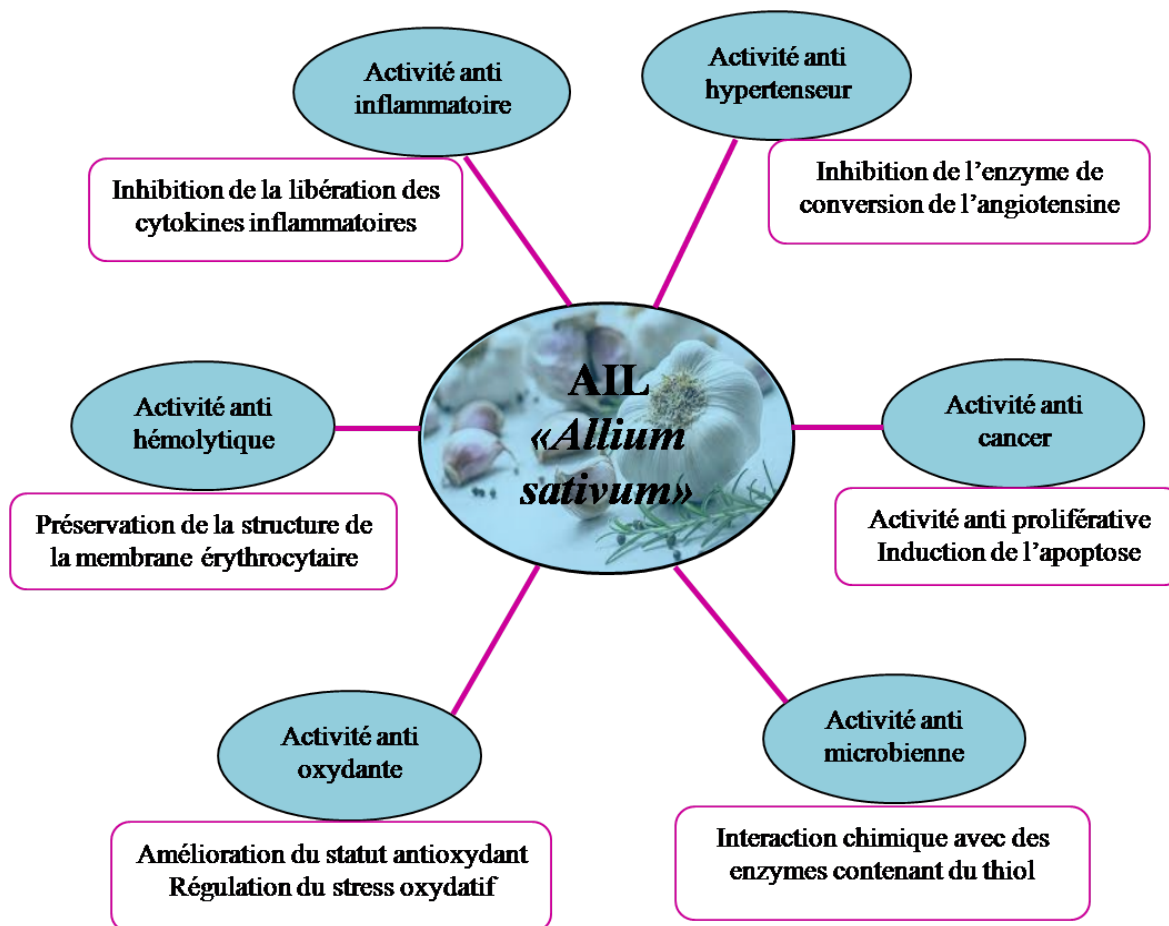


Figure 4 : Schéma récapitulatif de différentes activités d'*Allium sativum*.

**Chapitre II:**  
*La peroxydase*

La peroxydase du Raifort « *Armoracia rusticana* », a servi de base pour les premières études de ces enzymes chez les végétaux, avec la détermination de la première structure cristalline (THEORELL, 1942), ainsi que la première séquence protéique entière (WELINDER, 1979).

La principale source de peroxydases commerciales est les racines de raifort ou celle du radis noir « horseradish » (AGOSTINI et *al.*, 2002) est connue sous les initiales HRP (horseradish peroxidase).

La Peroxydase de raifort (HRP) en raison de son haut degré de pureté a fait l'objet de plusieurs études de la structure et du mécanisme réactionnel. Actuellement plusieurs études de la recherche scientifique s'orientent sur d'autres plantes qui constituent une réserve en peroxydase pour remplacer la HRP.

### 2.1. Classification

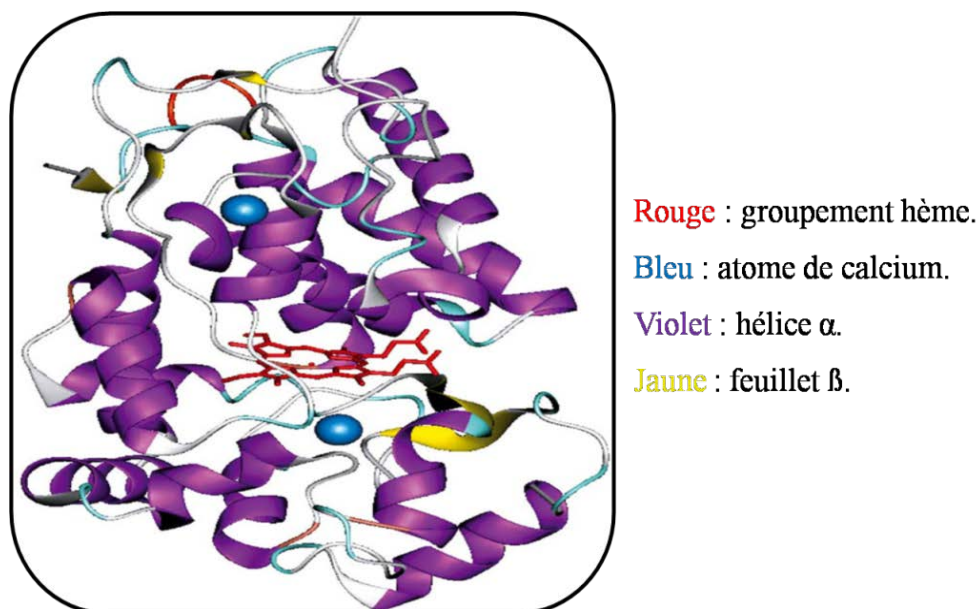
Ce type d'enzymes est ubiquitaire, présent chez les plantes, les animaux, les bactéries et les champignons. Elles existent même chez les bactéries strictement anaérobies (ZAMOCKÝ et *al.*, 2010).

Sur la base de la présence ou de l'absence de l'hème, les peroxydases ont été classés en peroxydases hémiques et non hémiques. Selon la base de données PeroxiBase (PASSARDI et *al.*, 2007), les peroxydases contenant l'hème sont plus répandues, et les peroxydases sans hème constituent une faible proportion. Selon les séquences génétiques actuellement disponibles, les peroxydases à hème peuvent être phylogénétiquement divisées en deux superfamilles : La superfamille des peroxydases-cyclooxygénases (PCOXs) qui sont des peroxydases impliquées dans la défense immunitaire innée et la Superfamille Peroxydase-Catalase (PCATs) qui est la superfamille qui englobe la peroxydase bactérienne, fongique et végétale (PASSARDI et *al.*, 2007 ; ZAMOCKÝ et *al.*, 2010 ; PANDEY et *al.*, 2017).

### 2.2. Structure

Les peroxydases sont des glycoprotéines avec un groupe prosthétique hème dans le site catalytique où le fer est lié par quatre liaisons de coordination à un dérivé de la protoporphyrine IX (NGO, 2010 ; VLASOVA, 2018).

La structure de l'enzyme est en grande partie sous forme d'hélice  $\alpha$  avec des petites régions de feuillet  $\beta$ . Il existe deux domaines entre lesquelles s'insère le groupement hème. Chaque domaine contient un atome de calcium (VEITCH, 2004).

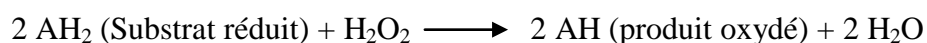


**Figure 5: Représentation tridimensionnelle de la structure cristalline de la peroxydase de raifort (VEITCH, 2004).**

### 2.3. Définition

Les peroxydases sont des enzymes antioxydantes clés qui font partie de la classe des oxydoréductases ont pour code [EC 1.11.1.x], qui est construit comme suit : 1 signifie une oxydoréductase ; 1.11 : regroupe les oxydoréductases qui agissent sur les peroxydes comme accepteurs d'électrons ; 1.11.1 : implique celles qui utilisent le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) comme peroxyde, 1.11.1.7 : indique précisément la peroxydase (MARZOUKI, 2012).

Les peroxydases catalysent l'oxydation d'une large gamme de composés appelés substrats de peroxydase avec décomposition d' $H_2O_2$  (VLASOVA, 2018), selon la réaction suivante :



Elles peuvent avoir les phénols aromatiques, acides phénoliques, indoles, amines et sulfonates comme substrat (VEITCH, 2004).

L'activité enzymatique des peroxydases dépend de plusieurs facteurs les plus important le pH et la température, présentent un pH optimum qui varie entre 4,5 et 6 et une température optimale qui varie entre 30 et 40°C (DIAO et *al.*, 2019).

La peroxydase existe sous plusieurs isoformes au sein d'une même plante avec des poids moléculaire proches, sont facilement révélées par électrophorèse dans des conditions non dénaturantes ou par iso électro focalisation. Ces iso enzymes catalysent la même réaction mais diffèrent par quelques propriétés physicochimiques (MARZOUKI, 2012).

La différence du pH isoélectrique permet de distinguer des peroxydases à caractère basique et d'autres à caractère acide, des isoformes thermostables et thermolabiles ont été définies selon la stabilité thermique (MARZOUKI et *al.*, 2005 ; EL ICHI et *al.*, 2008 ; MARZOUKI et *al.*, 2010), ainsi que des peroxydases liées à la membrane et solubles en raison de leurs localisation tissulaire différentielle (KHALES et BAAZIZ, 2005 ; MARZOUKI, 2012 ; LÜTHJE et *al.*, 2018).

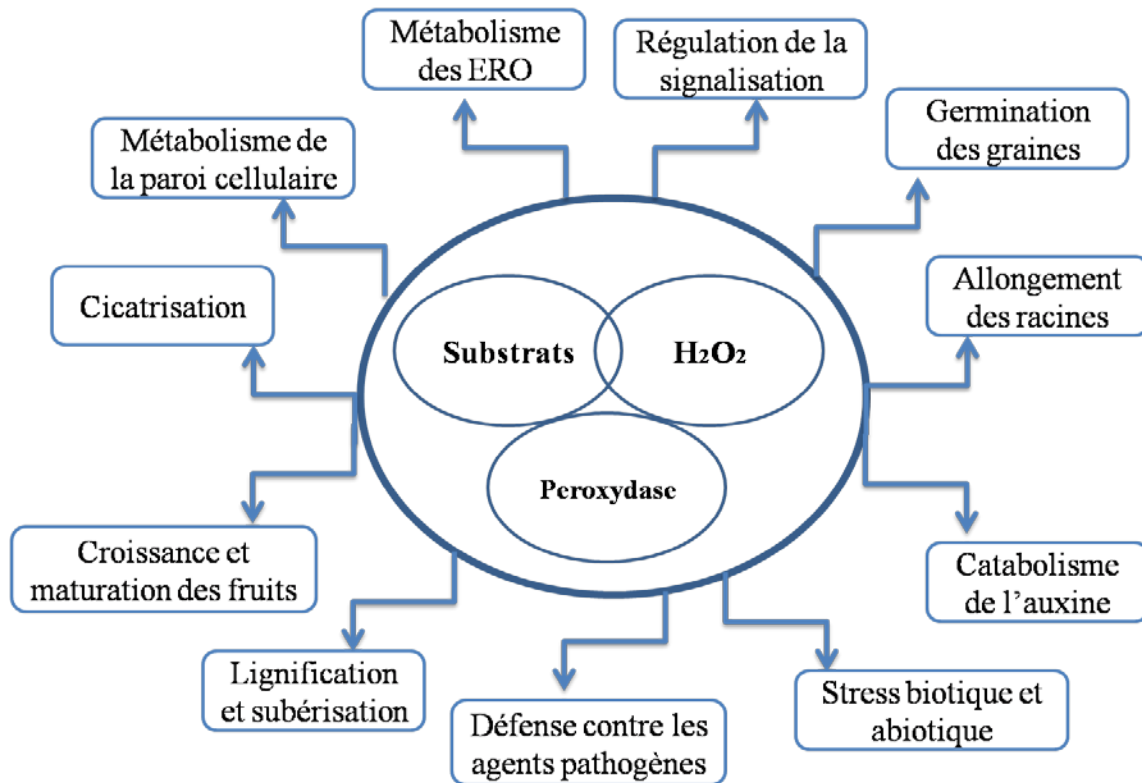
#### 2.4. Mécanisme réactionnel

Les peroxydases sont des enzymes Michaéliennes à deux substrats, catalysent une réaction irréversible selon un mécanisme ping-pong (NGO, 2010). Elles partagent un mécanisme catalytique commun pour la dégradation du peroxyde d'hydrogène. En générale, au début de la réaction l'hème ferrique dans le centre actif des peroxydases réagit avec le peroxyde d'hydrogène (déclencheur de la réaction) pour former des intermédiaires hautement réactifs, qui oxydent ensuite des substances simples appelées substrats de la peroxydase (VEITCH, 2004 ; PANDEY et *al.*, 2017 ; VLASOVA, 2018).

#### 2.5. Rôles et applications

La fonction spécifique de la peroxydase est liée à son substrat physiologique, sa distribution et sa localisation tissulaire.

Dans les végétaux les peroxydases sont impliquées dans divers processus physiologiques essentiels de la croissance et du développement des plantes tout au long de leur cycle de vie tels que le métabolisme de la paroi cellulaire, la biosynthèse de la lignine (polymères polyphénoliques) et la subérine, qui constituent des barrières structurales contre les agents pathogènes et toutes autres formes de stress, assurant ainsi une résistance de la plante. Les peroxydases sont impliquées également dans la prévention des dommages oxydatifs de la cellule végétale en réduisant le taux des agents oxydants notamment les ERO. Interviennent également dans le catabolisme de l'auxine par la dégradation oxydative de l'acide indole -3-acétique qui un régulateur de croissance, ce qui permet le développement de la plante, la croissance et la maturation des fruits (PASSARDI et *al.*, 2005 ; PANDEY et *al.*, 2017).



**Figure 6 : Schéma des différents rôles de la peroxydase végétale.**

Elles sont considérées comme l'une des enzymes importantes du point de vue de leurs diverses applications médicales, biochimiques, immunologiques, biotechnologiques, environnementales et industrielles. Ainsi, les peroxydases ont été utilisées dans la bioremédiation de polluants environnementaux contaminants tels que le traitement des eaux usées pour éliminer les composés phénoliques (DIAO *et al.*, 2011), la délignification dans l'industrie du papier et de la pâte à papier. Elles ont été utilisées aussi comme réactif important pour le développement de kits de diagnostic clinique, divers dosages enzymatiques, les immunoessais en particulier la technologie ELISA (AGOSTINI *et al.*, 2002 ; NGO, 2010) et dans la construction des biocapteurs (EL ICHI *et al.*, 2008). Les biocapteurs à base de peroxydase trouvent une application dans les systèmes analytiques pour la détermination du peroxyde d'hydrogène, du glucose, des alcools. L'utilisation d'enzymes immobilisées, dans divers procédés industriels, est l'une des avancées dans leur application (EL ICHI *et al.*, 2008).

Compte tenu de l'éventail de fonctions physiologiques ainsi que des applications industrielles, les peroxydases ont conquis une position dominante dans les groupes de recherche, car il existe un besoin de recherche de nouvelles peroxydases offrant une tolérance aux facteurs de l'environnement réactionnel (PANDEY *et al.*, 2017).

***PARTIE II :***  
***Partie***  
***expérimentale***

*Matériel et  
méthodes*

## **I. Matériel et méthodes**

Une partie des expérimentations a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie analytique et biotechnologie (LABAB), le reste est effectué au niveau des laboratoires de biochimie au sein de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

### **1.1. Matériel**

#### **1.1.1. Matériel végétal**

*Allium Sativum*, l'ail frais de variété « violet » acheté au marché de fruits et légumes de Draa Ben Khedda dans la wilaya de Tizi ousou a été sélectionné pour être étudié. Les bulbes semblent bien former en pleine maturité (Annexe 1).

#### **1.1.2. Différents produits chimiques utilisés**

Acide ascorbique, Acide gallique,  $AlCl_3$ , Bleu de trypan, BSA,  $CaCl_2$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , Cristal violet, Dextran, DNS, Ethanol, TCA, Tris, Ficoll, Folin Ciocalteu, HCl,  $H_2O_2$ ,  $Na_2CO_3$ , NaOH, NaCl, Ortho-dianisidine, PBS ( $KCl$  2,68 mM, NaCl 0,14mM,  $KH_2PO_4$  1,21mM,  $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$  8,10mM), Quercétine, Solution de glucose, Tartrate de Na et K.

#### **1.1.3. Appareillage**

- Agitateur magnétique (VARI MAG).
- Balance de précision analytique (DENVER).
- Bain marie (MEMMERT).
- Centrifugeuse (SIGMA).
- Congélateur (ENIEM).
- Etuve réglable (MEMMERT).
- Hotte à flux laminaire (BIOBASE).
- Microscope photonique (hund WETZLAR).
- Mixeur (Moulinex).
- pH mètre (HANNA).
- Plaque chauffante (LABINCO).
- Spectrophotomètre (UVmini-1240).
- Vortex (HumanLab).

## **1.2. Méthodes**

### **1.2.1. Préparation des échantillons**

Les bulbes d'ail ont été bien nettoyés et débarrassés de toutes leurs enveloppes, rincés et essuyés. 3 échantillons ont été préparés à partir de 5 g d'ail frais :

- 1- Ail frais
- 2- Ail congelé : les gousses d'ail ont été congelées dans une boîte bien fermée à -20 °C pendant une semaine.
- 3- Ail séché : les gousses d'ail ont été coupées en fine tranches de 1 à 2 mm d'épaisseur de façon à accélérer le séchage. Les fines lamelles sont déposées dans un cristalliseur et séchées à l'étuve entre 40 et 45°C pendant 2 à 3 jours, une fois séchées, l'échantillon sec obtenu est broyé à l'aide d'un mortier. La poudre d'ail obtenue est stockée dans un flacon en verre bien fermé à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité, pour réduire le taux d'oxydation dû à la lumière mais aussi pour éviter que la poudre n'absorbe l'humidité (Annexe 2).

### **1.2.2. Protocole d'extraction de la peroxydase**

Le protocole utilisé pour l'extraction est celui décrit par DIAO et *al.* (2019) avec quelques modifications. 5 g de chaque échantillon ont été mélangés à 30 ml de tampon d'extraction Tris-HCl (50mM, pH 7,3 contenant Chlorure de calcium (0,5 M) et le DTT(5mM)) puis mixer à l'aide d'un mixeur pendant 5 minutes, et laisser reposer 1heure à 4 °C. L'extrait est ensuite centrifugé à 4000g pendant 30 minutes à 4 °C dans une centrifugeuse. Le surnageant recueilli est filtré par un filtre membrane de porosité 0,22 µm, le filtrat est aliquoté dans des tubes eppendorfs et conservé à -20°C. Ce dernier représente l'extrait brut (extrait enzymatique), sera utilisé pour les différents dosages.

