

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique en Biologie.
Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante
d'extraits de feuilles de laurier et de sous-produits de l'olivier

Présenté par :

M^{elle} AOUCHICHE Ryma
M^{elle} BOUMGHAR Nassima

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme OUALI-ABDOUNE Samia Maitre assistante chargée de cours UMMTO
Promotrice : M^{elle} DERMECHE Samia Maitre assistante Classe A UMMTO
Examineur 1 : M^r TITOUCHE Yacine Maitre assistant Classe B UMMTO
Examinatrice 2 : M^{me} SEBBANE Dalila Maitre assistante Classe A UMMTO

2014-2015

Remerciements

*Nous remercions Dieu le tout puissant, omnipotent
et miséricordieux, de nous avoir accordé des connaissances
de la science et de nous avoir aidé à réaliser ce travail.*

Au terme de ce travail

*Nous tenons à exprimer toutes nos reconnaissance et remerciement à
M^{elle} DERMECHE.S, qui a fait preuve d'une grande patience et a été
d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Ses conseils, ces
orientation ainsi que son soutien moral et scientifique nous ont permis
de mener à terme se mémoire.*

Son encadrement était plus qu'exemplaire.

*Nous tiendrons aussi à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères
remerciements aux membres de jury :*

M^{me} ABDOUNE S

Mr TITOUCHE Y

M^{me} SEBBANE D

D'avoir accepter d'examiner ce modeste travail.

*Nous remercions chaleureusement et respectivement tous ceux qui ont
contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste projet de fin
d'étude.*

*Enfin, que nos familles trouvent ici l'expression de notre reconnaissance
pour nous avoir fait confiance et soutenu.*

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents

Ma mère, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

A ma sœur IMANE et à mes frères MOHAMED et ALI que j'aime, dont le grand plaisir leurs revient pour leurs conseils, aides, et encouragements. A la famille AOUCICHÉ et YAHIAOUI. Ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de m'apporter. A tous mes professeurs : Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

A mon binôme NASSIMA et toute la famille BOUMGHAR. Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, frères et sœurs de cœur: KATIA, SOUMIA, NESRINE, LYNDIA, LYAMINE, MALEK, THIZIRI, Kamelia, Sarah. Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie. Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

AOUCICHÉ Ryma

*Je dédie ce mémoire
Aux êtres les plus chers : Mes parents,
A mon père,
Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller
toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son
enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et
pour ses précieux conseils.
J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle
soit l'accomplissement de tous tes efforts.*

*A ma mère,
Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa
disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans
les moments les plus difficiles de ma vie.
Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous MES CHERS
PARENTS que je le dois, que Dieu vous garde.*

*A mon cher frère : Mahdi pour t'exprimer
toute mon affection et ma tendresse
A mes tendres et chères sœurs : Ouahiba, Sabrina, Tassadit, Lydia et
Kahina pour leur bonté, leur
générosité de cœur et leur aide si précieuse, et à ma nièce que j'aime*

*A, mes amis et collègues Ryma, Katia, Soumia, Nesrine, Lynda,
Lyamine, et Malek, chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin, et
tous ceux et toutes celles que j'ai involontairement omis de citer et qui
n'en
demeurent pas moins chers*

A

Toute la promotion de Micriobiologie : 2014/2015.

BOUMGHAR Nassima

SOMMAIRE

Résumé

Liste des abréviations

Pages

Index des figures et tableau

Introduction.....1

1^{ère} Partie : Etude bibliographique

Chapitre I : Les plantes médicinales

I.1. Généralités sur l'olivier

I.1.1. Origine et Histoire.....	3
I.1.2. Description botanique.....	3
I.1.3. Taxonomie et systématique.....	4
I.1.4. Répartition géographique.....	4
I.1.5. Utilisation traditionnelle et propriétés pharmacologiques.....	5
I.1.6. Valorisation de sous-produits oléicoles.....	5

I.2. Généralités sur le laurier

I.2.1. Histoire.....	7
I.2.2. Origine	7
I.2.3. Description botanique.....	7
I.2.4. Taxonomie et systématique.....	8
I.2.5. Répartition géographique.....	8
I.2.6. Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques des feuilles de <i>Laurus nobilis</i>	9

Chapitre II : Les polyphénols

II.1. Généralités.....	10
II.2. Structures chimiques et classification.....	11
II.3. Biosynthèse des composés phénoliques.....	13
II.4. Activités biologiques des composés phénoliques.....	14
II.5. Sources des composés phénoliques.....	16
II.6. Méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques.....	17
II.7. Activité antioxydante	18
II.7.1. Généralités.....	18
II.7.2. Définition d'un radical libre et le stress oxydant.....	19
II.7.3. Antioxydants.....	19
II.4. Mécanismes d'action des antioxydants.....	21

Chapitre III : Les biofilms

III.1. Introduction.....	22
III.2. Historique.....	22
III.3. Définition	23
III.4. Les étapes de formation des biofilms.....	23

III.5. Ecologie d'un biofilm.....	26
III.6. Impacts des biofilms et leurs applications.....	27
III.7. Moyens de lutte contre les biofilms.....	30
III.8. Biofilms et antibiorésistances.....	31

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

I- Matériels et Méthodes

I.1. Matériels.....	33
I.2.Méthodes.....	36
I.2.1. Extraction des polyphénol des margines et des feuilles et des brindilles.....	36
I.2.2. Analyse quantitative des échantillons.....	39
I.2.2.1. Rendement d'extraction.....	39
I.2.2.2. Dosage des phénols totaux des margines et des feuilles de l'olivier.....	39
I.2.2.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante.....	40
I.2.3. Évaluation de l'activité antibactérienne	41
I.2.3.1. Tests antibactériens.....	41
I.2.3.1.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	42
I.2.3.1.2. Détermination des paramètres d'inhibition: CMI, CMB.....	42
I.2.4. Evaluation de l'activité antibiofilm.....	43

II- Résultats et Discussion

II.1. Le rendement d'extraction.....	44
II.2. Résultats des dosages de PPT des extraits de feuilles et brindilles de l'olivier sauvage, feuilles de laurier et les margines.....	45
II.3. Résultats de la mise en évidence de l'activité antioxydante.....	49
II.4. Résultats de l'activité antibactérienne.....	51
II.5. Résultats des paramètres d'inhibitions.....	63
II.6. Activité antibiofilm.....	67

Conclusion et perspectives.....	71
--	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Les polyphénols font actuellement l'objet de nombreuses recherches scientifiques visant à explorer et exploiter leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne tant appréciées dans les domaines thérapeutique, alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. C'est dans ce contexte que le présent travail est mené sur l'évaluation des activités biologiques des polyphénols extraits des feuilles du laurier, de l'olivier, brindilles, margines récoltés dans la région de Tizi-Ouzou, réputées pour leurs pharmacopée traditionnelle en l'Algérie. L'objectif été d'analyser leurs propriétés antioxydantes et déterminer leurs activités antibactérienne et antibiofilms sur un ensemble de souches testées (quatorze souches). L'étude *in vitro* a employé les capacités antioxydantes des extraits obtenus après avoir effectuer un dosage de polyphénols totaux par la méthode Folin-Ciocalteu. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque suivie d'une détermination des paramètres d'inhibition CMI/CMB. Alors que l'activité antibiofilm de quelques extraits et l'acide tannique (AT) a été effectuée sur microplaque à 96 puits.

Pour les extraits d'oléastre, de laurier et margines testés, les activités étudiées se sont avérées plus important dans les extrait polaires à l'éthanol contre les bactéries Gram positif que Gram négatif. L'AT et les margines ont exercé un effet antibactérien et antibiofilm considérable.

Mots clés : antioxydantes, antibactérienne, antibiofilms, polyphénols, olivier, laurier.

Abstract

Medicinal plant polyphenol compounds have increased widespread interest in the search of alternative antibacterial agents because of the perception that they are safe and have a long history of use in folk medicine for the treatment of infectious diseases. This study was therefore undertaken to investigate the *in vitro* antioxidant activities, antibacterial and antibiofilm potential of several extracts obtained from olive mill byproducts, olive leaves, olive pruning and noble bay-tree.

All samples were collected in Tizi-Ouzou area in Algeria. the aim of our experiments was to investigate their antioxydant properties, antibacterien and antibiofilms activities, on several bacterial strains (fourteen). *in vitro* study, tested the antioxydant capacity of the DPPH on the extracts obtained after polyphenol quantification by Folin-Ciocalteu method. Antimicrobial activity was evaluated by disc diffusion method followed by CMI/CMB determination, whereas the antibiofilm activity of some extracts was carried out on 96 wells microtitre plates.

For the extracts of oleastre, bay-leaves and olive mill wastewater tested, the studied activities proved more significant in the polar extract as ethanol against Gram positive bacteria than Gram negative. The TA and the olives mill wastewater exerted a considerable antibacterial and antibiofilm effects.

Key words : antioxydant, antibactériel, antibiofilm, polyphenols, olive, bay.

LISTE DES ABREVIATIONS

AG	Acide gallique
AT	Acide tannique
BHIB	Bouillon cœur cervelle
BMH	Bouillon de Müller Hinton
CMB	Concentration Minimal Bactéricide
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
CP	Composés phénoliques
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DPPH	2,2 - diphenyl -1- picrylhydrazyl
EAEB	Extrait à l'acétate d'éthyle brindilles
EAEFL	Extrait à l'acétate d'éthyle feuilles de laurier
EAEFO	Extrait de feuille à l'acétate d'éthyle feuilles d'olivier
EAG	Equivalent Acide Gallique
EEB	Extrait éthanol brindilles
EEFL	Extrait éthanol feuilles de laurier
EEFO	Extraits éthanol feuilles d'olivier
ED	Extrait au diéthyle éther
EDB	Extrait au diéthyle éther, butanol
EEDD	Extrait de feuilles à l'éthanol après délipidation et dipigmentation
EEF	Extrait de feuilles à l'éthanol
EHA	Extrait à l'acétate d'éthyle après délipidation
EHAB	Extrait à l'acétate d'éthyle, butanol après délipidation
EMA	Extrait de margines à l'acétate d'éthyle
EMA1	Extrait de margines à l'acétate d'éthyle 1
EMA2	Extrait de margines à l'acétate d'éthyle 2
EMA3	Extrait de margines à l'acétate d'éthyle 3
EMAD	Extrait de margines à l'acétate d'éthyle délipidé
EMAD_{pH2}	Extrait de margines à l'acétate d'éthyle délipidé à pH 2
EMApH2	Extrait de margines à l'acétate d'éthyle à pH 2
EMDE	Extrait de margines au diéthyle éther
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
M	Margine
MS	Matière sèche
PM	Poids moléculaire
PPT	Polyphénols totaux
R²	Coefficient de corrélation
SD	Déviations standards
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra violet
%	Pourcentage
µg	Microgramme
µl	Microlitre
V	Acide vanillique
V/V	Volume / volume

Liste des tableaux

Tableau I : Principales classes des composés phénoliques (HARBORNE., 1989 ; MACHEIX., 1990 ; CROZIER <i>et al.</i> , 2006 ; FOURNIER LARENTE., 2014).....	12
Tableau II : Activités biologiques de quelques composés phénoliques (BRUNETON, 1999 ; HENNEBELLE, 2006).....	15
Tableau III : Les principales sources alimentaires des polyphénols (KEBBAB, 2014).....	16
Tableau IV : Les produits chimiques utilisés dans notre étude.....	34
Tableau V : Les souches bactériennes utilisées dans notre étude microbiologique.....	35
Tableau VI : Représentant les dilutions réalisées pour la détermination des CMI.....	42
Tableau VIII : Résultats du rendement (%) d'extraction des extraits bruts de feuilles, brindilles de l'olivier sauvage et feuilles de laurier.....	44
Tableau IX : Résultats du dosage des PPT des extraits de feuilles de l'olivier sauvage.....	46
Tableau X : Résultats du dosage des PPT des extraits de feuilles de laurier.....	47
Tableau XI : Résultats du dosage des PPT des extraits de margines.....	49
Tableau XII : Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne $\pm$ SD) provoquées par les extraits de feuilles et brindilles de l'olivier sauvage et leurs sensibilité.....	52
Tableau XIII : Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne $\pm$ SD) exprimés par les extraits de feuilles de laurier noble et leurs sensibilité.....	56
Tableau XIV : Diamètres des zones d'inhibitions et sensibilité des espèces aux extraits de margines. (moyenne $\pm$ SD).....	58
Tableau XV : Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne $\pm$ SD) exprimées par le composé phénolique AT et sensibilité des espèces vis-à-vis de ce CP.....	61
Tableau XVI : Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en $\mu\text{g/ml}$) retenues par les extraits EEBD, EEFLD et l'AT.....	64
Tableau XVII . Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en $\mu\text{g/ml}$) retenues par l'extraits de margines.....	65
Tableau XVIII : Les CMB et la nature de l'activité obtenue par les différents extraits.....	66

Liste des figures

Figure 1. Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin méditerranéen. (CARRION <i>et al.</i> , 2010).....	4
Figure 2. Valorisation de sous-produits oléicoles (DERMECHE <i>et al.</i> , 2013).....	6
Figure 3. Aspect morphologique de <i>Laurus nobilis</i> BELOUED (2005).....	8
Figure 4. La région Méditerranéenne (http://www.franceculture.fr/blog-globe-2010).....	9
Figure 5. Effets biologiques des polyphénols (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002).....	14
Figure 6. Formule des α , γ et δ -tocophérols.....	20
Figure 7. Le piégeage des ERO par les flavonoïdes (MARFAK., 2003).....	21
Figure 8. Représentation schématique de la formation d'un biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> présentant les différentes phases (FILLOUX & VALLET., 2003).....	24
Figure 9. Diversité des infections associées à des biofilms. JL DEL POZO and R PATEL. Doi:10.1038/sj.clpt.6100247. Clin. Pharmacol. Ther. 82 (2007) 204-9 (modifiée).....	28
Figure 10. Protocole d'obtention des extraits aqueux.....	36
Figure 11. Protocole d'extraction des composés phénoliques par les solvants organiques...	37
Figure 12. Protocole d'obtention des polyphénols à partir des margines.....	38
Figure 13. Protocole d'extraction des polyphénols des margines après délipidation.....	39
Figure 14. Protocole du dosage des polyphénols.....	40
Figure 15. Structure du DPPH et sa réduction par l'antioxydant RH (PAIXAO <i>et al.</i> , 2007).....	40
Figure 16. Rendement en (%) des extraits bruts des feuilles, brindilles de l'oléastre et feuilles du laurier.....	44
Figure 17. Courbe d'étalonnage pour le dosage des PPT en équivalent d'acide gallique.....	45
Figure 18. Teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles et brindilles d'oléastre....	46
Figure 19. Teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles laurier.....	47
Figure 20. Cinétique de l'activité antioxydante des différents extraits de l'oléastre, laurier et margines.....	50

Figure 21. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits des feuilles et brindilles de l'olivier sauvage, les feuilles de laurier et les margine.....	51
Figure 22. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exercés par les extraits bruts de feuilles et brindilles de l'olivier sauvage.....	53
Figure 23. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibitions en (mm) exprimées par les extraits bruts de feuilles de laurier.....	57
Figure 24. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition provoqués par les extraits de margine.....	60
Figure 25. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition exprimés par l'acide tannique.....	62
Figure 26. Test d'adhérence de souches bactériennes sur microplaque 96 puits.....	68
Figure 27. Effet antibiofilm de l'AT sur quelques souches formatrices, en microplaque à 96 puits.....	69
Figure 28. Effet antibiofilm de l'EMA sur quelques souches formatrices, en microplaque à 96 puits.....	70
Figure 29. Effet d'extraits (EMA, AT) sur la formation de biofilm exprimé en pourcentage d'inhibition.....	70

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique. Ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés en médecine. En effet, durant les 20 dernières années, il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminué. Les bactéries en sont devenues de plus en plus résistantes (ISERINE, 2001 ; MATYAR *et al*, 2008).

L'usage généralisé des antibiotiques et la prescription à grande échelle parfois inappropriée de ces agents ont entraîné la forte adaptation des souches bactériennes et la sélection des souches multi-résistantes (HAMILTON-MILLER et SHAH, 2004).

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

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartiennent à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques (GAUSSEN *et al*, 1982). Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Parmi celle-ci, *Olea europeae* et *Laurus nobilis*.

En effet, beaucoup d'études épidémiologiques ont démontrée qu'une alimentation riche en aliments d'origine végétale réduit considérablement plusieurs maladies comme les accidents cardiovasculaires et certains types de cancers (DAUCHET *et al*, 2005). Les propriétés préventives des aliments d'origine végétale sont dues à la présence de vitamines C, E et A, de caroténoïdes et de composés phénoliques (GUO *et al*, 2003). Ces molécules sont dotés d'un pouvoir antioxydant, généré par les radicaux libres qui affectent aussi bien l'organisme humain que les différents groupes alimentaires existants (ROLLAND *et al*, 2004).

Les plantes médicinales forment une ressource phytogénétique qui ne cesse de susciter l'intérêt de la communauté scientifique. En effet, depuis des temps immémoriaux, les herbes et les épices ont été utilisées non seulement pour leurs pouvoirs aromatisants mais aussi pour leurs propriétés médicinales, antiseptiques et conservatrices lesquelles actions sont gouvernées par leurs constituants antimicrobiens et antioxydants (ALMEIDA-DORIA et REGITANO-DARCEN, 2000).