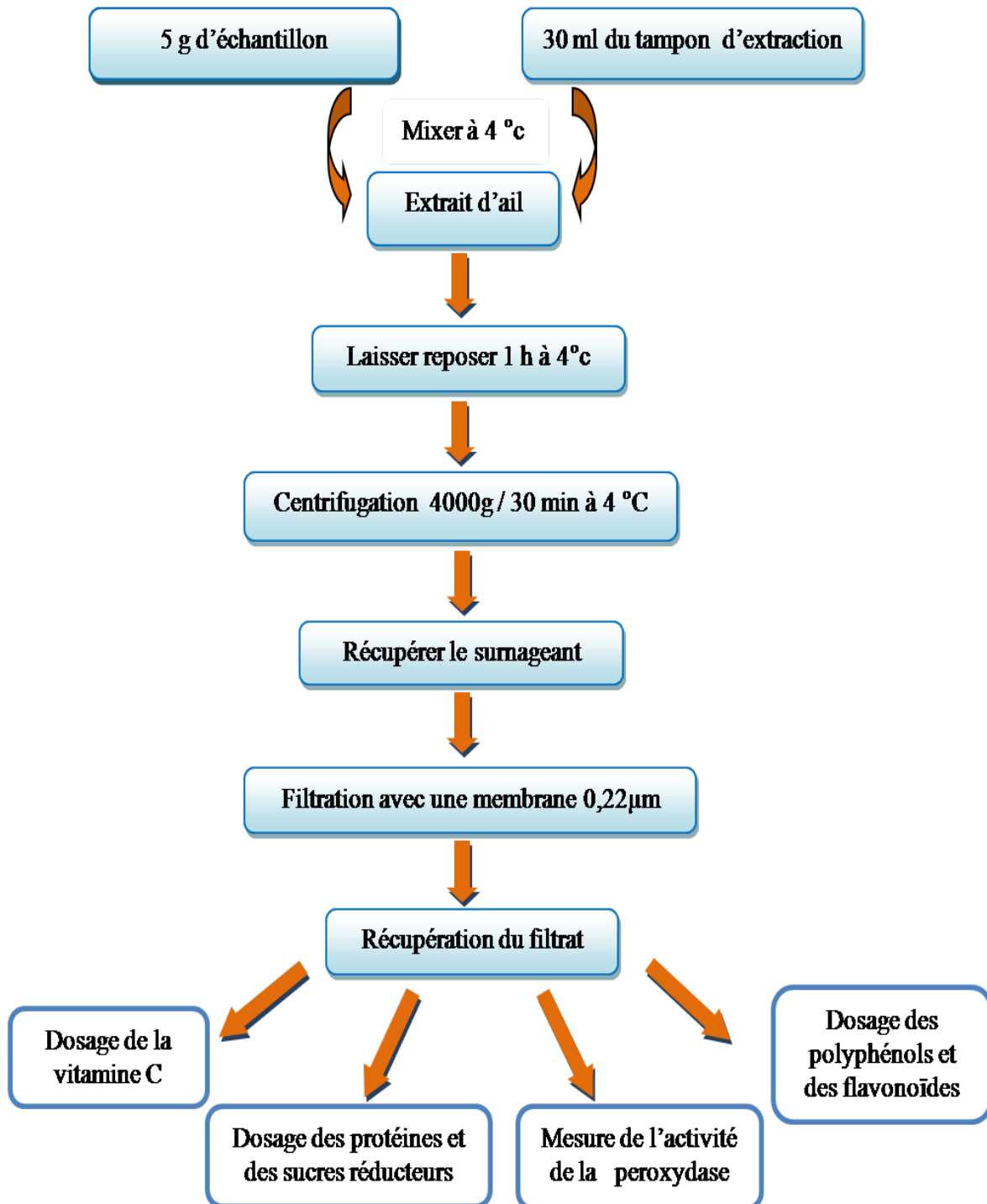
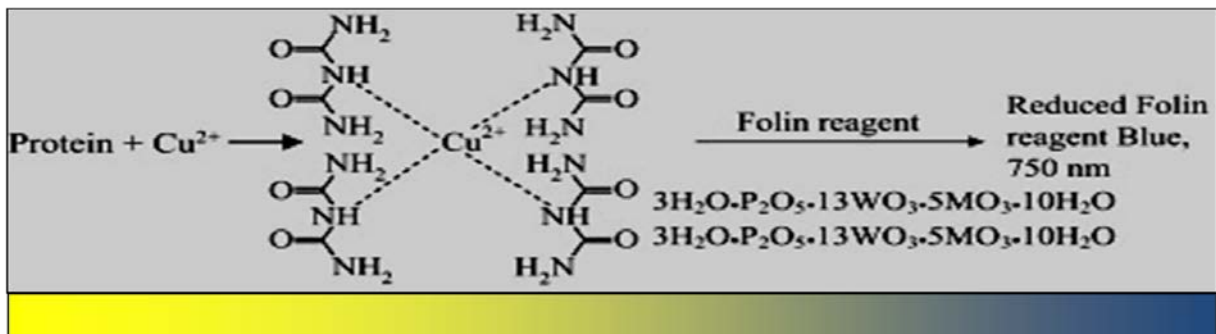


Figure 7: Diagramme récapitulatif des étapes d'extraction et des dosages réalisés.

### 1.2.3. Analyse quantitative des composés biochimiques et bioactifs des extraits d'ail

#### 1.2.3.1. Dosage des protéines totales

La teneur en protéines solubles est déterminée par le dosage colorimétrique selon la méthode établie par LOWRY. (1951). Le principe repose sur la formation d'un complexe de couleur bleu foncé suite à l'interaction du réactif Folin-Ciocalteu avec la tyrosine, le tryptophane et dans la moindre mesure la cystéine, l'histidine et la liaison peptidique en présence de cuivre en milieu alcalin. Le complexe absorbe fortement à 750 nm.



**Figure 8 : Réaction chimique du Folin-Ciocalteu sur les protéines.**

Le milieu réactionnel contient 3 ml de la solution C et 20  $\mu\text{l}$  de l'extrait enzymatique, le mélange est agité et laissé reposer 10 minutes à température ambiante, puis 0,3 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au demi sont ajoutés, homogénéisé au vortex et laissé reposer 15 minutes à l'obscurité. La lecture des densités optiques (DO) se fait à 750 nm par spectrophotomètre.

Une gamme étalon est préparée dans les mêmes conditions en utilisant l'Albumine Sérique Bovine (0,01g/ml) diluée dans du Tris-HCl. Les concentrations sont calculées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en gramme par 100gramme de matière végétale (g/100g de MV).

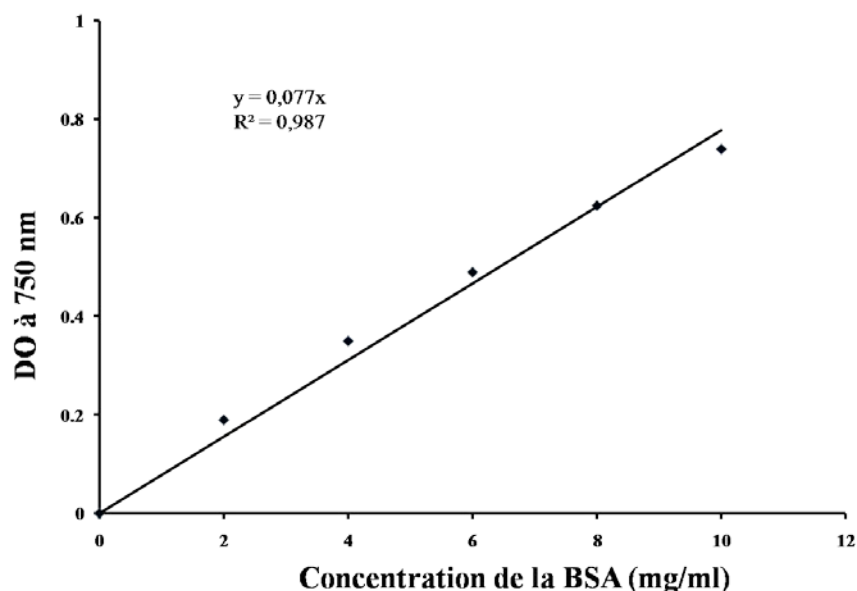


Figure 9 : Courbe d'étalonnage du dosage des protéines.

### 1.2.3.2. Dosage des sucres réducteurs

La méthode de dosage par l'acide 3,5, Dinitrosalicylique (DNS) est utilisée pour le dosage des sucres réducteurs dans les différents extraits. En milieu alcalin et à chaud en présence de sucres réducteurs, l'acide 3,5, Dinitrosalicylique est réduit en acide 3-amino-5 nitrosalicylique qui présente une couleur orange rouge. Ce composé est dosé par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm.

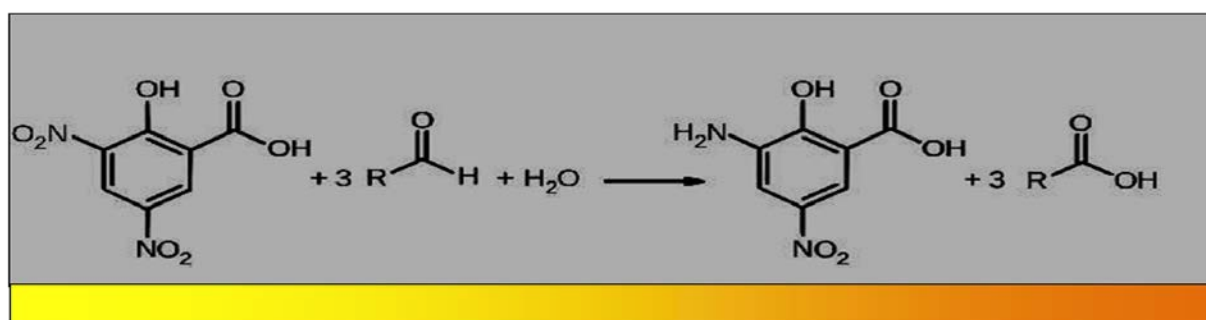


Figure 10: Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs.

Dans un tube à essai 1ml du réactif de DNS est ajouté à 0,5ml d'extrait. Ensuite tous les tubes sont chauffés dans un bain marie bouillant pendant 5minutes. On ajoute 3,5 ml d'eau distillée et on laisse reposer 15 minutes puis lire les absorbances à 530 nm.

Dans les mêmes conditions une gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution mère de glucose (1g/l). Les concentrations des sucres réducteurs sont calculées par l'équation de régression de la courbe d'étalonnage et les résultats sont exprimés en g/100g de matière végétale.

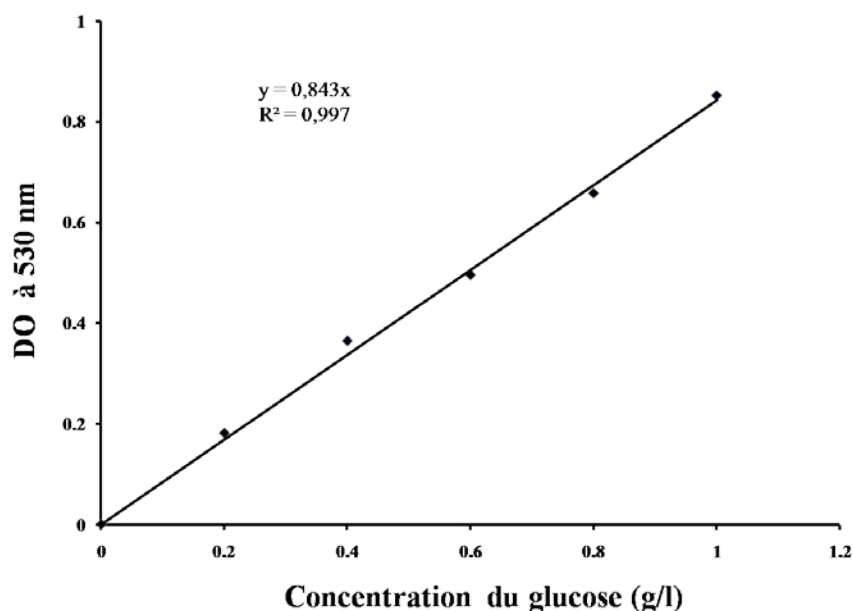


Figure 11 : Courbe d'étalonnage du dosage des sucres réducteurs.

### 1.2.3.3. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

Le dosage de polyphénols totaux (PPT) est effectué selon la méthode utilisant le Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>), qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (M<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006). L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques contenus dans l'échantillon analysé.

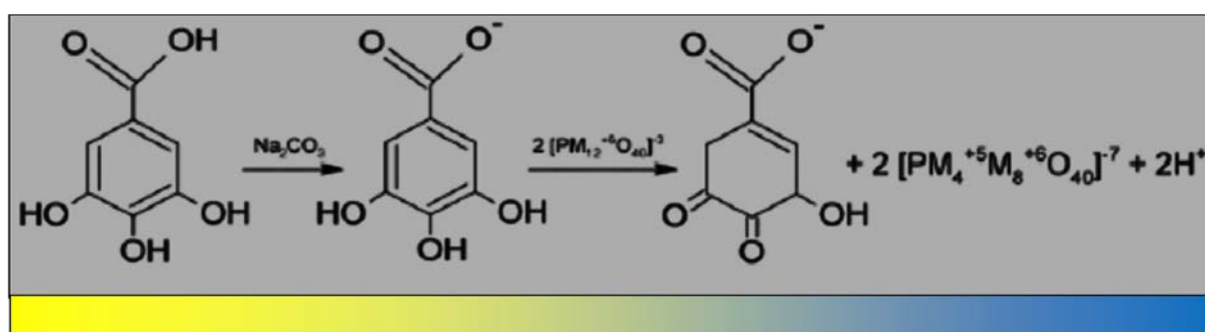


Figure 12 : Réaction chimique du Folin Ciocalteu sur les polyphénols.

Pour réaliser le dosage 0,5 ml de chaque extrait sont mélangés avec 2,5 ml de Folin-Ciocalteu (50%), ensuite 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4%) sont ajoutées au mélange. Le mélange est incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 760 nm par spectrophotomètre.

Dans les mêmes conditions une gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution mère d'acide gallique (0,2mg/ml). Les concentrations des PPT sont calculées à partir de

l'équation de régression de la courbe de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par 100gramme de matière végétale (mg EAG/100g de MV).

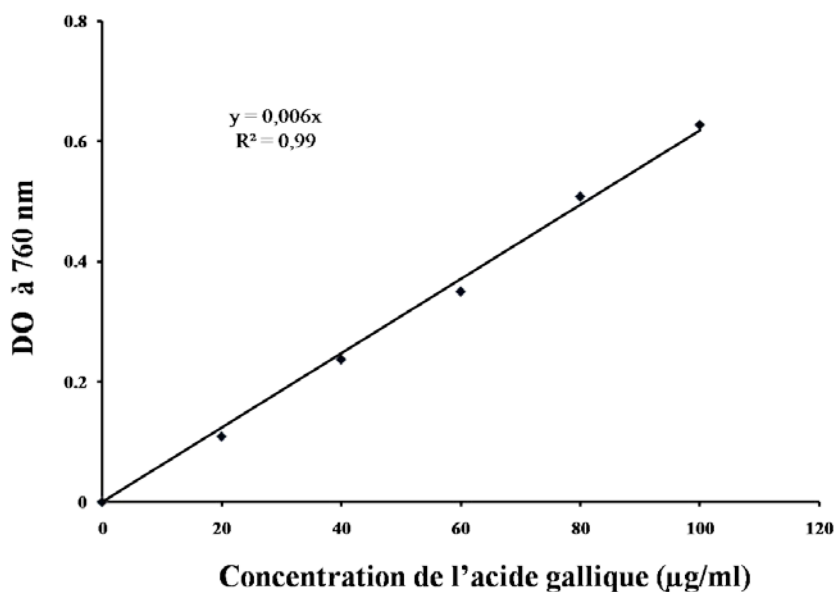


Figure 13 : Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols.

#### 1.2.3.4. Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur des flavonoïdes est effectuée selon la méthode colorimétrique en utilisant le trichlorure d'aluminium qui forme un complexe jaune avec les flavonoïdes (AKROUT *et al.*, 2011).

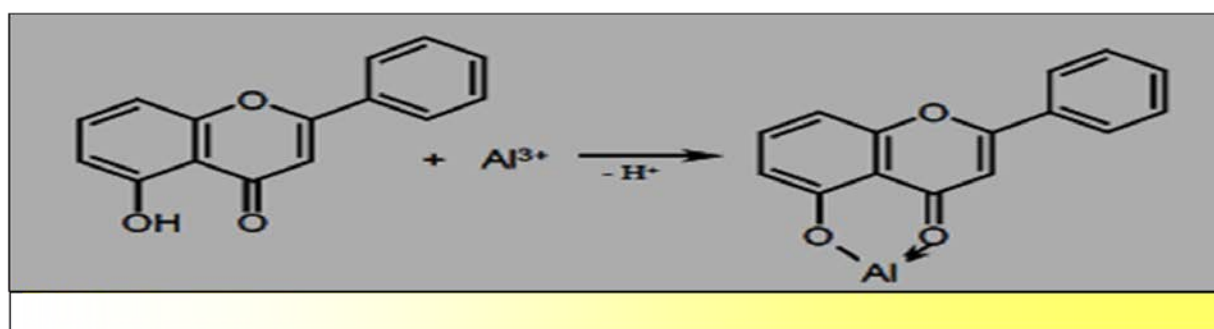
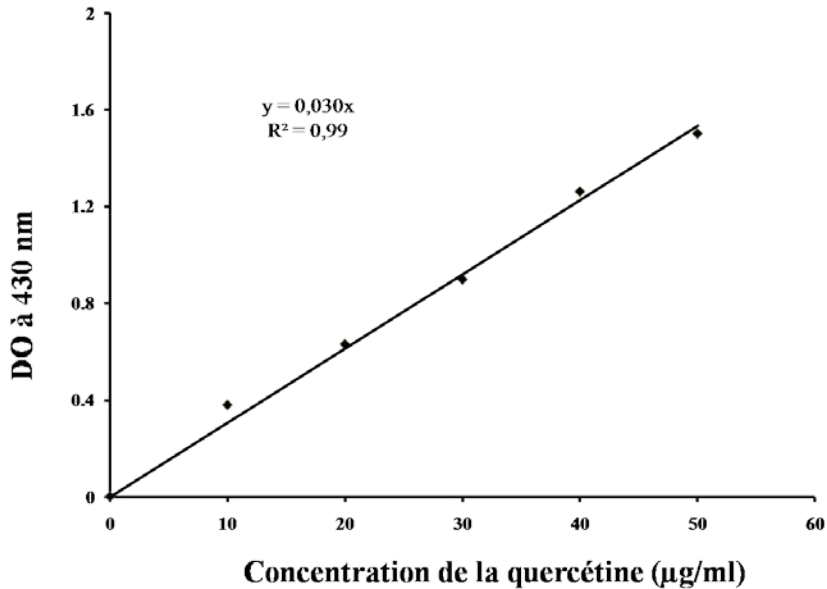


Figure 14 : Réaction chimique du chlorure d'aluminium sur les flavonoïdes.

Le protocole consiste à mélanger 0,5 ml de la solution de chlorure d'aluminium à 2% (préparée dans l'éthanol) à 0,5 ml de chaque extrait à analyser. Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 430 nm.