L'objectif de notre travail sera la valorisation de la biodiversité de notre région à travers l'étude des extraits du Laurier noble et de sous-produit oléicoles. La valorisation de ces derniers englobera plusieurs aspects, le dosage des polyphénols totaux des extraits et l'évaluation de leurs activités biologiques (antimicrobienne, antibiofilm et antioxydante).

(pathogènes et d'altération des aliments). Cette étude sera effectuée sur quatorze souches de références (pathogène et d'altération).

Notre travail sera scindé en cinq chapitres : Les trois premiers chapitres seront consacrés à l'étude bibliographique comme suit:

- Le premier sera dédié à une description botanique générale des espèces étudiées (*Laurus nobilis* et l'oléastre) et leurs répartitions géographiques;
- Le deuxième chapitre donnera un aperçu sur les polyphénols et leurs modes d'action;
- Le troisième chapitre donnera quelques notions sur les biofilms bactériens.

Dans la deuxième partie, nous axerons notre travail sur des extractions des plantes étudiées en premier temps, suivi d'un dosage par la méthode de folin ciocalteu afin de quantifier leurs compositions en polyphénols totaux. La mise en évidence *in vitro* du potentiel antioxydant des extraits sera présentée dans le chapitre matériels et méthodes. Ainsi, nous emploierons le test du piégeage du radical libre DPPH,. Ce chapitre abordera aussi une étude du pouvoir antimicrobien des extraits polyphénoliques vis-à-vis de quatorze souches bactériennes ainsi, que l'activité antibiofilm envers sept souches. Les résultats et la discussion de chaque expérimentation de notre travail, seront exposés dans le dernier chapitre.

I. Généralités sur l'olivier

I.1.1. Origine et Histoire

L'olivier est un arbre connu depuis l'antiquité grecque et romaine. Il apparaît dans l'histoire et les mythes comme un emblème de fécondité, un symbole de paix et de gloires (LALLAS et al. 2011). D'après BITONTI *et al.*(2000), il en ressort que l'existence de l'olivier remonte au Xème millénaire avant Jésus (BITONTI *et al.*, 2000). Depuis l'antiquité l'olivier a façonné le paysage méditerranéen (DOVERI et BALDONI., 2007). Selon MOUSSOUNI(2011), la culture de l'olivier prend son origine de l'Asie mineur et est étendu de la Syrie jusqu'à la Grèce.

I.1.2. Description botanique

a. Olivier

Olea europaea est une espèce d'arbre ou d'arbustes de la famille des *Oleaceae* répandue à travers l'Afrique, l'Asie et l'Europe Méditerranéenne et dont une variété a été domestiquée et cultivée pour devenir l'olivier, qui se distingue par sa longévité et sa productivité, il peut devenir plusieurs fois centenaires (VILLEMEMEUR et DOSBA, 1997). Selon AMOURETTI et BRUN (1993), l'aspect général de l'olivier est celui d'un arbre toujours vert dont les dimensions et les formes sont extrêmement variable, Il est moyennement trapu (moyenne de 2m), pouvant atteindre les 15 mètres de hauteur (WAGNER., 1999).

a. 1 Les feuilles

Les feuilles de l'olivier sont persistantes, de couleur vert foncé à leur face supérieure et présentent un aspect argenté, du à la purine, à leur face inférieure. (ARTAUD., 2008).

a. 2 Les fleurs

Les fleurs sont petites et blanchâtre jaunâtres, à quatre pétale, sont réunies en grappe à l'aisselle des feuilles. (ARTAUD., 2008)

a. 3 Les fruits ou olive

L'olive est le fruit de l'olivier qui est une drupe avec une pulpe ovoïde, riche en matière grasse, de couleur verte puis noire à maturité complète. Ses dimensions sont très variables suivant les variétés, constituant de trois parties : Epicarpe (la peau de l'olive), Mésocarpe (pulpe de fruit), endocarpe constitué par un fusiforme très dur protégeant une seule graine à albumen huileux (ARTAUD., 2008)

b. Olivier sauvage

L'olivier cultivé (*O. europaea* L. var. *Sativa*) a été dérivé de la domestication de l'olivier sauvage ou l'oléastre (*O. europaea* L. subsp. *sylvestris*) (ZOHARY., 1973). L'oléastre diffère de l'olivier cultivé par la présence des pousses courtes et épineuses, des fruits de petite taille, une faible teneur en huile (TERRAL et ARNOLD-SIMARD., 1996). Les feuilles de l'olivier sauvage sont de courte longueur, de largeur moyenne. Les fruits de la plupart des oliviers sauvages en une forme elliptique, et avec un faible poids. Une corrélation élevée et significative des dimensions du fruit et la teneur en huile a été observée. Cela pourrait être d'intérêt pour l'utilisation des oliviers sauvages. En dépit de cela,

il convient de mentionner que les oliviers sauvages avec des poids de fruits 1,3 g et le pourcentage d'huile d'olive dans la matière sèche 33,8 % est comparable aux valeurs mentionnées pour certains cultivars d'oliviers (HANNACHI *et al.*, 2008).

I.1.3. Taxonomie et systématique

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé "*Olea*" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce cultivée en Méditerranée est "*Olea europaea*", dans laquelle on trouve l'oléastre ou l'olivier sauvage(*Olea europaea sylvestris*.), et l'olivier cultivé(*Olea europaea sativa*.) (SPICHIGER *et al.*, 2002 ; DUPONT *et al.*, 2007).

La classification botanique de l'olivier selon (GHEDIRA., 2008) est la suivante :

Règne : *Plantae*.

Embranchement : *Magnoliopyta*.

Sous- embranchement : *Magnoliopytina*.

Classe : *Magnoliopsida*.

Sous-classe : *Dialypétales*.

Ordre : *Lamiales*.

Famille : *Oleaceae*.

Genre : *Olea*.

Espèces : *Olea europea L.*

Sous-espèce : *O. europea subsp.europea* variété. *sylvestris*

O. europea subsp. Europaea variété. *europeae*

I.1.4. Répartition géographique

L'olivier (*Olea europaea* subsp *europaea* var *europaea*) est l'une des plus anciennes cultures d'arbres agricoles dans le bassin méditerranéen avec une importance culturelle et économique remarquable. En fait, à ce jour, plusieurs travaux se sont concentrés sur l'évaluation de la distribution et de la variabilité entre les olives cultivées et sauvages (LAVEE., 2013). Plusieurs centaines de divers cultivars d'oliviers géographiquement existent dans le bassin méditerranéen. Ils se distinguent par la morphologie des feuilles, la forme de drupe et la couleur, la composition de l'huile et de la phénologie (adaptation avec les climats) (BRETON *et al.*, 2008). Les populations d'olivier sauvage sont limitées à quelques secteurs isolés des forêts natales de la Méditerranée, où le pollen peut être distribué par le vent et les oiseaux(LUMARET *et al.*, 2004).. D'autre part, la pollinisation croisée entre les oliviers sauvages restants et les cultivars domestiqués plantés pourraient conduire à une augmentation des olives sauvages (LAVEE., 2013).

Selon les botanistes, l'aire de répartition de l'olivier est synonyme de "région méditerranéenne". L'olivier (*Olea europaea L.*) est cultivé autour de la méditerranée et de la mer noire surtout en : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, France, Tunisie, Algérie et Croatie (figure1). Cette répartition géographique est influencée par des facteurs climatiques et pédologiques. (GAUSSORGUES, 2009 ; CARRION *et al.*, 2010).

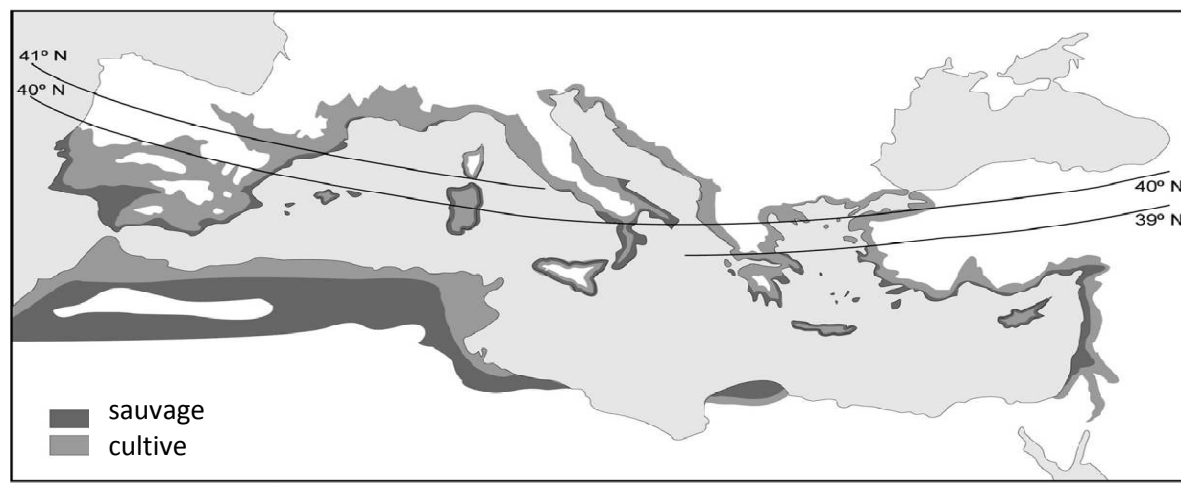


Figure 1. Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin méditerranéen. (CARRIONet *et al.*, 2010).