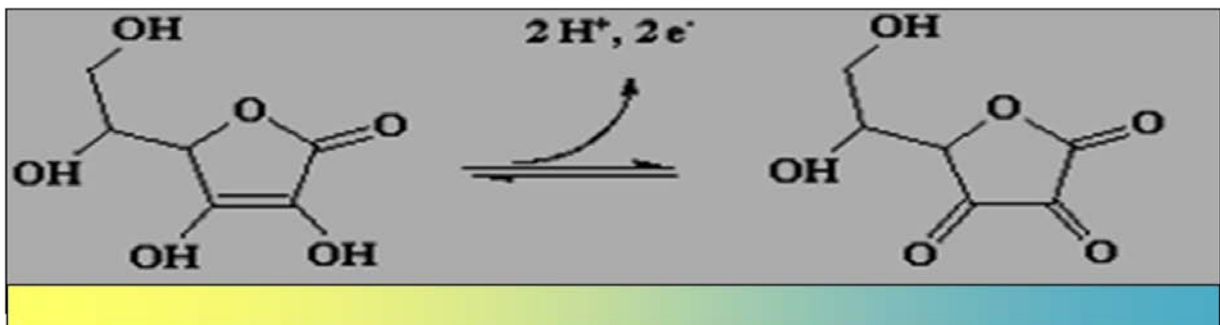
Dans les mêmes conditions une gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution mère de quercétine (5mg/ml). La concentration des flavonoïdes est calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de quercétine et les résultats sont exprimés en milligramme équivalent Quercétine par 100gramme de matière végétale (mg EQ/100g de MV).



**Figure 15 : Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes .**

### 1.2.3.5. Dosage de la vitamine C

La détermination de la teneur de la vitamine C est effectuée selon la méthode colorimétrique en utilisant le Folin-Ciocalteu. Le principe repose sur la formation d'un complexe de couleur bleu suite à la réduction du réactif Folin-Ciocalteu en présence de la vitamine C dans un milieu acide.

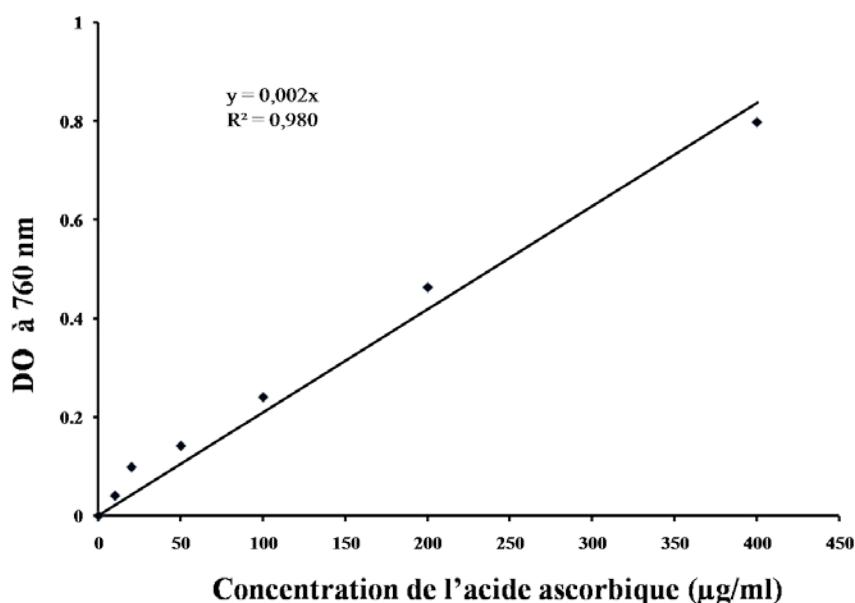


**Figure 16 : Réaction d'oxydation de la vitamine C.**

Les échantillons sont prétraités au TCA, agiter vigoureusement le mélange composé de 0,2 ml de chaque extrait et de 0,8 ml de TCA (10%), le mélange est laissé 5 minutes dans de la

glace (4°C). Les surnageants sont récupérés après centrifugation à 3000 rpm pendant 5 minutes pour dosage.

Pour le dosage 2 ml d'eau distillée et 0,2 ml de Folin-Ciocalteu (10%) sont ajoutés à 0,5 ml du surnageant de chaque extrait, bien homogénéiser et l'incuber à température ambiante pendant 10 minutes. Les absorbances sont mesurées à 760 nm à l'aide du spectrophotomètre (JAGOTA et DANI, 1982). La gamme d'étalonnage est préparée en utilisant l'acide ascorbique (400µg/ml) (AYADOGMUS *et al.*, 2002). Les résultats sont exprimés en mg/100 g de matière végétale en se référant à la courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.



**Figure 17 : Courbe d'étalonnage du dosage de la vitamine C.**

### **1.2.3.6. Dosage de l'activité enzymatique de la peroxydase**

#### **1.2.3.6.1. Cinétique enzymatique**

L'activité de la peroxydase (oxydoréductase EC1.11.1.7) est mesurée par spectrophotométrie en suivant par lecture de densité optique à 470 nm la cinétique de formation du produit coloré d'oxydation de l'ortho-dianisidine en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à température ambiante (25 °C) selon le protocole décrit par BRADLEY *et al.*(1982) modifié par BEDOUHENE *et al.* (2020).

Le mélange réactionnel de 1 ml est composé de 775 µl de tampon PBS pH 6, 100 µl d'ortho-dianisidine (2mg/2ml), 25 µl de l'extrait enzymatique, la réaction est initiée par l'ajout de 100µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2/1000). Le contrôle est effectué en remplaçant l'extrait enzymatique par le tampon PBS.

Les absorbances sont lues chaque minute pendant 10 minutes. L'expérience est réalisée en triplicate.

1 unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme responsable du changement de la DO de 0,001 /minute (PONCE et *al.*, 2004). Les résultats sont exprimés en Unité par minute par gramme de matière végétale (U/min/g de MV).

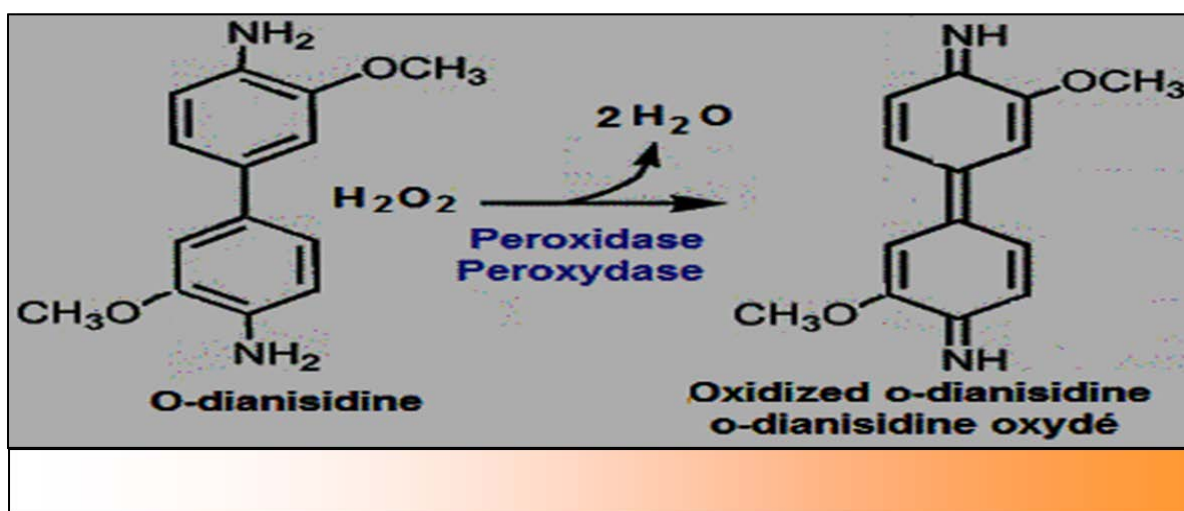


Figure 18 : Réaction chimique d'oxydation de l'Ortho-dianisidine.

#### 1.2.3.6.2. Détermination de l'effet dose de la peroxydase et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'activité enzymatique

L'effet dose de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'activité de la peroxydase est déterminé en mesurant l'activité de l'enzyme avec différentes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 ; 5 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 µg/ml) dans un tampon PBS à une concentration fixe de l'enzyme et de l'ortho-dianisidine.

L'effet dose de l'extrait sur l'activité de la peroxydase est déterminé en mesurant l'activité de l'enzyme avec différentes concentrations de l'extrait enzymatique (0 ; 1 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 µg/ml) dans un tampon PBS à une concentration fixe d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'ortho-dianisidine.

La lecture des absorbances à 470 nm au spectrophotomètre se fait chaque 10 minutes pendant une heure.

#### **1.2.4. Activités biologiques**

Les expériences ont été menées sur du sang humain frais prélevé dans des tubes héparinés à partir de 4 donateurs sains.

##### **1.2.4.1. Evaluation de l'effet d'extrait d'ail frais sur la viabilité des neutrophiles isolés**

###### **1.2.4.1.1. Isolement des polynucléaires neutrophiles humains**

L'isolement des neutrophiles a été réalisé par la méthode Dextran/Ficoll. La séparation est basée sur le principe de sédimentation par gradient de densité et par centrifugation (EL-BENNA et DANG, 2007).

Le sang est mélangé avec du Dextran à 2% (préparé dans du NaCl à 0,9%) volume à volume, le mélange est incubé à température ambiante pendant 30minutes, les hématies sédimentent et forment un culot. Le surnageant qui contient les leucocytes est récupéré soigneusement dans un tube stérile et soumis à une centrifugation à 400g pendant 8minutes à 22°C. Le culot est suspendu dans un volume de PBS, puis déposé sur un coussin Ficoll et centrifugé à 400g pendant 30minutes à 22°C. Cette étape permet d'obtenir 3 phases, un surnageant contenant le PBS et Ficoll, un culot qui contient les granulocytes (basophiles-éosinophiles-neutrophiles) et les érythrocytes contaminants et une phase qui sépare le culot et le surnageant contient des mononuclées (monocytes-lymphocytes) qui forment un anneau.

On élimine à l'aide d'une pipette poire les 2 phases supérieures et on garde le culot. Afin de lyser les érythrocytes, un volume de la solution hypotonique de NaCl à 0,2% froide est ajouté au culot. Après 30 secondes l'isotonicité est rétablie par l'ajout d'un même volume de la solution de NaCl à 1,8%. Le mélange est tamponné par la solution de PBS froide puis centrifugé à 400g pendant 8minutes à 4°C. Les neutrophiles sont récupérés, dans un petit volume de PBS.

La pureté des neutrophiles isolés est vérifiée en utilisant le cristal violet qui permet de visualiser la forme du noyau. Le comptage cellulaire est réalisé par la dilution d'un volume de PNs dans du PBS puis le mélange à une solution de cristal violet. 15µl de ce mélange sont déposés sur une lame de Mallassez.

Le nombre de cellules est calculé selon la formule suivante :

$$N = n \times 10 \times F \times 1000 \text{ ml} \times V_t$$

**N** = nombre des PNs.

**n** = moyenne des trois lignes.

**F** = facteur de dilution.

**V<sub>t</sub>** = volume total des PNs.

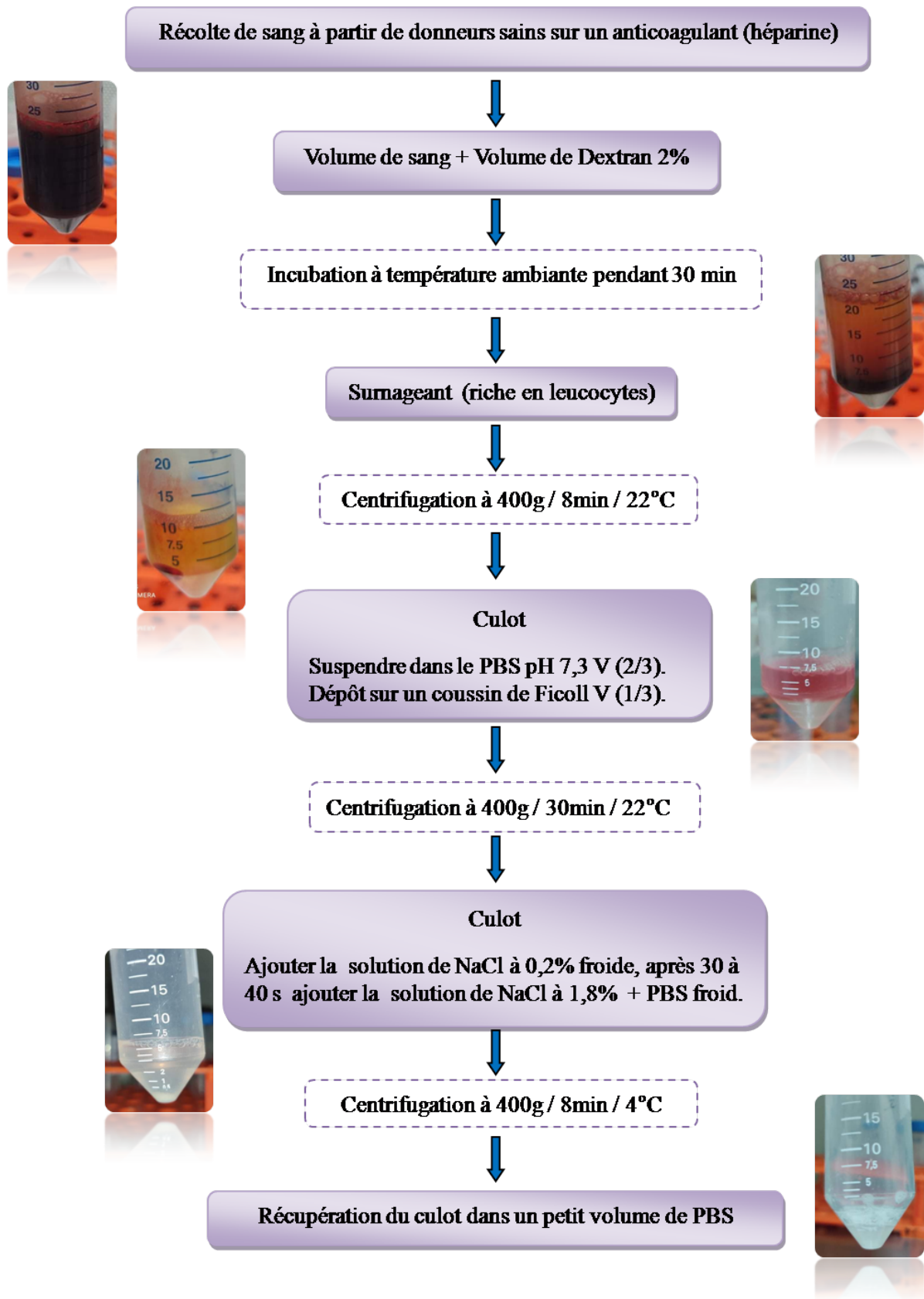


Figure 19: Diagramme représentant les étapes d'isolement des neutrophiles.

#### **1.2.4.1.2. Effet de l'extrait d'ail frais sur la viabilité des neutrophiles isolés**

L'effet cytotoxique de l'extrait d'ail frais vis-à-vis des neutrophiles est déterminé par un test de viabilité. Le test consiste à l'incubation des neutrophiles isolés avec des concentrations croissantes de l'extrait d'ail frais [0 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80 ; 100 ; 200] µg/ml à 37°C pendant 1 heure de temps.

Un volume de PNs préincubé avec l'extrait est mélangé au bleu de trypan. Le mélange est déposé sur une lame de Mallassez afin de faire le comptage au microscope photonique des cellules mortes qui apparaissent en bleu foncé se trouvant dans un champ de 100 cellules.

#### **1.2.4.2. Evaluation de l'activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais**

##### **1.2.4.2.1. Préparation de la suspension érythrocytaire**

Le sang collecté dans des tubes héparinés est centrifugé à 1400g pendant 15 minutes à 4°C, le culot érythrocytaire récupéré après élimination du surnageant est lavé avec une solution de NaCl à 0,9%. Le lavage consiste à centrifuger la suspension du culot dans le NaCl à 0,9% pendant 10 minutes à 1400g, puis éliminer à l'aide d'une pipette poire le surnageant. Le lavage est répété 3 fois dans les mêmes conditions.

##### **1.2.4.2.2. Activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais contre l'hémolyse induite par le stress osmotique**

Dans des tubes à hémolyse 1ml de l'extrait d'ail frais à différentes concentrations [5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80 ; 100 µg/ml] et 40 µl de la solution érythrocytaire sont pré incubées pendant 10 minutes à température ambiante, puis 1ml de NaCl à 0,2% est ajouté pour induire l'hémolyse.

Dans les mêmes conditions un tube de contrôle positif (hémolyse totale) qui contient 40 µl de la suspension érythrocytaire et 2ml de NaCl à 0,2%, et un tube de contrôle négatif (absence d'hémolyse) qui contient 40 µl de la suspension érythrocytaire et 2ml de NaCl à 0,9% sont préparés.

Les tubes sont incubés à 37°C pendant 30 minutes sous une agitation douce puis sont centrifugés à 300g à 4°C pendant 10 minutes.

La lecture spectrophotométrique des densités optiques de chaque surnageant se fait à 540nm contre le contrôle négatif (absence d'hémolyse). Le taux de protection est calculé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\% \text{ de protection} = [(DO_C - DO_e) / DO_C] \times 100$$

DO<sub>e</sub> : Densité optique en présence de l'extrait.

DO<sub>c</sub> : Densité optique du contrôle positif (absence de l'extrait).

#### **1.2.4.2.3. Activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais contre l'hémolyse induite par le stress oxydatif**

Selon le protocole décrit par EBRAHIMZADEH et *al.* (2010). L'hémolyse érythrocytaire a été réalisée avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme initiateur de radicaux libres. 1ml de la suspension érythrocytaire à 4% est pré incubé à température ambiante pendant 5minutes avec 250µl d'extrait d'ail frais à différentes concentrations [5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80 ; 100µg/ml] après avoir compléter le volume à 2,5ml avec du NaCl à 0,9%. Puis 250µl d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10% sont ajoutées. Les mélanges sont centrifugés à 300g pendant 10minutes après 2heures d'incubation à 37°C.

Le contrôle positif (hémolyse totale) est préparé en mélangeant 2ml de la suspension avec 2ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La lecture des densités optiques se fait au spectrophotomètre à 540nm contre un contrôle négatif (absence d'hémolyse). Le taux d'hémolyse est calculé en pourcentage par rapport à l'hémolyse totale selon la formule suivante :

$$\% \text{ Hémolyse} = (DO_e / DO_C) \times 100$$

DO<sub>e</sub> : Densité optique en présence de l'extrait.

DO<sub>c</sub> : Densité optique du contrôle positif (absence de l'extrait).

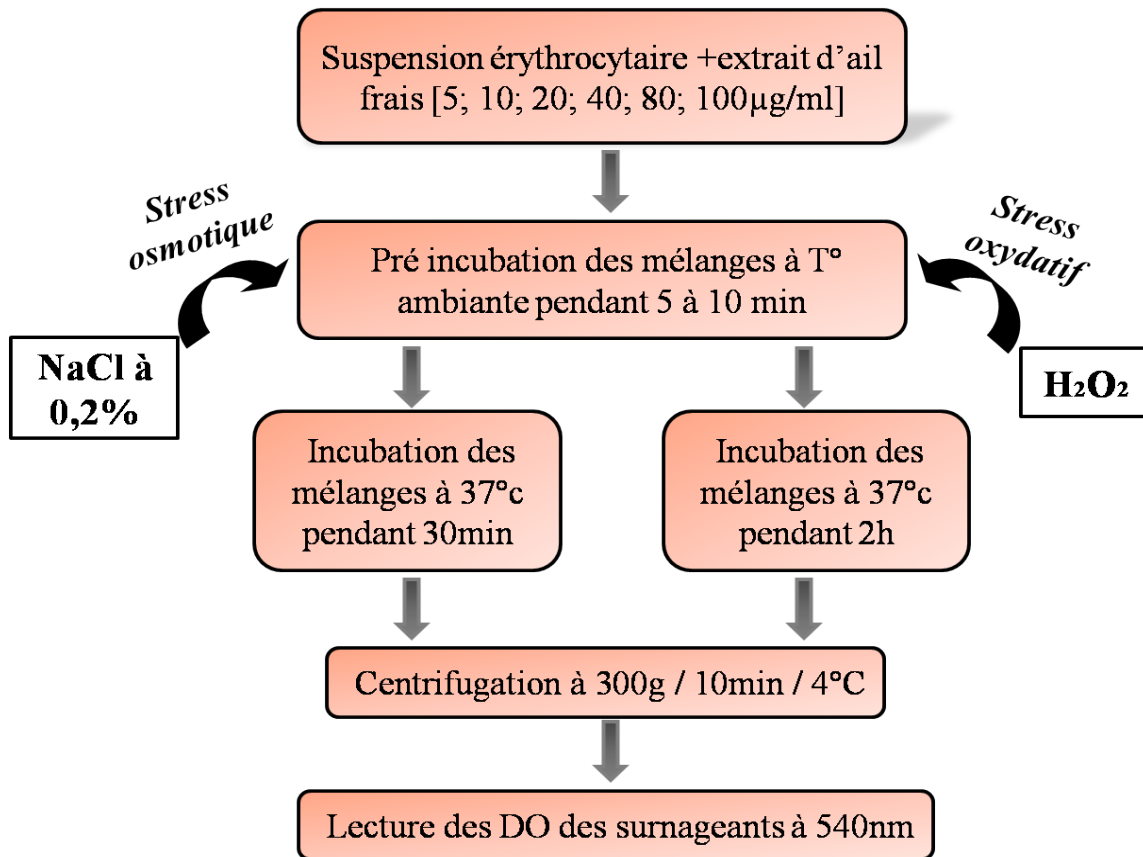


Figure 20 : Diagramme récapitulatif du test de l'activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais.

### 1.2.5. Analyse statistique

Les courbes et les histogrammes sont tracés par Microsoft Excel 2007, les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  l'écart type. Chaque expérience a été faite en triplicate. Les résultats du test de l'activité anti hémolytique ont fait l'objet d'une analyse statistique en utilisant le test de variance ANOVA.

# *Résultats et discussion*

## **II. Résultats et discussion**

L'étude expérimentale vise en premier lieu à déterminer l'influence du traitement thermique ainsi que celle de la congélation sur les composés biochimiques et bioactifs de l'ail « *Allium sativum* », puis l'étude de la propriété anti hémolytique de l'extrait d'ail frais.

Le dosage par des méthodes colorimétriques des protéines, des sucres réducteurs, des polyphénols totaux, des flavonoïdes et de la vitamine C a été effectué pour les trois extraits d'ail obtenus selon le mode opératoire décrit précédemment.

Le processus d'extraction décrit est une procédure très simple pour obtenir un extrait enzymatique riche en peroxydase. Cependant, il est important de vérifier s'il s'agit bien d'un extrait présentant une activité enzymatique.

### **2.1. Caractérisation biochimique des différents extraits d'ail**

#### **2.1.1. Teneur en protéine totales**

Les taux de protéines totales obtenus pour chaque échantillon par la méthode de Lowry sont déterminés à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage en utilisant la solution d'albumine sérique bovine (BSA) (Figure 9), et sont exprimés en gramme par 100 grammes de matière végétale (g/100g de MV).

Les résultats obtenus représentés dans la figure suivante montrent un taux similaire de protéines dans les deux extraits d'ail frais et congelé avec une valeur de  $2,58 \pm 0,11$  g/100g de MV pour une concentration de 4,3mg/ml, tandis que l'extrait d'ail séché présente une faible teneur qui est de  $1,04 \pm 0,03$  g/100g de MV pour une concentration de 1,73 mg/ml.

En comparant ces résultats, nous avons constaté que l'extrait d'ail frais et celui de l'ail congelé sont plus riche en protéines.

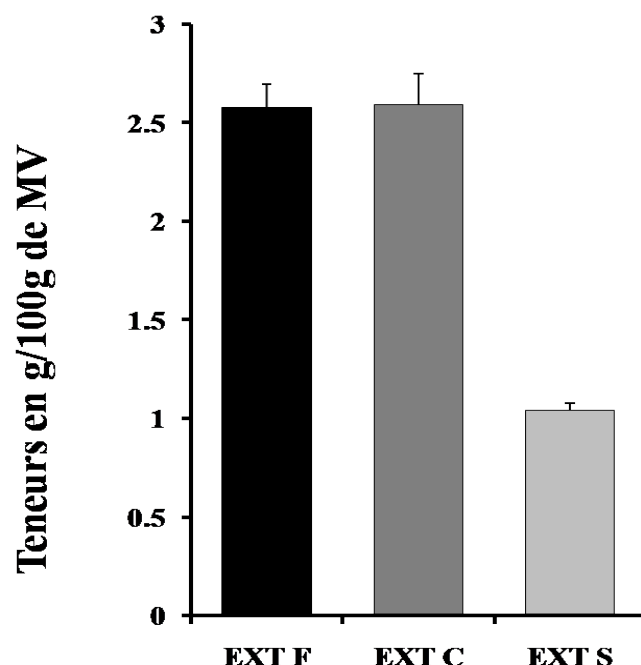


Figure 21 : Teneur en protéines dans les différents extraits.

La teneur en protéine dans l'extrait d'ail frais trouvée est en corrélation avec les résultats de l'étude de BANFITEBIYI et *al.* (2018a) qui est de 2%. Mais selon d'autres études le taux de protéines est supérieur (MEREDITH, 2008 et PETROPOULOS et *al.*, 2018).

L'ail séché contient certains constituants similaires à ceux de l'ail frais, même si les concentrations peuvent varier considérablement (MERCIER-FICHAUX, 2016). Le faible taux de protéines dans l'ail séché est dû à l'effet du traitement thermique sur l'ail en dénaturant les protéines (KIM et *al.*, 2002), certaines protéines sont totalement décomposées à 20°C en 20 heures telle que l'alliinase (MERCIER-FICHAUX, 2016).

### 2.1.2. Teneur en sucres réducteurs

Les taux de sucres réducteurs dosés pour chaque échantillon par la méthode utilisant le DNS sont déterminés à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage en utilisant la solution de glucose (Figure 11), et sont exprimés en gramme par 100 grammes de matière végétale (g/100g de MV).

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 22. L'extrait d'ail frais renferme le taux le plus élevé en sucres réducteurs  $1,14 \pm 0,04$  g/100g MV pour une concentration de 1,9 g/l suivi par l'extrait d'ail congelé  $1,11 \pm 0,04$  g/100g MV pour une concentration de 1,85 g/l et enfin l'extrait d'ail séché  $0,31 \pm 0,01$  g/100g MV pour une concentration de 0,52g/l.

En comparant ces résultats, nous avons constaté que l'extrait d'ail frais et celui de l'ail congelé sont plus riches en sucres réducteurs.

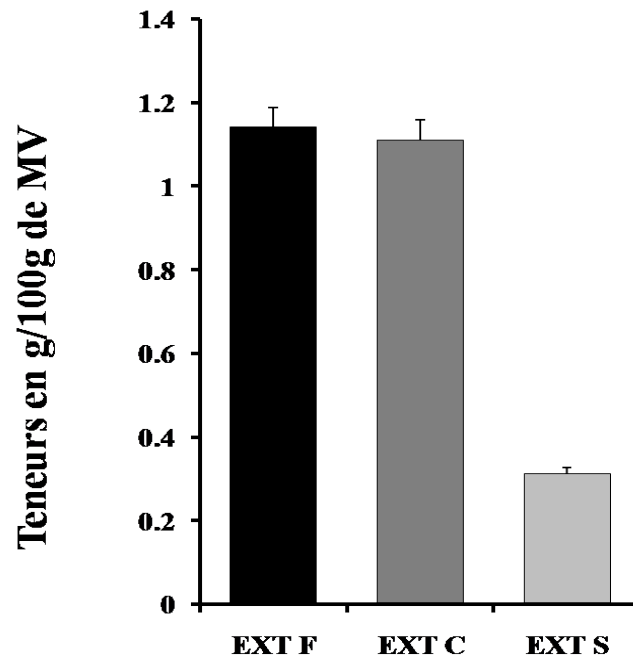


Figure 22 : Teneur en sucres réducteurs dans les différents extraits.

Un taux de sucre qui varie entre 2,12 et 3,27g/100g MS trouvé par LISCIANI *et al.* (2017) est proche de celui trouvé dans notre étude pour l'extrait d'ail frais et des taux très élevés qui varient entre 23,13 et 36,03g/100g MS trouvés par PETROPOULOS *et al.* (2018). Le taux de sucre dans l'ail congelé est légèrement faible par rapport à l'ail frais, par contre celui de l'ail séché a vu une diminution importante.

La diminution des protéines et des sucres dans l'extrait d'ail séché peut être lié à l'effet de la température sur les réactions biochimiques au cours du séchage (début de la réaction de Maillard). L'effet de la température sur la diminution de la teneur en humidité était plus prononcé entre 40 et 50 °C (RATTI *et al.*, 2007) et cette diminution d'eau agit également sur l'activité des composés de l'ail.

La composition chimique varie en fonction de la variété cultivée, du lieu de culture, du moment de la récolte, et des conditions de stockage des bulbes. Cette variation peut être très importante (BRUNETON, 2009). Ceci permettrait d'expliquer les écarts de composition rencontrés dans les différents ouvrages et publications.

## 2.2. Détermination de la teneur quelques molécules bioactives

Le dosage des polyphénols totaux, nous donne une estimation globale de la teneur en différentes classes des composés phénoliques contenu au niveau des extraits, dont les flavonoïdes comme composés les plus intéressants et la classe majoritaire des polyphénols.

### 2.2.1. Teneur en polyphénols totaux

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols par la méthode de Folin- Ciocalteu pour chaque extrait sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par 100 grammes de matière végétale (mg EAG/100g de MV) en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique (Figure 13).

Les teneurs en PPT obtenus pour les trois extraits d'ail sont représentées dans la figure 23. Nous avons obtenu une valeur de  $94 \pm 3,33$  mg EAG/100g de MV dans l'extrait d'ail frais,  $92,33 \pm 3,11$  mg EAG/100g de MV dans l'extrait d'ail congelé et une valeur de  $38,88 \pm 4,49$  mg EAG/100g de MV dans l'extrait d'ail séché.

Selon les valeurs enregistrées nous avons remarqué que les teneurs en PPT dans l'extrait frais et congelé sont clairement plus élevées par rapport à l'extrait d'ail séché.

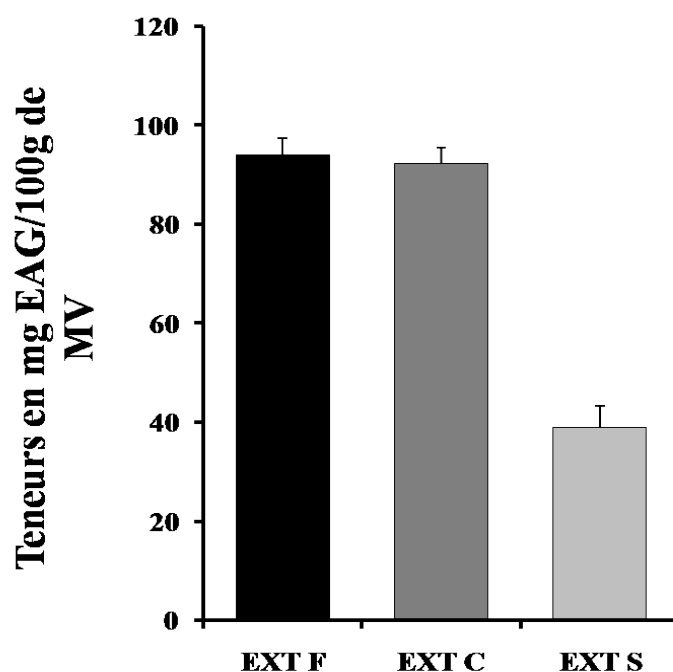


Figure 23: Teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits.

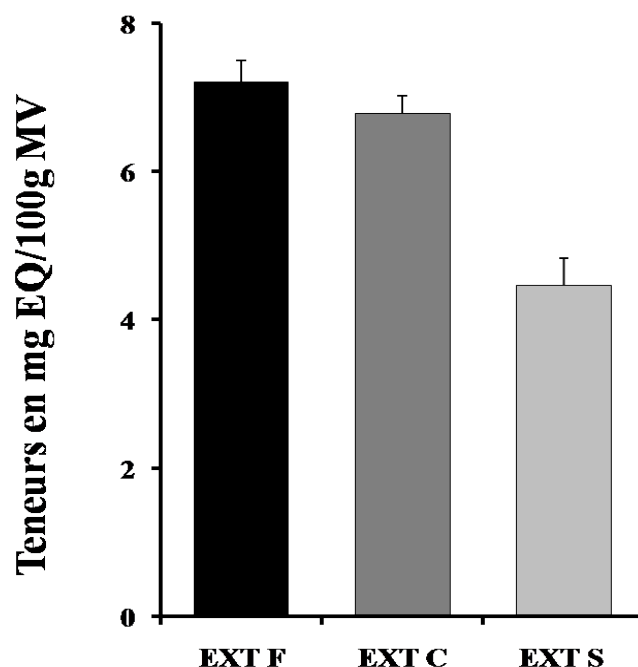
### 2.2.2. Teneur en flavonoïdes

Les résultats obtenus pour le dosage des flavonoïdes par trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) sont exprimés en milligramme équivalent Quercétine par 100 grammes de matière végétale (mg EQ/100g de MV) en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par la quercétine (Figure 15).

Les teneurs en flavonoïdes obtenus pour les trois extraits d'ail sont représentées dans la figure 24. Nous avons obtenu une valeur de  $7,21 \pm 0,28$  mg EQ/100g de MV dans l'extrait d'ail

frais,  $6,79 \pm 0,23$  mg EQ/100g de MV dans l'extrait d'ail congelé et une valeur de  $4,46 \pm 0,37$  mg EQ/100g de MV dans l'extrait d'ail séché.

Selon les valeurs enregistrées nous avons remarqué que les teneurs en flavonoïdes dans l'extrait frais et congelé sont élevées par rapport à l'extrait d'ail séché.



**Figure 24: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits.**

Les conditions d'extraction dans le présent travail diffèrent de celles utilisées dans d'autres travaux, cela rend la comparaison de nos résultats à la littérature difficile.

Dans des études comparatives réalisées par JANUARTI *et al.* (2019) sur les extraits éthanoliques des deux échantillons d'ail, et celle réalisée par NAGELLA *et al.* (2014) sur les extraits aqueux, le taux des PPT trouvé varie entre 33,5 et 92,22 mg EAG/g et le taux des flavonoïdes est entre 1,02 et 14,48 mg EQ/g.

Les valeurs obtenues concernant la concentration des PPT et flavonoïdes dans notre extrait d'ail frais sont nettement inférieures à ces résultats.

Les résultats obtenus sont inclus dans l'intervalle de 92-119,6 mg EAG/100g de MS pour la teneur de PPT dans des extrait d'ail préparé dans le HCl rapporté par ŠKROVANKOVA *et al.* (2018).

Cette différence de taux de polyphénols et de flavonoïdes obtenue peut être due à la nature du solvant, les conditions d'extraction et de dosage de ces composés phénoliques, les études

suggèrent que l'origine géographique, la composition du sol, le moment de la récolte, les variétés génétiques contribuent aussi à cette variation (SOTO et *al.*, 2016).

Nos résultats ont montré une légère diminution des teneurs des PPT et flavonoïdes pour l'échantillon d'ail congelé, cependant cette diminution est importante pour l'échantillon d'ail séché comparé à l'échantillon d'ail frais. Ces résultats sont corrélés avec ceux trouvés par ÇUBUKÇU et *al.* (2019) dans son étude qui a démontré que la congélation ne donne aucun changement de la teneur de ces derniers et que le traitement thermique diminue la teneur en PPT, cette diminution est observée par PARK et *al.* (2009) pour un extrait d'ail qui a subi un traitement thermique, et ont rapporté que la principale raison de cette perte est l'oxydation enzymatique des PPT.

Le traitement thermique et la congélation ont des effets différents sur la teneur des composés phénoliques. D'après nos résultats la congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  est plus avantageuse pour la conservation de ces composés.

### 2.3. Détermination de la teneur en vitamine C dans les extraits d'ail

L'étude quantitative de la vitamine C est réalisée par le dosage spectrophotométrique pour chaque échantillon selon la méthode décrite dans le chapitre matériel et méthodes utilisant le Folin-Ciocalteu. Les teneurs en vitamine C sont exprimées en milligramme par 100 grammes de matière végétale (mg/100g de MV) en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide ascorbique (Figure 17).

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 25. La teneur en vitamine C est de  $66,7 \pm 1,93 \text{ mg/100g}$  de MV pour l'extrait d'ail frais, de  $59,3 \pm 1,93 \text{ mg/100g}$  de MV pour l'extrait d'ail congelé et de  $15,38 \pm 0,94 \text{ mg/100g}$  de MV pour l'extrait d'ail séché.

Nous avons constaté une légère diminution de la teneur en vitamine C pour l'extrait d'ail congelé tandis que l'extrait d'ail séché a marqué une diminution importante.

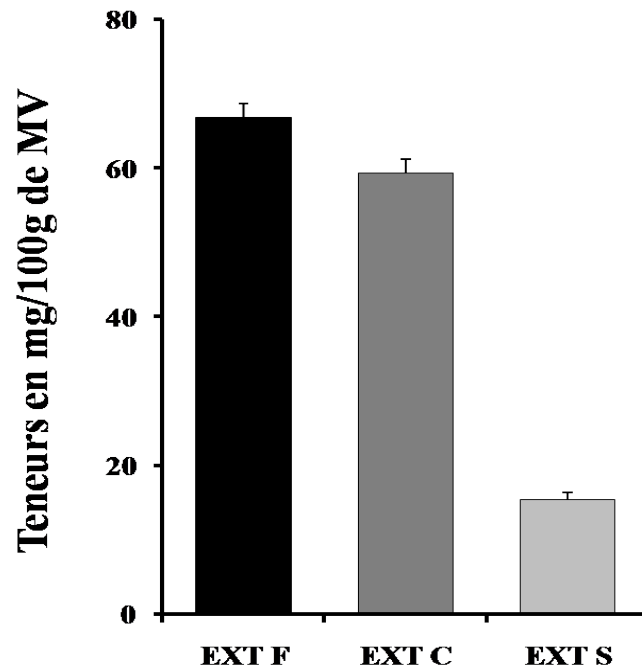


Figure 25 : Teneur en vitamine C dans les différents extraits.