I.1.5. Utilisation traditionnelle et propriétés pharmacologiques

Les feuilles ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels dans les pays européens et méditerranéens comme des extraits, des tisanes, et des poudres. Ils contiennent plusieurs composés potentiellement bioactifs (WAINSTEIN *et al.*, 2013). Les feuilles d'olivier sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle modérée. L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète (au cours de la grossesse ou en cas d'obésité) (GHEDIRA., 2008). Les études cliniques récentes ont montré qu'une dose de 500mg de l'extrait des feuilles d'oliviers, deux fois par jours, peut remplacer une dose de 12,5-25mg en Captopril, dans l'abaissement des tensions artérielles systoliques et diastoliques chez les patients hypertendus (SAUSALIT *et al.*, 2010).

Les feuilles ont aussi été largement utilisées en tant que remède pour le traitement de la fièvre et d'autres maladies comme le paludisme. Elles ont été consommées sous forme d'un extrait, d'un ensemble de poudre de herbor ou tisane. Elles sont dotées de divers propriétés pharmacologiques parmi elles la propriété antioxydante, anti-hypertensive, anti-inflammatoire, hypoglycémique et hypocholestérolémiantes. Les feuilles possèdent également des propriétés antimicrobiennes contre certains micro-organismes tels que des bactéries, des champignons et mycoplasmes (GHANBARI *et al.*, 2012).

I.1.6. Valorisation de sous-produits oléicoles

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile, génère deux résidus l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons) qui représentent un pourcentage important du poids total des olives traitées. De plus, l'olivier, à travers la taille engendre des feuilles, des brindilles et du gros bois (NEFZAOU, 1991 ; SAYADI *et al.*, 2000). De nos jours, la pollution joue un rôle majeur dans la destruction de la nature. Etant donné que les margines sont considérées comme un polluant de l'industrie oléicole, le plus souvent rejetées dans le milieu naturels, notamment dans les rivières, cela impose des traitements de dépollution et de valorisation. La figure 2 résume les principales voies de valorisation des sous-produits oléicoles (DERMECHE *et al.*, 2013).

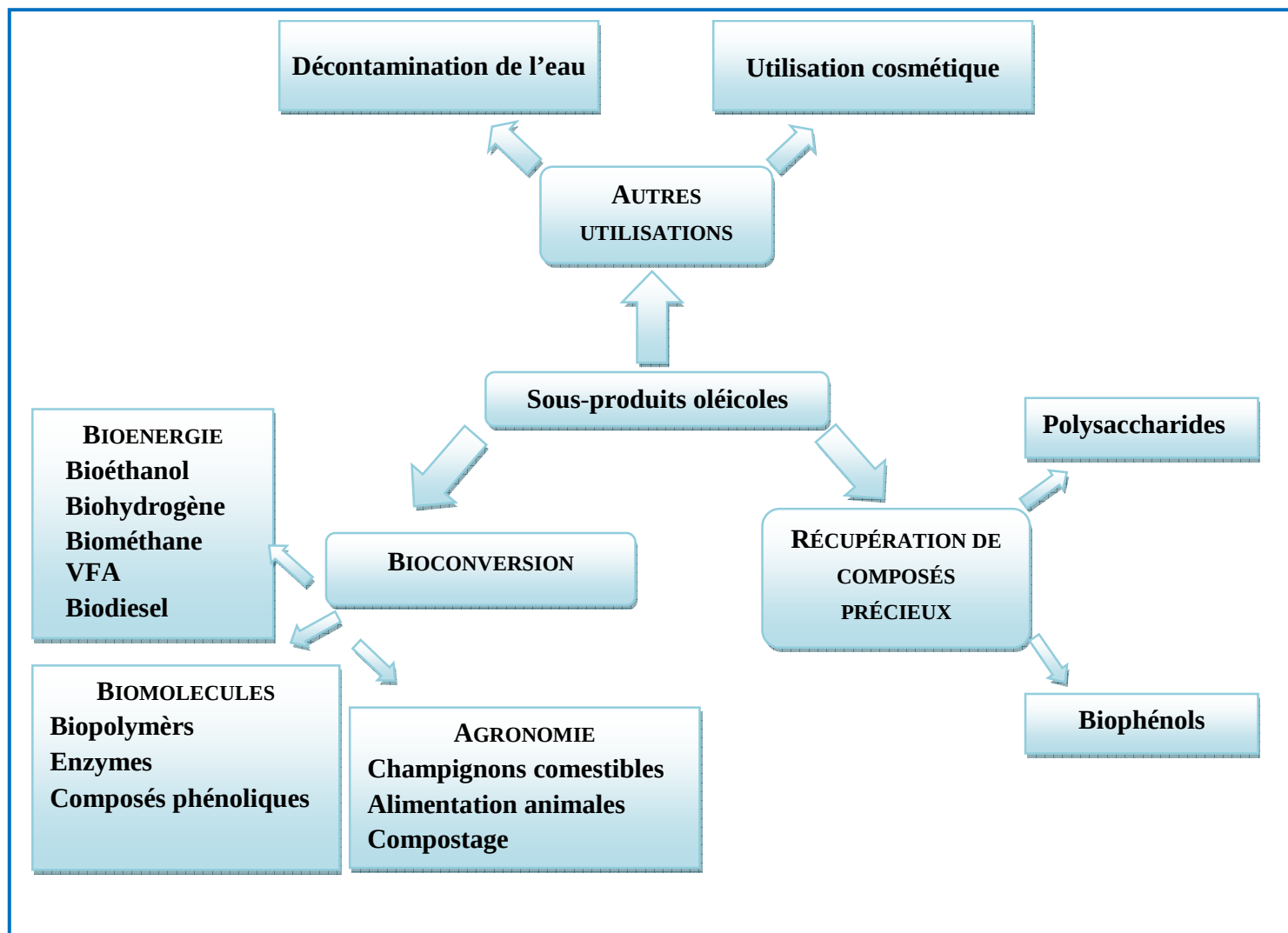


Figure 2. Valorisation de sous-produits oléicoles (DERMECHE *et al.*, 2013).

I.2. Généralités sur le laurier

I.2.1.Histoire

Laurus nobilis est un arbre connu dans la mythologie grecque et romaine comme un emblème de la victoire et le succès (LEUNG et FOSTER, 1999). Le *Laurus* était consacré à Apollon, le dieu grec de la lumière, et un symbole de paix et de la victoire utilisé pour faire des couronnes des empereurs, des généraux, et les poètes.

À Rome, les feuilles de laurier été à la fois un médicament et une épice. En infusion, ses feuilles étaient consommées pour leurs effets révulsifs et toniques sur l'estomac et la vessie, sous forme de cataplasme, elles passaient pour soulager les piqures de guêpe ou d'abeille. Au 1^{er} siècle de notre ère, le médecin grec Dioscoride notait que l'écorce de laurier «brise les pierres(dans les reins) et soulage les affections du foie ».

Lorsque les médecins grecs ont terminé leurs études, ils ont été couronnés de branches de laurier appelé lauris baca, et qui plus tard a donné naissance au baccalauréat terme, qui désigne l'accomplissement d'un degré. En plus l'huile de laurier ou du beurre, obtenu à partir des fruits (baies) de *laurus nobilis* est un ingrédient essentiel de la pommade Laurin, une médecine populaire pour les rhumatismes et la goutte et pour le traitement de la rate et maladies du foie. Il trouve également application en médecine vétérinaire(CONFORTI., 2006 ; . RAGHAVAN *et al.*, 2007 ; JESSE WAGSTAFF., 2008 ; BALLABIO et GOETZ., 2010 ; OCHIKH *et al.*, 2011).

I.2.1.Origine

Originaire du bassin méditerranéen, *Laurus nobilis* pousse dans les lieux humides et ombragés, également dans les jardins, où elle est cultivée comme condiment (ISERIN, 2001). De nos jours, la plante est largement cultivée dans beaucoup de pays comme plante ornementale et pour la production commerciale tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux (DEMIR *et al.*, 2004; BARLA *et al.*, 2007).