Plusieurs méthodes sont proposées dans la littérature pour mesurer la vitamine C, et ce pour une grande variété de matériaux biologiques, la plus utilisée c'est la méthode d'analyse titrimétrique utilisant le DCPIP. Des méthodes chromatographiques, notamment HPLC et UPLC ont récemment été réalisées par KLIMCZAK et *al.* (2015).

Dans cette étude nous avons utilisé une méthode spectrophotométrique simple, rapide et peu coûteuse. Le taux en vitamine C dans notre extrait d'ail frais est en dessus de celui trouvé par AYDOGMUS et *al.* (2001) qui est de  $21,6 \pm 0,61$  mg/100g.

La vitamine C est souvent utilisée comme un indicateur de la rétention de nutriments thermolabiles dans les produits transformés en raison de sa grande sensibilité aux conditions de traitement et de conservation.

Plusieurs facteurs pré et post récolte influent la teneur de la vitamine C dans les fruits et légumes sont décrits, notamment les conditions climatiques au cours de la croissance, la lumière, la durée et la température de stockage (LEE et *al.*, 2000), cela explique la variation des teneurs.

La congélation entraîne peu de changement de la teneur de la vitamine C, environ 13% de perte, ce pourcentage est proche du résultat trouvé dans notre étude (11% de perte). La perte de vitamine C est plus élevée dans les échantillons ayant subi un traitement thermique, cela revient à sa dégradation et son oxydation sous l'action des oxydases au cours du traitement thermique (LEE et *al.*, 2000).

La rétention de la vitamine C, exprimée par rapport à la masse sèche du produit, est souvent relativement faible après séchage. D'une manière générale, elle est fortement influencée par l'activité de l'eau et la température. Elle est néanmoins souvent d'autant plus faible que la durée de séchage est longue (faible température, forte humidité relative, épaisseur importante de produit) (MARFIL *et al.*, 2008).

Dans des conditions un peu particulières, HSU *et al.* (2012) ont étudié la dégradation de la vitamine C dans différentes températures, ont montré que la dégradation de la vitamine C est proportionnelle à l'élévation de la température, et une dégradation totale de la vitamine C après 8 jours de stockage à 45 °C.

**Tableau IV : Tableau récapitulatif des résultats des différents dosages dans les différents extraits d'ail.**

	<b>Extrait frais</b>	<b>Extrait congelé</b>	<b>Extrait séché</b>
<b>Protéines</b> (g/100g de MV)	2,58±0,11	2,58±0,15	1,04±0,03
<b>Sucres réducteurs</b> (g/100g de MV)	1,14±0,04	1,1±0,04	0,31±0,01
<b>Polyphénols totaux</b> (mg EAG/100g de MV)	94±3,33	92,33±3,11	38,33±4,49
<b>Flavonoïdes</b> (mg EQ/100g de MV)	7,21±0,28	6,79±0,23	4,46±0,37
<b>Vitamine C</b> (mg/100g de MV)	66,7±1,93	59,3±1,93	15,38±0,94

#### **2.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la peroxydase**

Après l'extraction des protéines totales, l'activité enzymatique de la peroxydase pour chaque échantillon d'ail a été déterminée en utilisant l'ortho-dianisidine comme substrat, ainsi que l'effet dose de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de l'extrait a été également étudié.

Le gäiacol est le substrat couramment utilisé pour le suivi de l'activité des peroxydases végétales, mais l'ortho-dianisidine est le bon substrat pour ces enzymes (KHALES et BAAZIZ, 2005). Elles présentent une forte affinité pour l'ortho-dianisidine que pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (NEVES, 2002).

##### **2.4.1. Cinétique enzymatique**

L'oxydation de l'ortho-dianisidine catalysée par les extraits enzymatiques dans les conditions réactionnelles décrites dans la partie matériel et méthodes se produit très

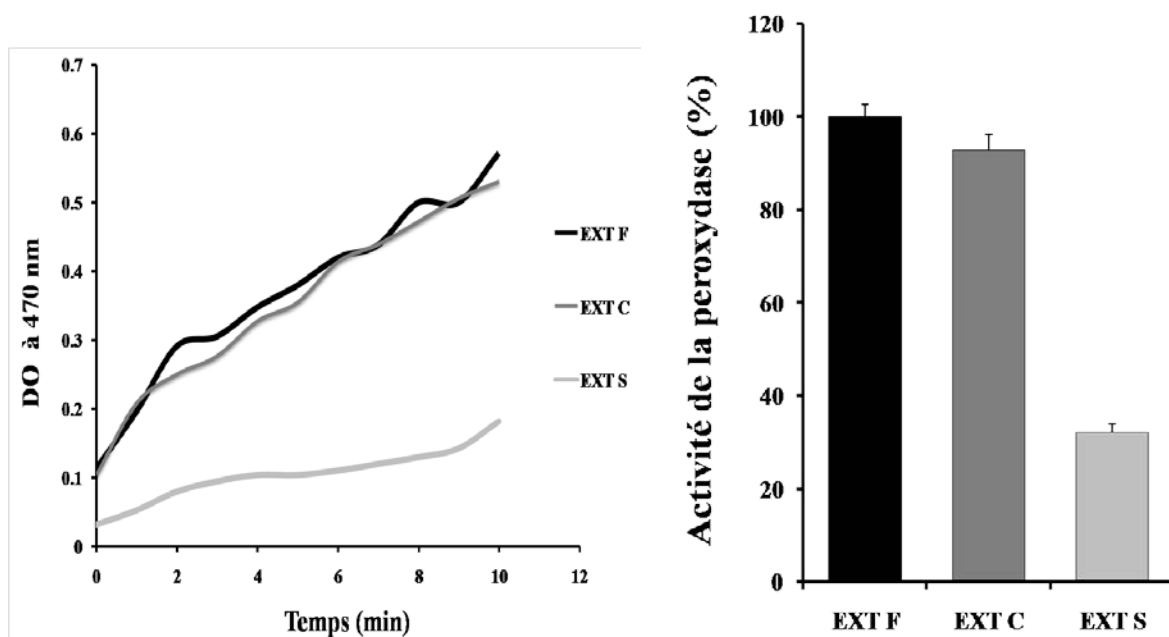
rapidement et le changement de couleur du transparent à l'ambre est facilement observable (Figure 26).

Une réaction à blanc comme témoin négatif a également été réalisée, dans les mêmes conditions, par l'ajout du tampon phosphate au lieu de l'extrait enzymatique. Dans cette réaction, aucune transformation n'a été observée, ce qui montre que les extraits enzymatiques sont responsables de la transformation observée. Le changement de la couleur de la solution montre l'existence de la peroxydase dans les trois extraits d'ail.



**Figure 26 : Réaction d'oxydation de l'ortho-dianisidine catalysée par les extraits d'ail.**

Les résultats de la mesure de l'activité de la peroxydase (oxydoréductase EC1.11.1.7) par l'enregistrement des densités optiques à 470 nm du mélange réactionnel au cours du temps de réaction sont représentés dans la figure 27.



**Figure 27 : Activité enzymatique de la peroxydase dans les différents extraits d'ail.**

L'analyse du graphe de la densité optique du produit d'oxydation de l'ortho-dianisidine qui reflètent l'activité de la peroxydase enregistrée dans les 3 extraits en fonction du temps, montre que seulement 1 minute après le démarrage de la réaction, il y a une augmentation de l'absorbance à 470 nm, ce qui signifie que certaines transformations se sont produites. A partir de 1 minute, cette absorbance augmente considérablement et atteint une valeur plus élevée à 10 minutes. Il apparaît également un comportement typique de l'évolution de la DO en fonction du temps pour les 3 extraits, les courbes présentent une même allure (Figure 27).

L'extrait d'ail frais et l'extrait d'ail congelé présentent un même taux d'activité, les deux courbes sont presque superposées avec des densités optiques élevées, tandis que l'extrait d'ail séché présente une activité avec des densités optiques faibles.

Nos résultats révèlent que les trois extraits d'ail possèdent une activité enzymatique. Le taux d'activité différent d'un extrait à l'autre, ces variations sont présentées sous forme d'histogramme dans la figure 27.

La quantité d'enzyme calculée en unité par minute par gramme de matière végétale pour chaque extrait est illustrée dans tableau suivant.

**Tableau V: Activité de la peroxydase dans les différents extraits d'ail.**

	<b>Activité enzymatique en U/min/g de MV</b>
<b>EXT F</b>	309,1±2,53
<b>EXT C</b>	287±3,33
<b>EXT S</b>	99,58±1,72

A travers le tableau V, il ressort que l'extrait d'ail frais présente la plus forte activité peroxydase (309,1 U/min/g de MV), suivi par l'extrait d'ail congelé (287 U/min/g de MV) et une faible activité a été enregistrée pour l'extrait d'ail séché (99,58 U/min/g de MV).

L'extrait d'ail congelé a conservé presque la totalité de l'activité de la peroxydase, nous avons enregistré uniquement 7% de perte, tandis cette activité a vu une diminution importante dans l'extrait d'ail séché.

La peroxydase est une enzyme thermorésistante dans le système végétal (AGÜERO *et al.*, 2008), son inactivation est utilisée comme un indice de l'efficacité de blanchiment. Nos résultats montrent que l'extrait d'ail séché à 40°C a perdu environ 68% de l'activité de la peroxydase. Cette perte pourrait être due à l'inactivation d'isoformes labiles. En effet, les isoformes labiles et résistants peuvent exister dans la même plante (ATHON et BARETTE,

2002), et l'activité résiduelle serait due aux isoformes résistants ou à la conversion d'une enzyme native à de nouvelles isoformes avec une stabilité thermique améliorée (MACIEL *et al.*, 2007).

### 2.4.2. Effet dose de l'extrait frais sur l'activité de la peroxydase

L'activité de la peroxydase de l'ail a été mesurée à différentes concentrations d'extrait. Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer les courbes de DO en fonction de différentes concentrations de l'extrait enzymatique [1 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25µg/ml] ainsi que les histogrammes des pourcentages d'activité accompagnés des écarts types sont présentés dans la figure 28.

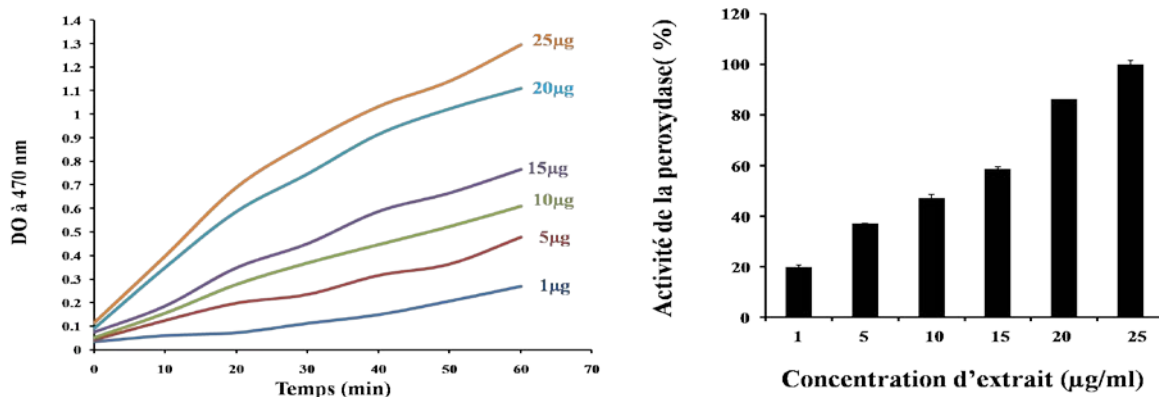


Figure 28 : Effet dose de l'extrait d'ail frais sur l'activité de la peroxydase.

### 2.4.3. Effet dose de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'activité de la peroxydase

L'activité de la peroxydase de l'ail a été mesurée à différentes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2/1000). Les résultats obtenus sont présentés sous forme de courbes de DO en fonction du temps pour les différentes concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5 ; 20 ; 50 ; 75 ; 100µg/ml] ainsi que les histogrammes des pourcentages d'activité accompagnés des écarts types sont présentés dans la figure 29.

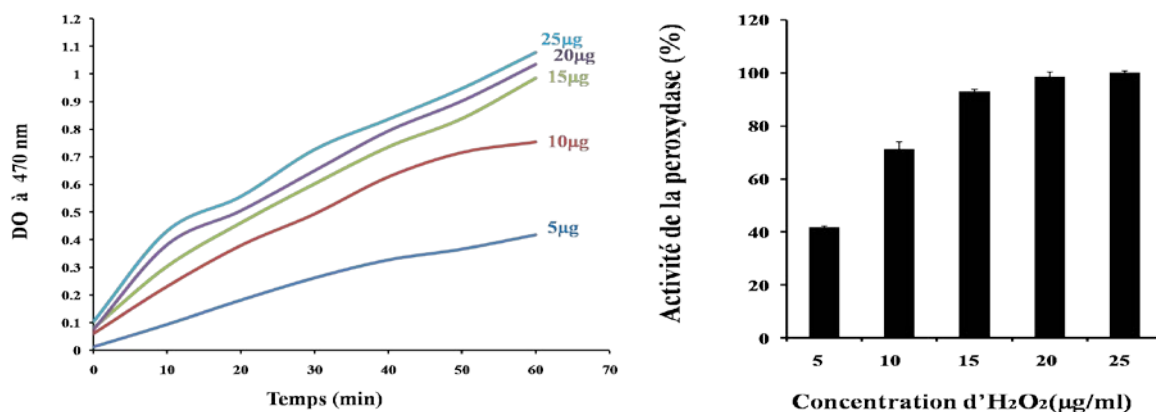


Figure 29: Effet dose de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'activité de la peroxydase.

A partir de ces résultats nous avons constaté que plus les concentrations de l'enzyme et du substrat sont élevées, plus la réaction devient rapide. Les densités optiques augmentent proportionnellement avec les concentrations de l'extrait [1 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25µg/ml] et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5 ; 20 ; 50 ; 75 ; 100µg/ml] dans le milieu réactionnel. Ces résultats montrent que l'activité enzymatique de la peroxydase présente une variation dose dépendante en fonction des concentrations de l'extrait enzymatique et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

L'activité de la peroxydase ainsi que le taux de protéines totales diminuent avec la purification, la peroxydase semi-purifiée présente une haute activité par rapport à la peroxydase purifiée (MACIEL et *al.*, 2007). La purification partielle de la peroxydase est économique, réalisée en un temps court, permet d'obtenir une meilleure activité de la peroxydase avec une réduction de nombre d'étapes de protocole.

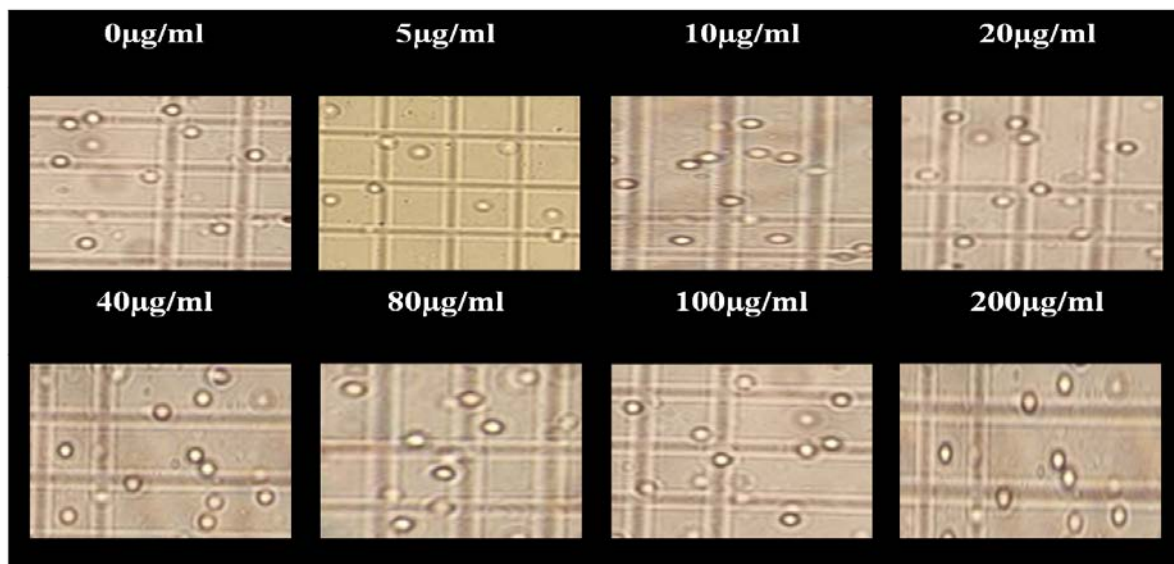
## 2.5. Activités biologiques

Le choix de l'extrait d'ail frais pour tester l'activité anti hémolytique de l'ail est en raison de sa teneur élevée en substances bioactives.

### 2.5.1. Evaluation de l'effet d'extrait d'ail frais sur la viabilité des neutrophiles isolés

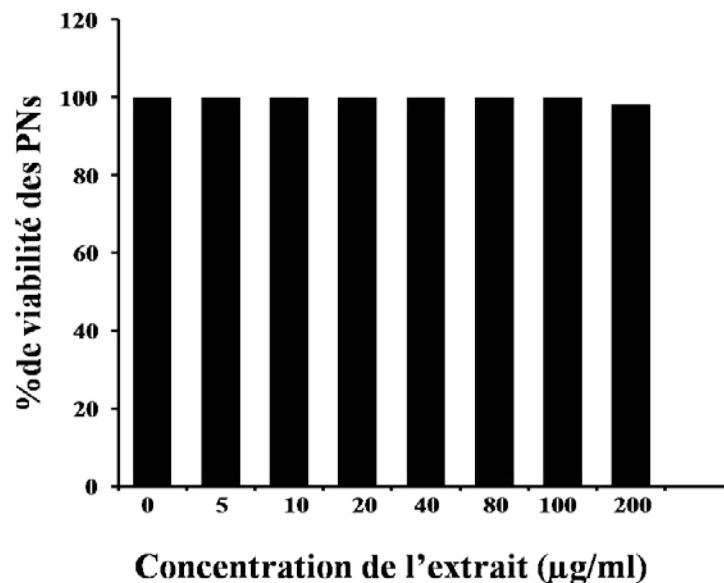
Pour tester l'effet cytotoxique de l'extrait d'ail frais sur les neutrophiles humains isolés, un test de viabilité de ces cellules a été réalisé en utilisant le bleu de trypan, les neutrophiles morts sont colorés en bleu foncé suite à la pénétration irréversible du colorant, alors que les cellules vivantes expulsent le colorant et restent incolores.

Les résultats des observations des cellules mortes sous microscope photonique au grossissement x10 sont représentés dans la figure suivante.



**Figure 30: Observations microscopiques des neutrophiles traités par l'extrait d'ail frais au grossissement X10.**

Le résultat du dénombrement cellulaire exprimé en pourcentage (%) de viabilité des PNs en fonction de la concentration de l'extrait est représenté sous forme d'histogramme.



**Figure 31 : Effet de l'extrait d'ail frais sur la viabilité des PNs.**

Les résultats montrent en comparaison avec le contrôle négatif 0µg/ml d'extrait (PNs non traités), que le nombre de PNs vivants est stable pour toute la gamme de concentration d'extrait d'ail frais étudié [5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80 ; 100 ; 200µg/ml] avec un taux de viabilité de 100% (absence de cellules mortes), ce qui signifie que l'extrait d'ail frais ne présente aucun effet sur la viabilité de ces cellules. Cette étude montre clairement l'absence d'une activité cytotoxique de l'extrait d'ail frais sur les neutrophiles humains isolés.