I.2.2. Description botanique

Laurus nobilis, Arbuste ou arbre aromatique dioïque (à sexe séparé) qui pousse sauvages ou cultivées, de 2 à 10m de haut, atteignant parfois une hauteur de 15-20m(20 à 30 pieds). A tige droite grise dans sa partie basse et verte en haut. Ses feuilles sont alternés, coriaces, légèrement ondulées sur les bords, longues de 16 cm sur 8 cm de large, persistantes toujours verte Les fleurs, jaunes, groupées par 4 à 5 en petites ombelles. Le fruit est une petite baie ovoïde de 2cm de longueur sur 1cm de largeur, noir vernissé à maturité (ISERIN, 2001 ; DEMIR *et al.*, 2004 ; BELOUED., 2005; NURBAS et BAL., 2005 ; KILIC et ALTUNTAS., 2006 ; NAYAK *et al.*, 2006; SANTOYO *et al.*, 2006; YAHYA *et al.*, 2008 ; HAMROUNI *et al.*, 2011).



Figure 3.Aspect morphologique du *Laurus nobilis* BELOUED (2005).

I.2.3. Taxonomie et systématique

Laurus nobilis L., appartient à la famille des lauracées qui renferme 32 genres et environ 2000-2500 espèces (BARLA *et al.*, 2007).

Sa place dans la systématique botanique est décrite comme suit (BALLABIO et GOETZ., 2010).

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheophyta* = *Tracheobionta* (*Cormophyta*)

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Laurales*

Famille : *Lauraceae*

Genre : *Laurus*

Espèces : *Laurus nobilis* L.

I.2.4. Répartition géographique

Le laurier est la seule espèce représentant la famille des lauracées dans la région méditerranéenne en particulier en (Turquie, Grèce, Espagne, Italie, France). Actuellement, la plante est largement cultivée comme plante ornementale dans le sud et l'ouest de l'Europe, l'Amérique centrale et aux Etats-Unis. Il fait l'objet de production commerciale dans beaucoup de pays tels que la Turquie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux, et l'Algérie. Pour cette dernière, il est retrouvé dans les forêts et ravins humides et commun dans le tell algérois et constantinois. Il pousse aussi de façon spontanée dans la garrigue et les bois en Europe et autour de la Méditerranée. (REGNAULT-ROGER., 1997 ; ARROYO GARICIAL *et al.*, 2001 ; IVAN., 2001; DEMIR *et al.*, 2004; BELOUED., 2005 ; BEISA et DUNFORD., 2006 ; KILIC et ALTUNTAS., 2006 ; BARLA *et al.*, 2007 ; RAGHAVAN *et al.*, 2007 ; SANGUN *et al.* 2007 ; DE MARINO., 2008 ;

VILLUPANOOR *et al.*, 2008 ; DERWICH., 2009 ; EMAM *et al.*, 2010 ; HAMROUNI *et al.*, 2011).



Figure 4.La région Méditerranéenne (ANONYME., 2010)

I.2.5. Utilisations traditionnelles et propriétés pharmacologiques des feuilles de *Laurus nobilis*.

Le laurier a des applications importantes en médecine traditionnelle et représente un sujet de recherche scientifique intéressant (SIMICet *al.*, 2003). Cette plante est principalement utilisée, par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif supérieur (ISERIN., 2001). L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle turque en tant qu'antihémorroïdal, antirhumatismal, diurétique et comme un antidote dans des morsures de serpent (KIVÇAK et MERT., 2002). Dans la médecine traditionnelle iranienne, les feuilles de cette plante ont été employées pour traiter l'épilepsie et le parkinsonisme (AQILI KHORASANI., 1992).

L'huile essentielle obtenue des feuilles de cette plante a été employée pour le soulagement d'hémorroïdes et des douleurs rhumatismales (SAYYAH *et al.*, 2002). Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants (DEMIR *et al.*, 2004 ; BELOUED., 2005).

II.1. Généralités

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié même aux conditions de vie de la plante : la plante doit alors faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit (prédateurs, microorganismes pathogènes, etc).

Il est conçu donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires (KANSOLE, 2009).

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus 200000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires et les composés phénoliques. Ces derniers sont l'une des principales classes de ces métabolites (VIGNEAU, 1985 ; CUENDET, 1999).

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ils sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales dans l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (BELKHIRI, 2009). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (RICHTER, 1993).

Les polyphénols forment une immense famille de plus de 8000 structures phénoliques identifiées (WILLIAMSON et MANACH, 2005 ; TAO et LAMBERT, 2014), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (AKOWAUH *et al*, 2004).

Ils sont divisés en plusieurs catégories (DACOSTA, 2003):

- Les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ;
- les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ;
- les acides phénoliques et les coumarines ;
- les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables.

Les CP peuvent intervenir dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, se trouvent les polyphénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins. Ils peuvent permettre aussi aux plantes de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes et environnementales (GEE et JOHNSON, 2001). Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (MACHEIX *et al*, 2005).

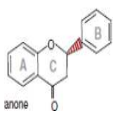
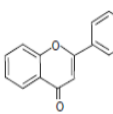
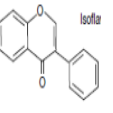
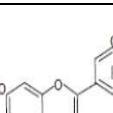
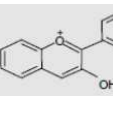
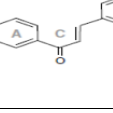
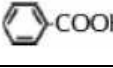
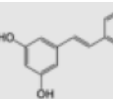
II.2. Structure chimique et classification

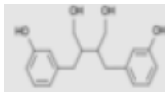
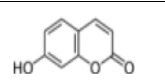
Les polyphénols sont des molécules très diversifiées, constituées d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant au moins une fonction hydroxyles, libre ou engagé dans une autre fonction chimique : éther, ester, ou hétéroside (HANDIQUE et BARUAH, 2002 ; BALASUNDRAM *et al*, 2006). Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes suivant la complexité du squelette de base (noyau C6), le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation..) et enfin suivant les molécules auxquelles ils sont associés (glucides, lipides, protéines, autres métabolites). Les formes les plus simples sont représentées par deux principaux groupes dont dérivent de nombreux composés : les acides phénoliques et les flavonoïdes. Les formes complexes sont issues de la condensation de certaines formes simples et renferme, entre autre les tannins et les lignines (BENARD, 2009).

On distingue trois principales classes :

- les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques);
- les flavonoïdes;
- les tannins et lignines, ainsi que les coumarines et les stilbénes qui sont rares (NKHILLI, 2009).

Tableau I. Principales classes des composés phénoliques (HARBORNE, 1989 ; MACHEIX, 1990 ; CROZIER *et al*, 2006 ; FOURNIER LARENTE, 2014)

	Classes		Squelette carboné	Exemple	Formule	Origine
Flavonoïdes	Flavanones		C6-C3-C6	Naringénine Eriodictyol		Fruits du genre Citrus
	Flavones		C6-C3-C6	Kaempférol		Fraise, Persil, céleri.
	Isoflavonoïdes		C6-C3-C6	Daidzéine, Roténoïde		Graine de soja Thym Camomille
	Flavonols		C6-C3-C6	Quercétine Kaempférol		Oignon, poireau brocolis, thé, pommes, chou frisé, vin rouge,
	Flavanols	monères	C6-C3-C6	Procyanidol		Raisins, Kaki
		Condensés	(C6-C3-C6) _n	Constitués de sous unités catéchine ou épicatechine		
		Hydrolysables		Constitués d'acide gallique ou éllagique		
	Anthocyanines		C6-C3-C6	Delphinidol		Raisin Cabernet- Sauvignon
	Chalcones			Butéine		La tomate
Non flavonoïdes	Acides phénoliques		C6-C1	Acide gallique		Artichaut
	Stilbènes		C6-C2-C6	Trans-resvératrol, Hydrangénol, Pinosylvine		Raisin Pin

	Lignanes	(C6-C3) ₂	Entérodiol, Matairésinol		Bactéries intestinales Chardon
	Coumarins	C6-C3	Ombelliférone		Carottes, coriandre

II.3. Biosynthèse des composés phénoliques

II.3.1. Voie d'acide shikimique

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux, ces acides aminés sont formés à partir des sucres simples issue du métabolisme primaire par la voie de l'acide shikimique (YAHIAOUI, 2012). Cette voie conduit après transamination et désamination du phénylalanine à donner naissance au précurseur direct des phénols : l'acide cinnamique et à de nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (KNAGGS, 2003).

II.3.2. Voie d'acide acétique

La voie d'acétate conduit à la formation des poly β -coesters (polyacétates) qui sont de longueur variable menant à des composés polycycliques par cyclisation tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones (BRUNETON, 1999 ; NACZK et SHAHIDI, 2004).

Cette voie donne naissance aux flavonoïdes dont le squelette de base a une double origine:

- 3 molécules d'acétyl COA (cycle A);
- Une molécule de p-coumaryl COA (cycle B et l'hétérocycle C).

La condensation de ces unités donne naissance aux flavonoïdes et particulièrement aux pigments anthocyanes et flavonols ou encore certains monomères de types flavanols dont la polymérisation conduit aux tanins condensés. (YAHIAOUI, 2012).