### **2.5.2. Evaluation de l'activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais**

L'hémolyse (hémo : sang, lyse : perturbation) c'est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges après une durée de vie de 120 jours qui est un laps de temps normal (THOMAS, 2013). Une anémie va apparaître si la moelle ne réussit pas à compenser (UCAR, 2002).

Une hémolyse pathologique ou physiologique se traduit par les signes particuliers dont des modifications biochimiques tels que la diminution du contenu enzymatique, le ralentissement métabolique, la perte des lipides membranaires et phénomènes oxydatifs. Des troubles des échanges ioniques (l'augmentation du flux de Na<sup>+</sup> dans la cellule et diminution de la concentration de K<sup>+</sup> intracellulaire). Des modifications morphologiques conduisant à une réduction de la surface membranaire et/ou hyperhydratation et des modifications de la plasticité par une diminution de la déformabilité des érythrocytes entraînant une stagnation dans les capillaires (BEAUMONT et HERGAUX, 2005).

L'exposition des érythrocytes aux substances nuisibles, comme le milieu hypotonique, les substances oxydantes et la chaleur aboutit à la lyse de sa membrane accompagnée d'hémolyse. L'activité anti hémolytiques révèle la capacité de toute substance à stabiliser la membrane et à réduire le degré de lyse de ces cellules. Dans cette partie d'étude, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet protecteur que pourrait avoir l'extrait d'ail frais sur la préservation de l'intégrité membranaire des érythrocytes.

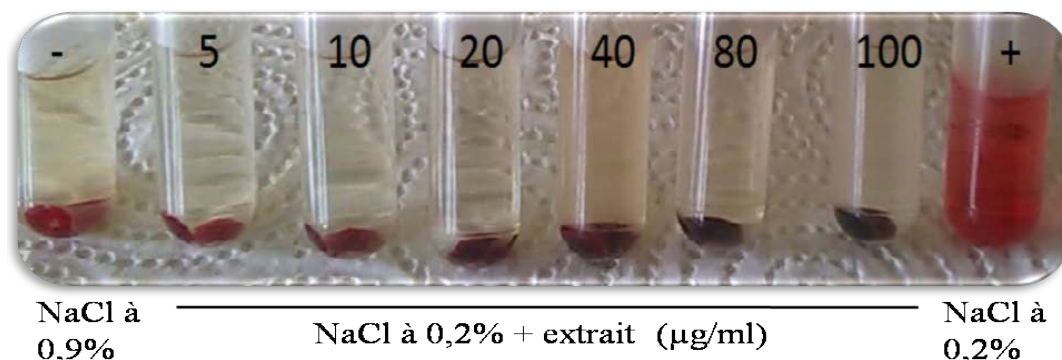
L'étude consiste à traiter la suspension érythrocytaire par différentes concentrations de l'extrait d'ail frais avant l'induction de l'hémolyse et d'évaluer taux d'hémoglobine libérée au spectrophotomètre.

### **2.5.2.1. Activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais contre l'hémolyse induite par le stress osmotique**

Dans un milieu hypotonique, quand la concentration de NaCl dans le plasma diminue par rapport à celle des érythrocytes, l'eau pénètre l'érythrocyte. La membrane cellulaire est relativement inélastique et rompt après seulement une augmentation très légère du volume, ce qui provoque l'ouverture des pores membranaires dénommés pores d'hémolyse laissant la membrane cellulaire (le fantôme) vide et l'hémoglobine est libérée (KALAVANI et *al.*, 2016).

#### **2.5.2.1.1. Observations à l'œil nu**

Une observation directe des résultats est faite à l'œil nu (Figure 32), par comparaison du tube des érythrocytes traités par le NaCl à 0,2% en absence de l'extrait d'ail frais (témoin positif) et du tube des érythrocytes traités par le NaCl à 0,9% (témoin négatif), le surnageant du témoin positif est de couleur rouge, c'est-à-dire que l'hémolyse est à 100%, dans le témoin négatif y'a la formation du culot au fond du tube et un surnageant transparent, cela est dû à l'absence d'hémolyse des érythrocytes. Les tubes des érythrocytes traités par le NaCl à 0,2% et en présence de différentes concentrations d'extrait d'ail frais [5 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80 ; 100µg/ml] présentent des surnageants transparents et des culots d'érythrocytes au fond des tubes, cela s'explique par l'absence totale de l'hémolyse.

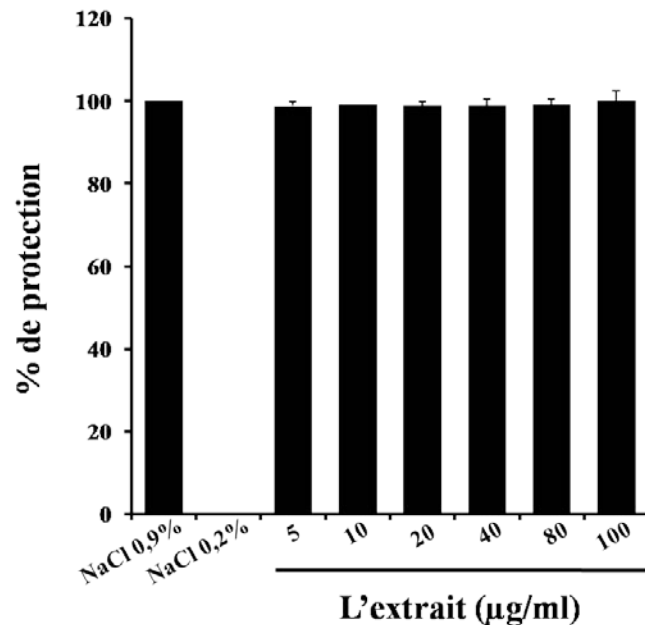


**Figure 32: Processus d'hémolyse par libération de l'hémoglobine.**

### 2.5.2.1.2. Dosage spectrophotométrique de la fuite de l'hémoglobine et le pourcentage de protection

L'influence de l'extrait d'ail frais sur la lyse osmotique des érythrocytes est déterminée en mesurant l'hémolyse à des concentrations croissantes de l'extrait.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 33 exprimés en pourcentage de protection vis-à-vis de l'hémolyse induite par l'hypotonie en fonction des concentrations en extrait.

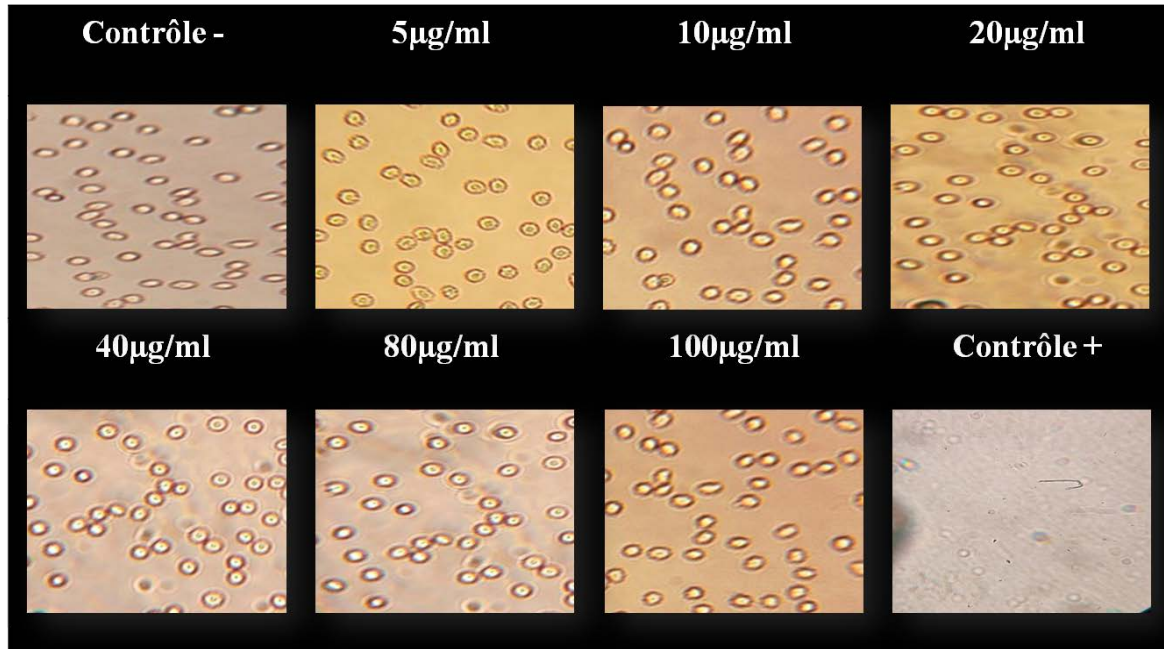


**Figure 33: Taux de protection (%) des érythrocytes traités par le NaCl à 0,2% en présence l'extrait d'ail frais.**

Nous avons constaté l'absence d'hémolyse pour toute la gamme de concentration d'extrait étudié par rapport au contrôle positif (absence de l'extrait). La concentration de 5µg/ml de l'extrait conduit à un taux de protection important de 98,74±1,1% qui reste stable pour toutes les concentrations [10 ; 20 ; 40 ; 80 ; 100µg/ml], reflétant ainsi un effet anti hémolytique très important exercé par l'extrait d'ail frais indiquant une protection des érythrocytes par la présence des composés de cet extrait vis-à-vis de l'hémolyse induite par la solution hypotonique de NaCl à 0,2%. Le suivi de l'hémolyse en fonction du temps a mis en évidence qu'un temps de 3h permet d'avoir un même taux de protection, et qui persiste même après 24h.

### 2.5.2.1.3. Observations microscopiques des érythrocytes

Dans la troisième étape de cette étude nous avons assuré les résultats des étapes précédentes par des observations sous microscope des différents échantillons (Figure 34).



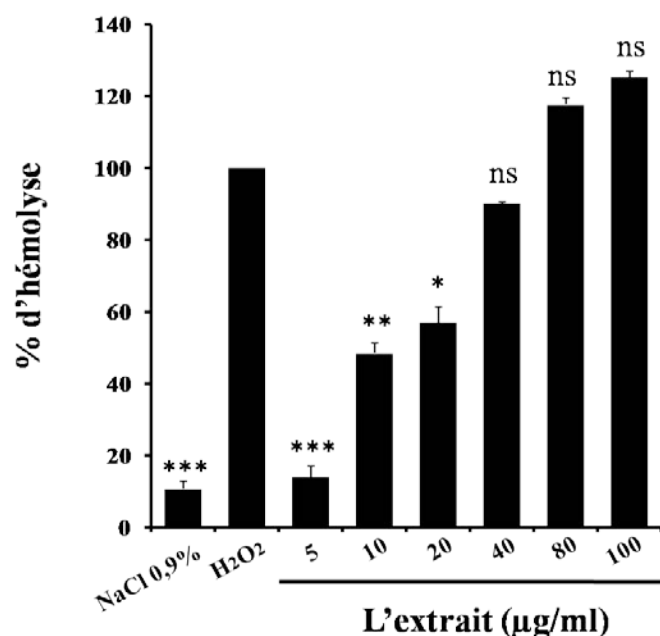
**Figure 34: Observations microscopiques des érythrocytes traités par le NaCl à 0,2% en présence de l'extrait d'ail frais au grossissement X10.**

Les observations par microscope photonique au grossissement x 10 et x 40 ne révèlent aucun changement morphologique des cellules érythrocytaires aussi bien au niveau du contrôle négatif ainsi qu'en présence de l'extrait, et montrent que les membranes cellulaires sont intactes pour toutes les concentrations de l'extrait d'ail frais.

#### **2.5.2.2. Activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais contre l'hémolyse induite par le stress oxydatif**

L'exposition des érythrocytes à un agent oxydant, en l'occurrence l' $H_2O_2$  provoque la peroxydation lipidique, la dégradation des protéines et la perte progressive de la déformabilité liée à l'oxydation des protéines du cytosquelette (SUBOH et *al.*, 2004), ce qui termine par la destruction de la membrane plasmique avec libération du contenu cellulaire (hémoglobine).

Les résultats de l'effet de l'extrait d'ail frais à différentes concentrations sur les érythrocytes en suspension traités par l' $H_2O_2$  sont représentés dans la figure 35 exprimés en pourcentage d'hémolyse.



**Figure 35 : Taux d'hémolyse (%) des érythrocytes traités par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de l'extrait d'ail frais.**

D'après ces résultats nous avons remarqué que le taux d'hémolyse augmente de façon proportionnelle avec la concentration de l'extrait étudié. Les résultats de l'analyse statistique par ANOVA montrent pour une concentration de 5µg/ml de l'extrait d'ail frais une variation très significative de l'effet anti hémolytique par rapport au contrôle positif (hémolyse totale avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en absence de l'extrait), ce qui signifie que l'extrait d'ail frais présente un effet protecteur maximal de 86±2,89% à cette concentration. Pour la concentration de 10µg/ml la variation de l'activité anti hémolytique est significative par rapport au contrôle positif avec un taux de protection de 50%. L'effet anti hémolytique diminue avec l'augmentation de la concentration de l'extrait d'ail frais jusqu'à ce qu'il s'annule à certaines concentrations. La variation de cet effet est non significative pour les concentrations 40, 80 et 100µg/ml par rapport à l'hémolyse totale, avec un taux faible de protection de 10±0,5% pour 40µg/ml et une perte totale du pouvoir protecteur pour des deux concentrations 80 et 100µg/ml.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait d'ail frais présente une activité anti hémolytique à faibles concentrations [5 ; 10 ; 20 ; 40µg/ml] contre l'hémolyse induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec une concentration inhibitrice médiane CI<sub>50</sub> de 10µg/ml.

L'extrait d'ail est riche en plusieurs composés bioactifs dont les polyphénols, la vitamine C et la peroxydase. En présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la peroxydase peut oxyder les polyphénols et de générer des substances qui peuvent induire l'hémolyse à des fortes concentrations de l'extrait, et que la peroxydase catalyse l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau qui est parmi les facteurs induisant l'hémolyse. D'après TAKAHAMA. (2004) la peroxydase peut oxyder les composés phénoliques en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans un mélange de composés phénoliques une série de réaction de transfert radicalaire conduit à la formation d'o-quinones, qui sont des substances toxiques

présentent une variété d'effets dangereux. Les radicaux semi quinones peuvent se lier aux groupements SH ou NH<sub>2</sub> des protéines et provoquant ainsi leur inactivation (BUKOWSKA et al., 2004). Ils se lient de manière irréversible à divers constituants cellulaires, et donc ils peuvent endommager la membrane plasmique des globules rouges et détériorer sa structure (THIRAVIAM et al., 2005). Ce qui peut expliquer la perte de protection de l'extrait d'ail frais étudié à des fortes concentrations.

MORIGUCHI et al. (2001) arrivent à prouver que l'extrait d'ail vieilli préserve la structure, la stabilité ainsi que la fonction des érythrocytes d'après les résultats trouvés dans leur étude qui montrent une capacité de l'extrait d'ail vieilli a diminué le taux d'hémolyse due à la peroxydation et la non peroxydation des érythrocytes et a empêché la diminution de la déformabilité érythrocytaire dans des conditions d'un stress osmotique.

SUBOH et al. (2004) d'après leur étude sur l'effet de plusieurs plantes médicinales dont l'ail sur la dégradation des protéines, la peroxydation lipidique, la déformabilité et la fragilité osmotique des érythrocytes exposés *in vitro*, a montré l'efficacité de l'extrait d'ail dans la protection des érythrocytes contre ces dommages induits par le stress oxydatif et le stress osmotique.

Dans le même axe, l'étude comparative de BORIS et al. (2019) des propriétés anti oxydantes et anti hémolytiques a montré que l'extrait aqueux d'ail présente une bonne capacité de piégeage des radicaux libres reflétant ainsi sa protection élevée (97,87%) contre l'hémolyse induite par les radicaux libres qui provoquent la lyse des érythrocytes.

Les extraits de plantes grâce à leurs activités biologiques ont longtemps été utilisés dans la prévention et le traitement de certaines maladies, mais leur mécanisme d'action au niveau cellulaire et moléculaire n'est pas encore complètement connu. D'après plusieurs articles testant l'effet anti hémolytique des extraits de plantes nous avons remarqué que les composés phénoliques sont responsables de cette activité, par leur action directe en se liant à la membrane ou indirectement par le piégeage des radicaux libres.

Dans le cadre d'identification de la cible potentielle des polyphénols végétaux dans les érythrocytes deux études ont été réalisées, cas d'un stress osmotique utilisant une concentration hypotonique de NaCl (CYBORAN et al., 2012) et d'un stress oxydatif provoqué par HOCl (SUWALSKY et al., 2007). Les résultats de ces études indiquent que les érythrocytes deviennent moins sensibles à l'hémolyse sous l'effet de l'extrait phénolique.

Les polyphénols provoquent un changement dans la phase lipidique de la membrane. Du fait de leur caractère amphiphile s'incorporent principalement dans les régions hydrophiles des lipides (emballage des têtes polaires des lipides) de la couche externe de la membrane érythrocytaire, ce qui assure la résistance des érythrocytes dans ces conditions de stress (SUWALSKY et al., 2006 ; CYBORAN et al., 2012).

Les polyphénols ont la capacité de stabiliser la membrane des globules rouges contre la lyse osmotique, grâce à la répartition des composés phénoliques dans les membranes cellulaires et la restriction qui en résulte sur la fluidité de la membrane pourrait gêner stériquement la diffusion des radicaux libres et ainsi diminuer la cinétique des réactions radicalaires (SUWALSKY *et al.*, 2007).

Un autre mode d'action des polyphénols sur  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPase qui sont des glycoprotéines membranaires qui assurent une morphologie normale de la cellule en maintenant l'équilibre de concentration d'ions entre le milieu intra et extra cellulaire des érythrocytes, a été démontré par l'étude de ZHAO en (2017). Cette étude a montré que le stress oxydatif ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) inhibe significativement l'activité des ATPases ce qui peut induire l'hémolyse, le prétraitement des érythrocytes avec des extraits phénoliques, peut maintenir et même augmenter l'activité des ATPases, ce qui permet le maintien d'équilibre entre les 2 milieux.

Les flavonoïdes sont connus par leur activité antioxydante grâce à leurs groupements hydroxyles fortement réactifs. Ils exercent cette activité en provoquant l'arrêt de l'augmentation de la microviscosité des membranes des érythrocytes, induite par la peroxydation lipidique (GHEDIRA, 2005), et préviennent des dommages oxydatifs causés dans les érythrocytes par la chélation du fer dans la cellule.

D'après l'étude réalisée par MIRON *et al* en (2000) sur le mode d'action de l'allicine, le principal composé biologiquement actif des extraits d'ail fraîchement broyés a montré une diffusion rapide de l'allicine à travers la membrane des globules rouges humains résultant de la perméabilité élevée de cette dernière et une haute réactivité avec des thiols (SH) intracellulaires, ce qui probablement empêche leur oxydation.

*Conclusion et  
perspectives*

Dans la première partie de ce travail nous avons étudié l'impact de la congélation et le séchage sur les composants biochimiques et bioactifs de l'ail « *Allium sativum* ». Dans une deuxième partie, nous avons cherché à déterminer l'activité anti hémolytique de l'extrait d'ail frais.

Notre passage au laboratoire était fructueux en résultats mais aussi en méthodes, car nous avons mis au point un protocole de dosage de la vitamine C par spectrophotométrie, et avons appliqué le dosage de peroxydase dans un extrait végétal.