II.3.3. Voie de phénylpropanoïde

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (PORTES, 2008).

II.3.4. Voie de biosynthèse des flavonoïdes

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, cela est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

II.4. Activités biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont connus par leurs rôles physiologiques très importants aussi bien dans le règne végétal qu'animal. En raison de leur structure, les composés phénoliques sont capables de se fixer sur certaines enzymes et protéines, et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques : ils joueraient un rôle dans les chaînes d'oxydo-réduction et modifieraient certaines réactions concernant la croissance, la respiration et la morphogénèse. Dans le règne végétal, ces substances sont souvent impliquées dans les mécanismes de défenses élaborés par les végétaux contre la prédation par des insectes, des herbivores et contre les infections et les agressions microbiennes multiples (LO SCALZO *et al*, 1994 ; UCCELLA, 2001).

Outre, les composés phénoliques seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation... (OZKAYA et CELIK, 1999 ; MALIK et BRADFORD, 2006). Les composés phénoliques sont aussi responsables des propriétés sensorielles des plantes telles que la couleur, le goût et parfois l'odeur. En phytothérapie, l'effet de nombreuses plantes médicinales est attribué en tout ou partie aux composés phénoliques dans ces plantes. Ces substances possèdent des activités biologiques qui les rendent bénéfiques à la santé humaine (Fig. 5). Beaucoup d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (LEONG et SHUI, 2002).

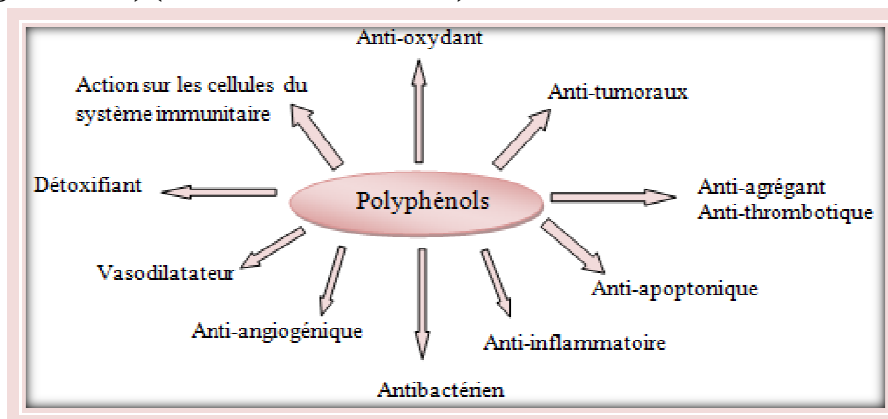


Figure 5. Effets biologiques des polyphénols (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

Les activités biologiques relatives à ce type de composés sont relativement diversifiées. Chaque classe chimique de polyphénols semble être utilisée pour ses vertus spécifiques (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002). Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur activité antimicrobienne et antioxydante, cette dernière est d'un intérêt général avec les récentes découvertes sur la prévention des cancers (KARAKAYA, 2004). Certains d'entre eux, tel que les coumarines, possèdent

des propriétés anti-inflammatoires (FYLAKTAKIDOU *et al*, 2004). D'autres, tel que les lignanes, possèdent des propriétés cytostatiques (HABTEMARIAM, 2003). Les flavonoïdes, une vaste famille de composés phénoliques, protègent les tissus végétaux contre les rayons UV. La principale activité leur étant attribuée est une propriété « Vitaminique P » : ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et les rendent plus résistants. Certains possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, anti allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiant, diurétiques, antibactériens, antiviraux et parfois cytostatiques. Ils agissent aussi parfois comme piègeurs de radicaux libres et comme inhibiteurs enzymatiques.

Les composés des autres familles de ce groupe (anthocyanosides, tannins et polyacétates) présentent fréquemment des propriétés thérapeutiques similaires à celles des flavonoïdes et des composés phénoliques en général (BRUNETON, 1993). Le tableau suivant représente les activités biologiques de quelques composés phénoliques.

Tableau II : Activités biologiques de quelques composés phénoliques (BRUNETON, 1999 ; HENNEBELLE, 2006).

Composés phénoliques		Activité biologique
Ac. Phénols	- Ac. caféique	- Antibactérienne
	- Ac. salicylique	- Antifongique - Antioxydante
Tanins	- Tanin gallique	- Effet stabilisant sur le collagène
	- Proanthocyanidine	- Antioxydant - Antidiarrhéique - Antiseptique - Vasoconstricteur
Flavonoïdes	- Lutéoline	- Antitumorale
	- Catéchine	- Anticarcinogène
	- Hespéridine	- Anti -inflammatoire
	- Quercétine	- Antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse
	- Naringénine	- Antivirale, antimicrobienne, hypotenseur
		- Diurétique
Coumarines	- Dicoumarol	- Anticoagulant, antioxydant
		- Protectrice vasculaire - Antioedémateuse

II.5. Sources des composés phénoliques

Les polyphénols ne sont pas synthétisés par le corps humain, par contre ils sont largement présent dans le règne végétal, et font l'objet d'une consommation quotidienne chez l'homme (DWYER et PETERSON, 2002). Ils se trouvent répandus dans la majorité des organes végétaux consommés par l'homme : graine (soja, café, riz...), fruit (raisin, citrus, olive...), feuilles (thé, nombreuses épices, romarin, thym...) ou autre organes (oignon, jeunes germinations de blé ou d'avoine, patate douce...). Ils sont présent aussi dans les produits transformés dans les produits industriels issus de ces mêmes sous une forme plus au moins transformé, tels que le jus de fruit, vin, bière, thé, café, huiles, dérivés de céréales) (MACHEIX *et al*, 2005 ; BLASUNDRAM *et al*, 2006 ; DIMITRIOS, 2006).

Tableau III. Récapitulatif des principales sources alimentaires des polyphénols (KEBBAB, 2014). (modifié)

Classes de polyphénols	Sources alimentaires	Références
Les stilbènes	-le raisin et son jus, -les baies, le chou rouge, les épinards et certaines plantes médicinales, -les cacahuètes et le beurre de cacahuètes, - vin rouge.	-(LAMUELA-RAVENTOS <i>et al</i>.1995). -(CASSIDY <i>et al</i>. 2000). -(CROZIER <i>et al</i>. 2009). -(ROMERO-PEREZ <i>et al</i>. 1996).
Chalcones dihydrochalcones	-la tomate (la peau, le ketchup) la pomme (peau, chair et épépines)	-(KRAUSE <i>et al</i> . 1992 ; GUYOT <i>et al</i> . 1998).
(Épi)cathéchine	-l'abricot et la cerise -les pêches, les prunes, les fraises, le chocolat, le thé vert -les pommes et les poires,.	-(D'ARCHIVIO <i>et al</i>. 2007). -(GRAHAM. 1992). -(AMIOT <i>et al</i>. 1995)

Les anthocyanes	-baies comme le cassis ou les mûres. -fruits rouges comme les myrtilles, fraise ou la cerise. -les vins.	-(CLIFFORD. 2000 ; MANACH <i>et al.</i> 2004).
Les lignanes	-graines de lin -céréales(les triticales et le blé). -fruits (les poires et les prunes) -certains légumes (ail, asperges et carottes) -légumineuses comme les lentilles.	-(THOMPSON <i>et al.</i> 1991 ; ADLERCREUTZ <i>et</i> MAZUR.1997).

II.6. Méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques

L'extraction, la séparation, la caractérisation et le dosage des composées phénoliques se fait selon plusieurs méthodes, les plus utilisées et employées sont résumé dans les tirets qui suivent :

.Extraction

- **Extraction par les solvants (macération)**

Le contacte entre le solvant (liquide) et la matière végétale (solide) a pour but de libérer les polyphénols présents dans les cellules par rupture du tissus végétale et par diffusion (OWEN et JOHNS., 1999 ; HAYOUNI *et al.*,2007).

- **Extraction par chromatographie sur colonne**

Elle consiste à absorber sur une résine du type C18 pour les polyphénols et flavonoïdes des extraits végétaux puis à éluer sélectivement les substances polyphénoliques au moyen d'éthanol ou méthanol aqueux .

- **Extraction supercritiques (SFE)**

Le CO₂ supercritique, utilisé comme solvant d'extraction, du fait de sa faible viscosité lui confère une grande capacité de diffusion lui permettant d'avoir accès à des composées phénoliques liés a la paroi cellulaire et sa densité relativement élevé lui confère un pouvoir de solvation ce qui permet un meilleur taux d'extraction. -Procédé non dénaturant. -Temps d'extraction réduit (CHAN et MAZNAH, 2009).

. Séparation et purification

- **Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Séparation et purification des différents constituants en fonction de leur taille et de leur forme Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire (TISSUT, 1967).

- **Chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelée phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les "grains" sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire (CASTANEDA *et al.*, 2009).

- **Chromatographie phase gaz (CPG)**

Les différents solutés gazeux vont se séparer par migration différentielle le long de la phase stationnaire (COLIN-HENRION *et al.*, 2008).

. **Dosage**

- **Dosage par spectrophotométrie**

Par méthode de Folin (non spécifique) (HARBOURNE *et al.*, 2009). Méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert. La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier (HARBOURNE *et al.*, 2009).

- **Dosage par HPLC**

Séparation sur colonne phase inverse C18 et détection à l'aide d'un spectrophotomètre UV 171 (LAWSON, 2006).

II.7. Activité antioxydante

II.7.1. Généralités

La biologie des radicaux libres connaît un croissant intérêt, vu leur rôle dans les phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, ainsi que leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (GUINEBERT *et al.*, 2005).

L'élément indispensable à la vie de tous les organismes aérobies est bien l'oxygène, puisque il permet d'oxydant les substances organiques dans leur mitochondrie, de produire la majorité de l'énergie chimique. En revanche, l'oxygène peut être une source d'agression pour ces organismes qui convertissent une partie de cet élément en métabolites hautement réactifs : les radicaux libres, qui peuvent être d'origine endogène ou bien exogène (PANDEY et RIZVI, 2011 ; KALAM *et al.*, 2012).

II.7.2. Définition d'un radical libre et le stress oxydant

Les radicaux libres sont des atomes, molécules ou des parties de molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans leur orbite extrême tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), et le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) (WU et

CEDERBAUM, 2003). Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue et par des sources endogènes au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, les peroxyosomes et le système de cytochrome P-450. Ces radicaux sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire qui est à la base de certaines maladies comme l'athérosclérose, le cancer, maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (FAVIER, 2003). Ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides (POURRUT, 2008) des acides nucléiques (FAVIER, 2003).

Par ailleurs, il existe d'autres dérivées oxygénés réactives dont leur toxicité est très importante tel que l'oxygène singlet (O_2), l'ozone, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le peroxydinitrite $ONOO^-$ (DACOSTA, 2003 ; FAVIER, 2003)

Ce déséquilibre est à l'origine de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (FAVIER, 2003).

II.7.3. Antioxydants

Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1999). Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (SHIMIZU, 2004).

- **Antioxydants d'origine synthétique**

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (LISU et *al*, 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (YU et *al*, 2000).

- **Antioxydants d'origine naturelle**

- **L'acide ascorbique, tocophérols, β - carotène**

L'acide ascorbique (vitamine C) est une molécule hydrosoluble. Lors de son oxydation en acide d'hydroascorbique, elle passe par une forme intermédiaire qui est le radical ascorbyl capable de capter certaines espèces radicalaires (radicaux OH) (BOUTABET, 2007). La vitamine C est abondante dans les agrumes, les fruits rouges,

les pommes, les brocolis (BENBROOK, 2005), les choux, le poivron, le persil et le kiwi (BOSSOKPI, 2002).

Les tocophérols sont des CP de structure apparentée à celle de l' α -tocophérol. On distingue l' α tocophérol (E307), le γ -tocophérol (E308) et le δ - tocophérol (E309) (figure 6). Le contenu en tocophérols est fortement influencé par la variété d'olive, le stade de maturation et le processus de fabrication des olives de table (SAKOUHI *et al*, 2008). Ces additifs sont apparentés à la vitamine E et sont contenus dans les lipides végétaux, les amandes, les graines, le lait, les œufs, légumes à feuilles vertes (BOSSOKPI., 2002).

En outre, on a le β -carotène qui apparait un piègeur efficace (radicaux hydroxyles et peroxydes) et captation de l'oxygène singulet O_2 (HADI, 2004). Il est présent dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les pinards, la papaye (BOSSOKPI, 2002).

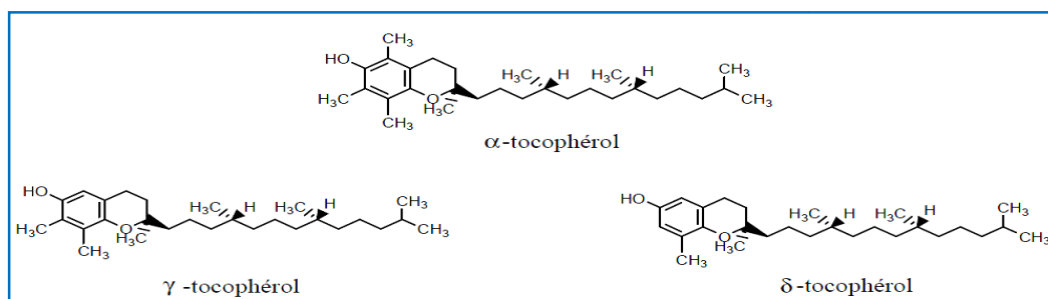


Figure .6 Formule des α , γ et δ -tocophérols.

- Polyphénols

Il est connu que la plupart des effets biologiques des flavonoïdes, tels que l'activité anti-inflammatoire et anti-tumorale, sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels (Figure 7). En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (NIKI, 2010).

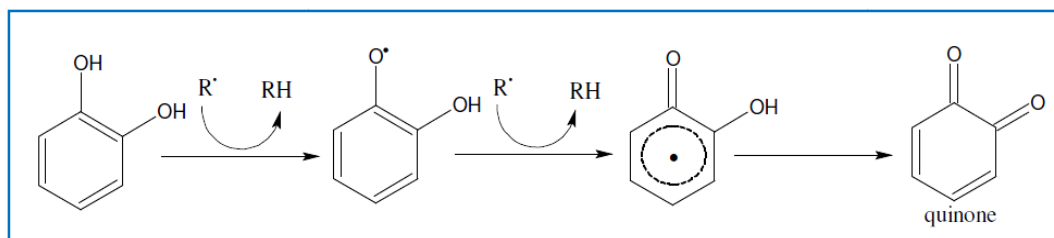


Figure 7. Le piégeage des ERO par les flavonoïdes (MARFAK., 2003).

II.4. Mécanismes d'action des antioxydants

En règle générale, les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ERO (espèces oxygénées réactives) ou l'effet «scavenger » ;
- La protection des systèmes de défense antioxydants (en majorité des systèmes enzymatiques) ;
- L'inhibition ou activation d'enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO (HALLIWELL, 1994 ; BOUZID *et al*, 2011).

III.1.Introduction

Avec les biofilms microbiens une nouvelle ère, celle de la microbiologie pluridisciplinaire a commencé. Le terme « biofilmologie » est déjà proposé (KARUNAKARAN *et al*, 2011). L'étude des biofilms s'étant érigée en une discipline à part entière. La capacité des microorganismes à coloniser les surfaces biotiques et abiotiques est un processus universel. Ce processus conduit à la formation de dépôts plus ou moins structurés, regroupés sous le terme générique de « biofilm ». Ce comportement des bactéries apparaît comme une réponse adaptative à un environnement plus ou moins hostile, ou du moins peu favorable à une croissance sous forme planctonique. Cette « différenciation » bactérienne conduit à des modifications drastiques du comportement cellulaire, avec modification des fonctions métaboliques et de l'expression des facteurs de virulence, ainsi qu'une sensibilité diminuée aux moyens de défense naturels ou non de l'hôte, conférant ainsi aux bactéries de nombreux avantages (DAVEY et O'TOOLE, 2000):

- protection vis-à-vis des conditions environnementales grâce à la matrice d'exopolymères qui structure le biofilm, assurant une homéostasie du milieu;
- nutrition et coopération métabolique : des canaux aqueux sont présents dans toute la structure du biofilm, permettant l'échange de nutriments et de métabolites entre les espèces du biofilm et avec l'extérieur;
- échange de matériel génétique : la proximité des cellules favorise ces échanges, tendant vers une stabilisation de la structure du biofilm.

III.2.Historique

L'origine de la recherche en microbiologie est souvent associée aux observations d'ANTONI VAN LEEUWENHOEK qui, au XVII^e siècle et grâce à un microscope de son invention, mit en évidence la présence d'organismes microscopiques à la surface de ses dents. Bien que d'abord identifiés fixés sur un support solide, ce sont les formes libres et planctoniques des microorganismes, qui ont été les plus étudiées ; dès lors, l'essentiel des connaissances acquises résulte de travaux principalement réalisés sur ces formes, cultivées dans des milieux nutritifs liquides et agités.

Quelques travaux attirent cependant l'attention sur les interactions existant entre les microorganismes et les surfaces. En 1933, HENRICI plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement (HENRICI, 1933). En 1943, ZOBELL montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension (ZOBELL, 1943).

Enfin, dans les années 1980, les travaux de COSTERTON mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines. Présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (surface des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires etc.), elles sont appelées biofilms. Avec l'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) à partir des années 1990 a permis d'observer des biofilms intacts, révélant leur structure et architecture tridimensionnelle (HEYDORN *et al*, 2000 ; TOMAS *et al*, 2010).