Du coté résultats, l'analyse biochimique des extraits d'ail frais, congelé et séché montrent que les trois extraits sont riches en protéines, sucres réducteurs, PPT, flavonoïdes et vitamine C, mais avec des concentrations variables qui dépendent fortement du traitement physique appliqué. A travers cette étude, nous sommes arrivés à conclure que la congélation est la méthode qui a permis de préserver la majorité des substances biochimiques et bioactives de l'ail. Nous avons également montré que les gousses d'ail sont riches en peroxydase, son activité persiste après congélation, mais très peu après le séchage.

Le test anti hémolytique réalisé sur des érythrocytes soumis à un stress osmotique ou à un stress oxydatif. L'extrait d'ail frais « *Allium sativum* » riche en substances antioxydantes et bioactives a montré un effet protecteur intéressant de l'intégrité des membranes cellulaires. Ce même extrait n'a montré aucun effet cytotoxique vis-à-vis des neutrophiles humains isolés, même à de fortes concentrations.

Nous pouvons conclure que la plante sélectionnée dans ce travail *Allium sativum* contient des molécules très intéressantes qui peuvent être considérées comme des agents antioxydants cela confirme son utilisation très fréquente en médecine traditionnelle, et incite son emploi pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires.

Le domaine de la recherche scientifique doit orienter son intérêt vers des substances anti hémolytiques d'origine végétale puisque les composés phytochimiques présents dans les végétaux ont un potentiel de prévenir les maladies chroniques, et les effets secondaires et indésirables engendrés par les médicaments.

Ce travail peut être considéré comme un point de départ pour d'autres travaux de recherche sur les bienfaits de l'ail. Il serait intéressant d'approfondir cette étude par des techniques plus poussées et de réaliser :

- Une purification de la peroxydase de l'ail et la caractérisation des paramètres cinétiques de cette enzyme afin de l'appliquer dans le domaine industriel.
- Une purification et une identification des molécules responsables de ces activités biologiques.

- Une étude de l'activité de ses molécules fractionnées et la synergie entre elles, et la détermination de leurs mécanismes réels par lequel agit.
- Une étude de l'effet de l'extrait d'*Allium sativum* sur les fonctions des neutrophiles.
- Etude d'autres propriétés biologiques de cette plante à savoir l'activité anti bactérienne, activité anti virale et l'activité anti inflammatoire.
- Des études *in vivo* de l'effet de l'extrait d'*Allium sativum* pour comprendre la réaction de l'organisme vis-à-vis des différents composés de l'extrait dont les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.

*Références  
bibliographiques*

**A**

ABDEL-DAIM M.M., ABUSHOUK A.I., BUNGĂU S.G., BIN-JUMAH M., EL-KOTT A.F., SHATI A.A., ALEYA L., ALKAHTANI S. (2020). Protective effects of thymoquinone and diallyl sulphide against malathion-induced toxicity in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–8. DOI: 10.1007/s11356-019-07580-y.

AGOSTINI, E., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., ARNAO, M. B., MILRAD, S. R., TIGIER, H. A. et ACOSTA, M. (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35(1), 1. DOI: 10.1042/ba20010049.

AGÜERO, M. V., ANSORENA, M. R., ROURA, S. I., et DEL VALLE, C. E. (2008). Thermal inactivation of peroxidase during blanching of butternut squash. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 401–407. DOI:10.1016/j.lwt.2007.03.029.

AHERNE, S. A. et O'BRIEN, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81. DOI:10.1016/s0899-9007(01)00695-5.

AKROUT, A., GONZALEZ, L. A., EL JANI, H. et MADRID, P. C. (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 342-347. DOI:10.1016/10.fct.2010.11.003.

Anonyme1: [https://uses.plantnetproject.org/fr/Allium\\_sativum\\_\(PROTA\)#:~:text=Origine%20et%20r%C3%A9partition%20g%C3%A9ographique,de%20diversit%C3%A9%20dans%20le%20Caucase.](https://uses.plantnetproject.org/fr/Allium_sativum_(PROTA)#:~:text=Origine%20et%20r%C3%A9partition%20g%C3%A9ographique,de%20diversit%C3%A9%20dans%20le%20Caucase.)

ASDAQ S.M.B., INAMDAR M.N. (2011) Pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions of propranolol with garlic (*Allium sativum*) in rats. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2011:824042. DOI: 10.1093/ecam/neq076.

ATHON GE, BARETT DM. (2002). Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 50(14): 4119-4125. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf011698i>.

**B**

BANFITEBIYI, G., KOKOU, A., SIMPLICE, D.K., YAOVI, A.A., et SIMPORE, J. (2018a). Effect of Aqueous garlic extract on biofilm formation and antibiotic susceptibility of multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates in Togo. *International Journal Advanced Multidisciplinary Research* 5, 23-33. DOI:10.19044/esj.2019.v15n6p74

BATIHA Y GABER EL-SABER, AMANY MAGDY BESHBIHY Y, LAMIAA G. WASEF, YASER H. A. ELEWA, AHMED A. AL-SAGAN, MOHAMED E. ABD ELHACK, AYMAN E. TAHA, YASMINA M. ABD-ELHAKIM AND HARI PRASAD DEVKOTA. (2020). Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum L*): A Review. Received: 27 February 2020; Accepted: 12 March 2020; Published: 24 March 2020. PMID: 32213941.

BAYAN L., KOULIVAND P.H., GORJI A.(2014). Garlic: A review of potential therapeutic effects. *Avicenna J. Phytomed.* 4:1–14.PMID :25050296.

BEAUMONT F.et HERGAUX C. (2005) .Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques ; régulation par l'hépcidine C. *Transfusion Clinique et Biologique.*p 123–130.DOI :10.1007/j.traccli.2005.04.017.

BEDOUHÈNE S, DANG P M-C, HURTADO- NEDELEC M , EL-BENNA J.(2020). Neutrophil degranulation of azorophil and specific granules. *Neutrophil 2020*,volume 2087.DOI:10.1007/978-1-0716-0154-9\_16.

BENZEGGOUTA N. (2005). Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments. Mémoire de Magister. Pharmacochimie. Université Mentouri de Constantine. Algérie.

BERTHET, O. (2014). Y A-T-Il Une Place Pour La Phytothérapie Dans La Prévention Des Maladies Cardiovasculaires ? .Doctorat, Joseph Fourier. Retrieved from.

BOIZOT, N et CHARPENTIER, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, 79-82.

BORIS G. K. AZANTSA., MARY-ANN A. MBONG., GUY RN TAKUISSU., ROSANE S. MATSINKOU., IMELDA L. N. DJUIKOO1, JANVIER F. YOUOVOP., JUDITH L. NGONDI1et JULIUS E. OBEN. (2019). Anti-hemolytic, Anti-lipid Peroxidation and Antioxidant Properties of Three Plants Locally Used to Treat Metabolic Disorders: *Allium sativum*, *Persea americana* and *Citrus sinensis*. *Journal of Food Research*; Vol. 8, No. 4. DOI:10.5539/jfr.v8n4p89.

BRADLEY PP, PRIEBAT DA, CHRISTENSEN RD, ROTHSTEIN G. (1982).Measurement of cutaneous inflammation; estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78:206–209.

BRUNETON J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4e éd. Paris; Cachan: Éd. Tec& doc ; Éd. médicales internationales,1269p.

BUKOWSKA, B.et KOWALSKA, S. (2004). Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters*, 152(1), 73–84.DOI:10.1016/j.toxlet.2004.03.025.

### C

CAVAGNARO, P. F., CAMARGO, A., GALMARINI, C. R.et SIMON, P. W. (2007). Effect of cooking on garlic (*Allium sativum* L.) antiplatelet et activity and thiosulfinates content. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4) : 1280-1288.DOI:10.1021/jf062587s.

CHAN JY., YUEN AC., CHAN RY., CHAN SW. (2013).A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. *Phytother Res.* 27:637–646.DOI:10.1002/ptr.4796.

CHEN Y., SUN J., DOU C., LI N., KANG F., WANG Y., CAO Z., YANG X., DONG S. (2016). Alliin attenuated RANKL-induced osteoclastogenesis by scavenging reactive oxygen species through inhibiting Nox1. *Int.J. Mol. Sci.*17:1516. DOI: 10.3390/ijms17091516.

CHEYNIER, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S–229S.DOI:10.1093/ajcn/81.1.223S.

CHUNG L. (2006). The antioxydant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, Allicine and allyl disulfide.*J Med Food.* 9:205-13.

CORZO-MARTÍNEZ M., CORZO N., VILLAMIEL M. (2007).Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci Technol.* 18(12):609-25.DOI:10.1007/j.tifs.2007.07.011.

CYBORAN, S., OSZMIAŃSKI, J.et KLESZCZYŃSKA, H. (2012). Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 17(1). DOI: 10.2478/s11658-011-0038-4.

### D

DETHIER B. (2010). Contribution à l'étude de la synthèse de l'alliine de l'ail. Mémoire de Master, Université de Liège. Belgique.

DIAO M., OUÉDRAOGO N., BABA-MOUSSA L., SAVADOGO PW., N'GUESSAN AG., BASSOLÉ IHN.et DICKO MH. (2011). Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. *Biodegradation*, 22(2): 389-396. DOI: 10.1016/s10532-010-9410-8.

DIAO MAMOUNATA., RAMATOU HAWAN DEMBELE., KIESSOUN KONATE. et MAMOUDOU H. DICKO. (2019). Etude comparative des peroxydases de dix (10) plantes supérieures couramment rencontrées au Burkina Faso. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 13(6): 2533-2545. DOI: 10.4314/ijbcs.v13i6.9.

DOUAOUYA L. (2016). Investigation phytochimique et étude des activités biologiques d'une variété locale de *Allium sativum*. Thèse de doctorat ès sciences en biochimie, Faculté des sciences département biochimie, Annaba, 135 p.

DUBEY H., SINGH A., PATOLE A.M., TENPE C.R. (2017). Antihypertensive effect of allicin in dexamethasone-induced hypertensive rats. *Integr. Med. Res.* 6:60–65. DOI: 10.1016/j.imr.2016.12.002.

DUFRESNE C., OUELLET C. (2010). Filière des plantes médicinales biologiques du QUÉBEC. L'ail, Guide de production sous régie biologique [En ligne]. Québec, 29 p. Disponible sur : FPMQ : [www.plantesmedicinales.qc.ca](http://www.plantesmedicinales.qc.ca).

### *E*

EBRAHIMZADEH, M.A., S.F NABAVI., S.M NABAVI. et B. ESLAMI. (2010). Antioxidant and antihemolytic activities of *mentha piperita* . *Pharmacologyonline* .9: 744-52. DOI: 10.2478/s11535-010-0013-5.

EL-BENNA, J.et DANG, P. M.C. (2007). Analysis of Protein Phosphorylation in Human Neutrophils. *Methods in Molecular Biology*, 85–96.

EL ICHI, S., ABDELGHANI, A., HADJI, I., HELALI, S., LIMAM, F.et MARZOUKI, M. N. (2008). A new peroxidase from garlic (*Allium sativum*) bulb: its use in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensing. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 51(1), 33. DOI:10.1042/BA20070141.

ERDMAN, J. W., BALENTINE, D., ARAB, L., BEECHER, G., DWYER, J. T., FOLTS, J., ... BURROWES, J. (2007). Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 718S–737S. DOI:10.1093/jn/137.3.718S.

### *G*

GERGES GEAGEA, A. (2015). Les Bienfaits de l'Ail sur la Santé. *HUMAN & HEALTH*. 31:46-47.

GHEDIRA, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*, 3(4), 162–169. DOI:10.1007/s10298-005-0096-8.

GIRRE .L. (1980). Connaître et reconnaître les plantes médicinales. Rennes: Ouest France. Pp 333.

GOETZ, P et GHEDIRA.K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. *Springer Science & Business Media*.

GU X., WU H., FU P. (2013). Allicin attenuates inflammation and suppresses HLA-B27 protein expression in ankylosing spondylitis mice. *BioMed Res. Int.* 2013:171573. DOI: 10.1155/2013/171573.

### **H**

HIKMET CAN ÇUBUKÇU., NAZLI SEDA DURAK KILIÇASLAN., İLKER DURAK. (2019). Different effects of heating and freezing treatments on the antioxidant properties of broccoli, cauliflower, garlic and onion. An experimental in vitro study. *Sao Paulo Med J.* 137(5):407-13. DOI: 10.1590/1516-3180.2019.004406082019.

HOBAUER R., FRASS M., GMEINER B., KAYE A.D., FROST E.A.(2000). Garlic extract (*Allium sativum*) reduces migration of neutrophils through endothelial cell monolayers. *Middle East J. Anaesthesiol.* 15:649–658.PMID:11330220.

HSU, H. Y., TSAI, Y. C., FU, C. C.et WU, J. S. B. (2012). Degradation of Ascorbic Acid in Ethanolic Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(42), 10696–10701.

### **I**

IKA BUANA JANUARTI., HUDAN TAUFIQ., SULISTYANINGSIH. (2019). The correlation of total flavonoid and total phenolic with antioxidant activity of single bulb garlic (*Allium sativum*) from tawangmangu and magetan. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 16(2), 96-103. DOI :10.24071/jpsc.001798.

ISERIN, P. (2001). Encyclopedia of Medicinal Plants. Département de phytothérapie à la faculté de médecine de Bobigny, Larousse. p 59.

### **J**

S. K. JAGOTA.et D H. M. DANI .(1982). A New Calorimetric Technique for the Estimation of Vitamin C Using Folin Phenol Reagent.*Analytical biochemistry*, 127, 178-182.DOI:10.1016/0003-2697(82)90162-2.

JANG H.J., LEE H.J., YOON D.K., JI D.S., KIM J.H., LEE C.H. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents. *Food Sci. Biotechnol.* 27:219–225. DOI: 10.1007/s10068-017-0246-4.

JAMES OMALE ET MORDECAI ALEWO IDRIS. (2014). *In vitro* Anti hemolytic Activity of *Gymnema Sylvestre* Extracts Against Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Induced Haemolysis in Human Erythrocytes. Department of Biochemistry, Kogi State University, Anyigba, Nigeria, 861-869. *AJPCT*[2][7][2014]861-869.

JEONG Y.Y., RYU J.H., SHIN J.H., KANG M.J., KANG J.R., HAN J., KANG D. (2016). Comparison of anti-Oxidant and anti-Inflammatory effects between fresh and aged black garlic extracts. *Molecules*. 21:430. DOI: 10.3390/molecules21040430.

JIN P., KIM J.A., CHOI D.Y., LEE Y.J., JUNG H.S., HONG J.T. (2013). Anti-inflammatory and anti-amyloidogenic effects of a small molecule, 2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal in Tg2576 Alzheimer's disease mice model. *J. Neuroinflamm.* 10:767. DOI: 10.1186/1742-2094-10-2.

### **K**

KALAVANI, R., BANU, R. S., JEYANTHI, K. A., SANKARI, T. U., et KANNA, A. V. (2016). Evaluation of anti-inflammatory and antibacterial activity of *Pithecellobium dulce* (Benth) extract. *Biotechnological Research*, 2(4), 148-154.

KHALES, A. et BAAZIZ, M. (2005). Quantitative and qualitative aspects of peroxidases extracted from cladodes of *Opuntia ficus indica*. *Scientia Horticulturae*, 103(2), 209–218. DOI:10.1016/j.scienta.2004.05.006.

KIM., JEONG-YOUN., YOUNG-CHUN LEE. et KEUN-SUNG KIM. (2002). Effect of Heat Treatments on the Antimicrobial Activities of Garlic (*Allium sativum*). *Microbiol. Biotechnol.*, 12(2), 331–335.

KLIMCZAK, I. et GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A. (2015). Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chemistry*, 175, 100–105. DOI: 10.1016/j.food.chem.2014.11.104.

KRCMAR M. (2008). *L'ail: saveurs et vertus*. Paris: Grancher. 170p.

KUDA T., IWAI A., YANO T. (2004). Effect of red pepper *Capsicum annuum* var. conoides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow. *Food Chem. Toxicol.* 42:1695–1700. DOI:10.1016/j.fct.2004.06.007.

### **L**

LAWSON LD. (1996). The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic, in : Koch H.P., Lawson L.D. (Eds.), *Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum* L., Williams and Wilkins, Baltimore, 1996, 37-108.

LEE, S. K. et KADER, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20(3), 207–220.

LEE J., KOO N. ET MIN D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3.21-33. DOI:10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x.

LI Z., LE W., CUI Z. (2018). A novel therapeutic anticancer property of raw garlic extract via injection but not ingestion. *Cell Death Discov.* 4:108. DOI: 10.1038/s41420-018-0122-x.

LISCIANI S., GAMBELLI L., DURAZZO A., MARCONI S., ROSSETTI E., GABRIELLI P., ALTEROAGUZZI., OLINDOTEMPERINI et MARLETTA L. (2017). Carbohydrates Components of Some Italian Local Landraces: Garlic (*Allium sativum* L.) Sustainability, 9, 1922. DOI: 10.3390/su9101922.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARRRA L. et RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

LUGASI A., HOVARI J., SAGI K. V. ET BIRO L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedientis* 1-4 : 119-125.

LÜTHJE, S. et MARTINEZ-CORTES, T. (2018). Membrane-Bound Class III Peroxidases: Unexpected Enzymes with Exciting Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2876. DOI:10.3390/ijms19102876.

### **M**

MACIEL, H. P. F., GOUVEA, C. M. C. P., TOYAMA, M., SMOLKA, M., MARANGONI, S., et PASTORE, G. M. (2007). Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. *Química Nova*, 30(5), 1067–1071.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C. et JIMÉNEZ, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747. DOI:10.1093/ajin/79.5.727.

MARFIL, P. H. M., SANTOS, E. M., TELIS, V. R. N. ( 2008). Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions. *Food Sci. Technol*, 41, 1642–1647. DOI: 10.1016/j.lwt.2007.11. 003.

MARZOUKI, S. M., LIMAM, F., SMAALI, M. I., ULBER, R. et MARZOUKI, M. N. (2005). A New Thermostable Peroxidase from Garlic *Allium sativum*: Purification, Biochemical Properties, Immobilization, and Use in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detection in Milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 127(3), 201–214.

MARZOUKI, S. M., ALMAGRO, L., SABATER-JARA, A. B., BARCELÓ, A. R. et PEDREÑO, M. A. (2010). Kinetic Characterization of a Basic Peroxidase from Garlic (*Allium sativum* L.) Cloves. *Journal of Food Science*, 75(9), C740–C746.

MEDJELDI MERZOUGUI S. (2012). Peroxydase d'origine végétale : Purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés. Thèse de Doctorat. Biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar Annaba. Algérie.

MERCIER-FICHAUX, B. (2016). L'ail un alicament qui a du piquant! Garlic as a functional food and spice! *Phytothérapie* 14, 176-180. DOI:10.1007/s10298-016-1046-3.

MEREDITH T. J. (2008). The complete book of garlic. London, *Timber Press*.

MERIGA B., MOPURI R., MURALIKRISHNA T. (2012). Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5:391–395. DOI: 10.1016/S1995-7645(12)60065-0.

MIKAILI P., MAADIRAD S., MOLOUDIZARGARI M., AGHAJANSHAKERI S., SARAHROODI S. (2013). Therapeutic uses and pharmacological properties of garlic, shallot, and their biologically active compounds. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 16:1031–1048. PMID:24379960.

MILANE H. (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat, université de Louis Pasteur, Strasbourg I*, pp : 37-36.

MINKER C. (2012). Ail et autres alliées : un concentré de bienfaits pour votre santé, votre beauté et votre jardin. Eyrolles. Paris: Eyrolles, 157p.

MIRON, T., RABINKOV, A., MIRELMAN, D., WILCHEK, M., et WEINER, L. (2000). The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1463(1), 20–30. DOI :10.1016/S0005-2736(99)00174-1.

MONPON B., LEMAIRE B., MENGAL P. ET SURBLED M. (2009). Extraction des polyphénols : Du laboratoire à la production industrielle. Ed INRA-Paris.

MORIGUCHI, T., TAKASUGI, N., et ITAKURA, Y. (2001). The Effects of Aged Garlic extract on Lipid Peroxidation and the Deformability of Erythrocytes. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 1016S–1019S. DOI:10.1093/jn/131.3.1016S.

NEVES VA. (2002). Ionically Bound Peroxidase from Peach Fruit. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 45(1): 7-16.DOI:10.10590/S1516-89132002000100002.

NGO, T. T. (2010). Peroxidase in Chemical and Biochemical Analysis. *Analytical Letters*, 43(10-11), 1572–1587. DOI: 10.1080/00032711003653874.

**O**

OMAR SH.et AL-WABEL NA. (2010). Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharm J.* 18(1):51-8.DOI:10.1016/j.jsts.2009.12.007.

**P**

PARK, J.-H., PARK, Y. K.et PARK, E. (2009). Antioxidative and Antigenotoxic Effects of Garlic (*Allium sativum L.*) Prepared by Different Processing Methods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 244–249. DOI 10.1007/s11130-009-0132-1.

PASSARDI, F., COSIO, C., PENEL, C.et DUNAND, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255–265.DOI:10.1007/s00299-005-0972-6.

PASSARDI, F., THEILER, G., ZAMOCKY, M., COSIO, C., ROUHIER, N., TEIXERA, F.et al. (2007). PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry*, 68(12), 1605–1611. DOI:10.1016/j.phytochem.2007.04.005.

PETROPOULOS, S., FERNANDES, Â., NTATSI, G., PETROTOS, K., BARROS, L.et FERREIRA, I. (2018). Nutritional Value, Chemical Characterization and Bulb Morphology of Greek Garlic Landraces. *Molecules*, 23(2), 319.DOI:10.3390/molecules23020319.

PONCE, A., DEL VALLE, C. et ROURA, S. (2004). Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 37(2), 199-204.DOI:10.1016/j.lwt.1003.7.005.

PANDEY, V. P., AWASTHI, M., SINGH, S., TIWARI, S.et DWIVEDI, U. N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 06(01). DOI: 10.4172/2161-1009.1000308.

PRAVEEN NAGELLA., MUTHU THIRUVENGADAM., ATEEQUE AHMAD., JAEYEON YOON .et ILL-MIN CHUNG .Composition of Polyphenols and Antioxidant Activity

of Garlic Bulbs Collected from Different Locations of Korea. (2014). *Asian Journal of Chemistry*, 26(3). DOI :10.14233/ajchem.2014.16143A.

**R**

RAHMAN K., LOWE G.M., SMITH S. (2016). Aged garlic extract inhibits human platelet aggregation by altering intracellular signaling and platelet shape change. *J. Nutr.* 146:410S–415S. DOI: 10.3945/jn.114.202408.

RATTI, C., ARAYA-FARIAS, M., MENDEZ-LAGUNAS, L., & MAKHLOUF, J. (2007). Drying of Garlic (*Allium sativum*) and Its Effect on Allicin Retention. *Drying Technology*, 25(2), 349–356. DOI: 10.1080/07373930601120100.

RIED K., FAKLER P. (2014). Potential of garlic (*Allium sativum*) in lowering high blood pressure: Mechanisms of action and clinical relevance. *Integr. Blood Press. Control.* 7:71–82. DOI: 10.2147/IBPC.S51434.

ROSS Z.M., O’GARA E.A., HILL D.J., SLEIGHTHOLME H.V., MASLIN D.J. (2001). Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:475–480. DOI: 10.1128/AEM.67.1.475-480.2001.

**S**

SAFFIDINE, K. (2015). Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L, Université Ferhat Abbas-Sétif, thèse doctorat en microbiologie.

SANTHOSHA SG, JAMUNA P, PRABHAVATHI SN. (2013). Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food Biosci* ;3:59-74. DOI:10.1016/j.fbio.2013.07.001.

SCHOU C. Garlic: A Taste for Health [Internet]. 2000 [cité 22 août 2015]. Disponible sur: <http://opensiuc.lib.siu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1488&context=abl>.

SENDL A. (1995). *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 1 Chemistry, analysis, history, botany. *Phytomedicine*;1(4):323-39.

SENNINGER F. (2009). L’ail et ses bienfaits. Saint-Julien-en-Genevois; Genève-Bernex: Editions Jouvence; 94p.

SELA U.R., GANOR S., HECHT I., BRILL A., MIRON T., RABINKOV A., WILCHEK M., MIRELMAN D., LIDER O., HERSHKOVIZ R. (2004). Allicin inhibits SDF-1 $\alpha$ -induced T cell interactions with fibronectin and endothelial cells by down-regulating cytoskeleton rearrangement, Pyk-2 phosphorylation and VLA-4 expression. *Immunology*. 111:391–399. DOI: 10.1111/j.0019-2805.2004.01841.x.

SHANG A., CAO S.Y., XU X.Y., GAN R.Y., TANG G.Y., CORKE H., MAVUMENGWANA V., LI H.B. (2019). Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.) *Foods*. 8:246. DOI: 10.3390/foods8070246.

SHOKRZADEH M., EBADI A.G. (2006). Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum* L.) on *Staphylococcus aureus*. *Pak. J. Biol. Sci.*9:1577–1579. DOI:10.3923/pjbs.2006.1577.1579.

ŠKROVÁNKOVÁ S., MLČEK J., SNOPEK, L et PLANETOVÁ, T. (2018). Polyphenols and antioxidant capacity in different types of garlic. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences.*, vol. 12, issue 1, p. 267-272. DOI:10.5219/895.

SOBENIN I., ANDRIANOVA I., IONOVA V., KARAGODIN V., OREKHOV A. (2012). Anti-aggregatory and fibrinolytic effects of time-released garlic powder tablets. *Med. Health Sci. J.* 10:47–51. DOI: 10.15208/mhsj.2012.9.

SOTO V.C., GONZÁLEZ R.E., SANCE M.M. et GALMARINIC.R. (2016). Organosulfur and phenolic content of garlic (*Allium sativum* L.) and onion (*Allium cepa* L.) and its relationship with antioxidant activity. *Acta Hortic.* 1143. DOI:10.17660/ActaHortic.2016.1143.39.

STALIKAS C, D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.*30, 3268–3295. DOI:10.1002/jffc.200700261.

SUBOH, S. M., BILTO, Y. Y. et ABURJAI, T. A. (2004). Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy Research*, 18(4), 280–284. DOI: 10.1002/ptr.1380.

SULERIA HAR, BUTT MS, KHALID N, SULTAN S, RAZA A, ALEEM M, et al. (2015). Garlic (*Allium sativum*): diet based therapy of 21st century—a review. *Asian Pac J Trop Dis.*;5(4):271-8. DOI:10.1016/S2222/1808(14)60782-9.

SUN L., ZHANG J., LU X., ZHANG L AND ZHANG Y. (2011) Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol.* 49: 2689-2696. DOI:10.1016/j.fct.2011.07.042.

SUWALSKY, M., ORELLANA, P., AVELLO, M., VILLENA, F. et SOTOMAYOR, C. P. (2006). Human erythrocytes are affected in vitro by extracts of *Ugni molinae* leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 44(8), 1393–1398. DOI:10.1016/j.fct.2006.03.003.

SUWALSKY, M., ORELLANA, P., AVELLO, M. et VILLENA, F. (2007). Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 130–135. DOI:10.1016/j.fct.2006.08.010.

### **T**

TAKAHAMA, U. (2004). Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 207–219.

THEORELL H. (1942). Crystalline peroxidase. *Enzymologia*, 10, 250-252.

THIRVIAM G., VIBHA M. et INDU P K. (2005). Antimutagenic and antioxidant activity of quercetin, *Indian journal of experimental Biology* .34.61,67. PMID:15691067.

THOMAS L. (2013). Haemolysis as influence and interference factor. *eJIFCC* vol 13 no 4.

### **U**

UCAR K. (2002) .Clinical presentation and management of hemolytic anemias. *Oncology (Hunting)* 16 septembre; 9 (Suppl 10).p163-70.PMID:12380967.

### **V**

VEITCH, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249–259. DOI:10.1016/j.phytochem.2003.10.022.

VLASOVA, I. (2018). Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control. *Molecules*, 23(10), 2561. DOI:10.3390/molecules23102561.

### **W**

WELINDER K.G. (1979). Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem*, 96, 483-502. DOI:10.1111/j.1432-1033.1979.tb13061.x.

### **X**

XU X., MIAO Y., CHEN J.Y., ZHANG Q. et WANG J. (2015). Effective production of S-allyl-L-cysteine through a homogeneous reaction with activated endogenous

$\gamma$ -glutamyltranspeptidase in garlic (*Allium Sativum*). *J. food sci. technol.*, 52(3), 1724-1729. DOI:10.1007/s13197-013-1138-0.

**Y**

YOU B.R., YOO J.M., BAEK S.Y., KIM M.R. (2019). Anti-inflammatory effect of aged black garlic on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dermatitis in mice. *Nutr. Res. Pract.* 13:189–195. DOI: 10.4162/nrp.2019.13.3.189.

**Z**

ZÁMOCKÝ, M., & OBINGER, C. (2010). Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*, 7–35.

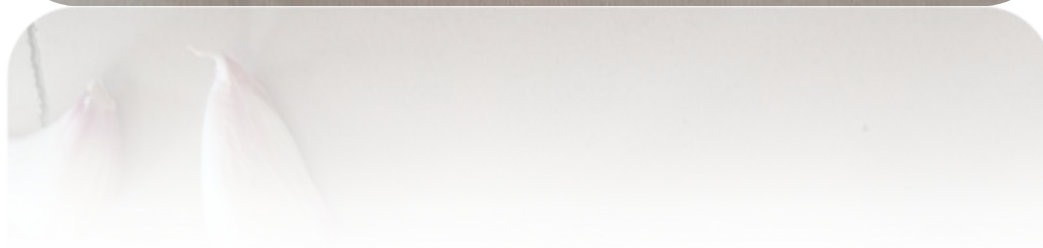
ZENG, Y.; LI, Y.; YANG, J.; PU, X.; DU, J.; YANG, X.; YANG, T.; YANG, S. (2017). Therapeutic role of functional components in Alliums for preventive chronic disease in human being. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2017, 9402849. DOI:10.1155/2017/9402849.

ZEYNEP AYDOGMUS.et SEVIL MUGE CETIN. (2002). Determination of Ascorbic Acid in Vegetables by Derivative Spectrophotometry. Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, 34452, Beyazit, Istanbul-TURKEY, 26 , 697 – 704.

ZHAO, M., YANG, Q., LIN, L., SUN, B., et WANG, Y. (2017). Intracellular antioxidant activities of selected cereal phenolic extracts and mechanisms underlying the protective effects of adlay phenolic extracts on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress in human erythrocytes. *Journal of Functional Foods*, 31, 160–171. DOI :10.1016/j.jff.2017.01.046.

# *Annexes*

**Annexe 1 : Photo originale de l'ail « *Allium sativum* »**

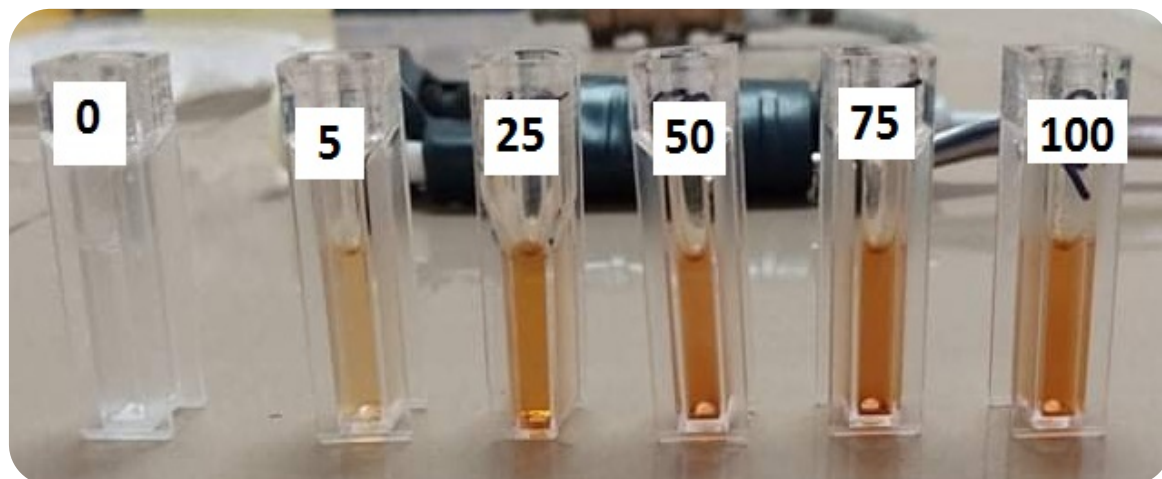


**Annexe 2 : Les différentes étapes de séchage de l'ail**

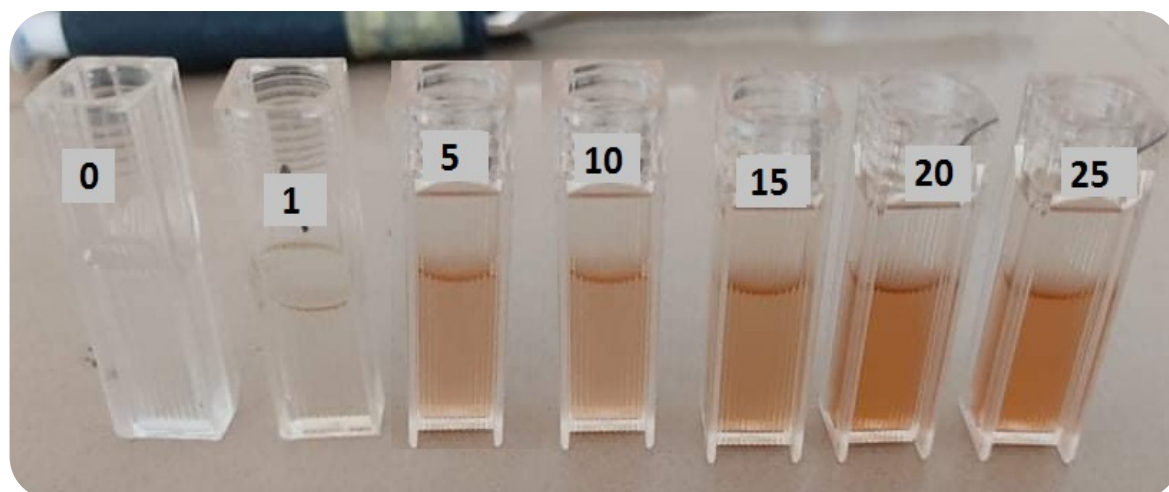


**Annexe 3 : Effet dose de l' $H_2O_2$  (a) et de l'extrait (b) sur l'activité de la peroxydase**

(a)



(b)



Annexe 4 : Appareillage



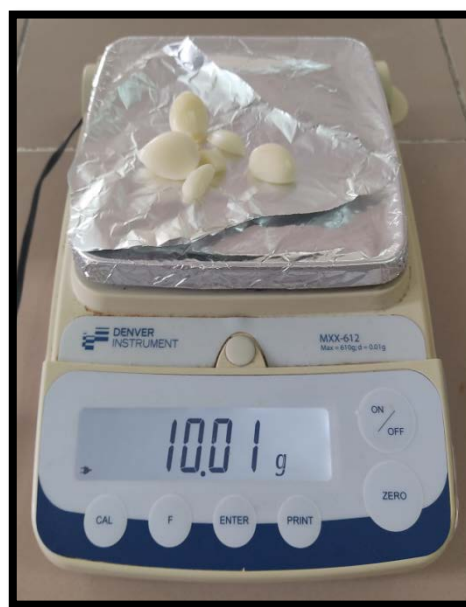
Etuve réglable



Centrifugeuse



Agitateur /plaque chauffante



Balance



Microscope optique



Spectrophotomètre



Hotte à flux laminaire

## Annexe 5 : Test de la variance par ANOVA.

7	Number of groups	8				
8	F	30.38				
9	R squared	0.9300				
10						
11	ANOVA Table	SS	df	MS		
12	Treatment (between columns)	8.152	7	1.165		
13	Residual (within columns)	0.6134	16	0.03833		
14	Total	8.765	23			
15						
16	Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
17	NaCl 0.9% vs 5	-0.006000	0.05308	No	ns	-0.5596 to 0.5476
18	NaCl 0.9% vs 10	-0.4920	4.352	No	ns	-1.046 to 0.06156
19	NaCl 0.9% vs 20	-0.6150	5.441	Yes	*	-1.169 to -0.06144
20	NaCl 0.9% vs 40	-1.082	9.567	Yes	***	-1.635 to -0.5279
21	NaCl 0.9% vs 80	-1.471	13.01	Yes	***	-2.025 to -0.9174
22	NaCl 0.9% vs 100	-1.581	13.99	Yes	***	-2.135 to -1.027
23	NaCl 0.9% vs H2O2	-1.223	10.82	Yes	***	-1.777 to -0.6694
24	5 vs 10	-0.4860	4.299	No	ns	-1.040 to 0.06756
25	5 vs 20	-0.6090	5.387	Yes	*	-1.163 to -0.05544
26	5 vs 40	-1.076	9.514	Yes	***	-1.629 to -0.5219
27	5 vs 80	-1.465	12.96	Yes	***	-2.019 to -0.9114
28	5 vs 100	-1.575	13.93	Yes	***	-2.129 to -1.021
29	5 vs H2O2	-1.217	10.77	Yes	***	-1.771 to -0.6634
30	10 vs 20	-0.1230	1.088	No	ns	-0.6766 to 0.4306
31	10 vs 40	-0.5895	5.215	Yes	*	-1.143 to -0.03594
32	10 vs 80	-0.9790	8.661	Yes	***	-1.533 to -0.4254
33	10 vs 100	-1.089	9.634	Yes	***	-1.643 to -0.5354
34	10 vs H2O2	-0.7310	6.467	Yes	**	-1.285 to -0.1774
35	20 vs 40	-0.4665	4.127	No	ns	-1.020 to 0.08706
36	20 vs 80	-0.8560	7.572	Yes	**	-1.410 to -0.3024
37	20 vs 100	-0.9660	8.546	Yes	***	-1.520 to -0.4124
38	20 vs H2O2	-0.6080	5.379	Yes	*	-1.162 to -0.05444
39	40 vs 80	-0.3895	3.446	No	ns	-0.9431 to 0.1641
40	40 vs 100	-0.4995	4.419	No	ns	-1.053 to 0.05406
41	40 vs H2O2	-0.1415	1.252	No	ns	-0.6951 to 0.4121
42	80 vs 100	-0.1100	0.9731	No	ns	-0.6636 to 0.4436
43	80 vs H2O2	0.2480	2.194	No	ns	-0.3056 to 0.8016
44	100 vs H2O2	0.3580	3.167	No	ns	-0.1956 to 0.9116