III.3.Définition

Le terme biofilm étymologiquement parlant vient du grec «bios» et de l'anglais «film» qui signifie pellicule (COSTERTON, 1999).

Dans une définition simple, proposée par CARPENTIER et CERF (1993), le biofilm est une communauté de microorganismes incorporés dans une matrice de polymères organiques et adhérant à une surface. L'organisation des communautés microbiennes du biofilm en consortium fonctionnel et la nature de la surface, sont précisées (COSTERTON *et al*, 1995). Il s'agit de bactéries pouvant adhérer aux surfaces inertes ou vivantes, et interfaces ainsi qu'aux unes les autres. DONLAN (2002) souligne le caractère solide de cet attachement des microorganismes aux surfaces : non enlevé par un rinçage doux.

L'utilité de la prise en considération des taux de croissance altérés et l'expression de gènes non exprimés par les organismes planctoniques ont amené DONLAN et COSTERTON (2002) à proposé une définition plus complète : « un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules qui sont irréversiblement attachées, à un substratum, ou une interface ou les unes aux autres, emprisonnées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires autoproduites et exhibant un phénotype altéré par rapport au taux de croissance et à la transcription des gènes».

Enfin le terme société du biofilm a également été utilisé (MCDOUGALD *et al*, 2012), faisant allusion à l'organisation des communautés microbiennes du biofilm ainsi qu'aux systèmes de communication intercellulaire et de régulation des fonctions au sein de cet ensemble complexe et dynamique.

III.4. Les étapes de formation des biofilms

Les biofilms bactériens isolés de divers environnements partagent des caractéristiques communes telle leur formation qui est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes, pouvant être distinguées, en une étape de transport ou transfert des bactéries vers le support, l'adhésion initiale aux surfaces, une étape de prolifération aboutissant à la formation de microcolonies et une étape de structuration du biofilm (figure 8).

A partir de ce dernier, des bactéries ou plutôt des agrégats bactériens vont pouvoir se détacher et secondairement coloniser des surfaces adjacentes.

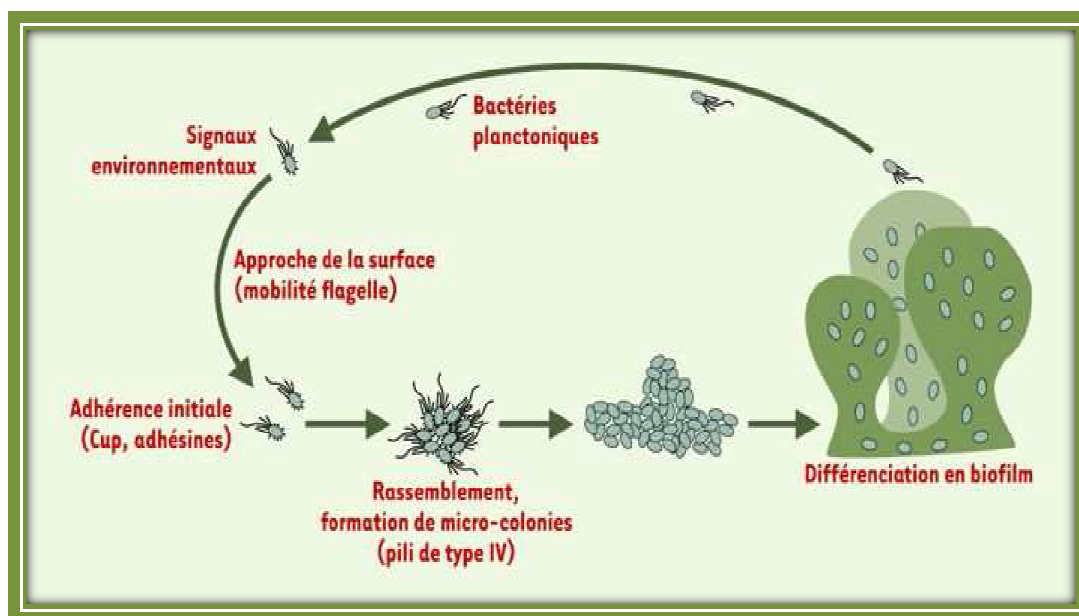


Figure 8. Représentation schématique de la formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* présentant les différentes phases (FILLOUX et VALLET, 2003).

a. Transfert des bactéries vers le support

Depuis les observations de ZOBELL (1943), la préférence des bactéries pour une croissance en mode sessile plutôt qu'en suspension dans des milieux aqueux est un phénomène reconnu. Cependant, les bactéries ne peuvent pas orienter leur déplacement vers les surfaces à coloniser sur de longues distances. Elles peuvent par contre reconnaître des changements dans leur environnement chimique, notamment à proximité d'une surface ou interface (COSTERTON, 1999). L'interaction bactérie-surface est influencée par une étape préalable de transfert vers la surface cible (VAN LOOSDRECHT *et al*, 1990 ; RIJNAARTS *et al*, 1993).

Les bactéries peuvent entrer en contact avec le support grâce à différents moyens : diffusion passive résultant des mouvements Browniens, transport passif via le fluide circulant, ou mouvements actifs grâce à des structures telles que les flagelles (VAN LOOSDRECHT *et al*, 1990).

Un phénomène important pour l'étape d'adhésion des bactéries est le conditionnement des surfaces. En effet l'immersion d'un support vierge de toute contamination dans un liquide est immédiatement suivie par une adsorption de sels, de protéines, de glycoprotéines,... Cette adsorption peut être en partie conditionnée par les propriétés physico-chimiques de la surface et des molécules. La formation rapide d'un film contenant des matières organiques entraîne une modification des propriétés de surface, et éventuellement une modification de l'affinité des bactéries pour cette surface (CARPENTIER et CERF, 1993). Ces dépôts organiques ou non organiques n'étant pas répartis de manière homogène sur la surface immergée, la colonisation bactérienne sera plus ou moins influencée. La résultante des différentes forces décrite est un rapprochement plus ou moins aléatoire de la bactérie de la surface.

b. Etape d'adhésion initial

Les bactéries sont capables de se fixer à de nombreux supports de natures différentes (inerte ou vivant) (SINGH *et al*, 2000). Les premières espèces colonisatrices seraient des bactéries possédant des mécanismes extrêmement efficaces d'acquisition des nutriments, capables de se multiplier dans des milieux très pauvres (SZEWZYK *et al*, 2000). Ainsi, l'adhésion bactérienne va mettre en jeu différents mécanismes physico-chimiques et biologiques.

b.1. Adhésion initiale réversible

Cette approche des microorganismes vers le support conduit à un attachement transitoire pendant lequel la bactérie va chercher à «évaluer» la surface sur laquelle elle se trouve. Cette première adhésion est appelée «adhésion réversible». Les cellules bactériennes établissent un premier contact avec la surface et interagissent avec le film conditionnant. Cette adhésion réversible est caractérisée par l'adsorption faible des cellules bactériennes sur la surface par des liaisons chimiques non covalentes. Ces liaisons entre la cellule et la surface d'attachement sont de type Van der Waals, électrostatique répulsives, ou encore acide-base de Lewis. Dans ce cas la bactérie peut alors être enlevée facilement par simple rinçage (CHMIELEWSKI et FRANK, 2003). Elles font intervenir des macromolécules de surface, regroupées sous le terme d'adhésines (COSTERTON *et al*, 1978; COSTERTON *et al*, 1981), telles que des flagelles, des pili de type I et IV, des curli, des protéines, des polysaccharides ou encore des lipopolysaccharides (LPS).

b.2. Adhésion initiale irréversible

L'adhésion irréversible, quant à elle, correspond à une fixation active et spécifique des micro-organismes sur une surface. Les structures d'adhésion varient selon les types de micro-organismes concernés. Pour les bactéries à Gram-négatif, il s'agit des pilis, des curli, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries à Gram-positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. D'autres bactéries vivant en partie fixées, comme *Caulobacter* ou *Hyphomicrobium*, peuvent utiliser des structures spécifiques comme un pédoncule ou une gaine (VAN HOUDT et MICHIELS, 2005). Ces molécules d'adhésion permettent d'établir des contacts cellule-surface et des contacts cellule-cellule (LEMON *et al*, 2008).

Cette étape nécessite des forces plus importantes pour retirer les bactéries. L'adhésion irréversible résulte de l'ancrage d'adjonction et/ou la production de polymère extracellulaire. Elle est caractérisée par des interactions de haute énergie (FILLOUX et VALLET, 2003).

c. Colonisation de la surface

L'adhésion irréversible va conduire à la présence de cellules isolées, voire d'agrégats, à la surface du matériau ou de la muqueuse. L'étape de colonisation consiste en une accumulation plus ou moins intense et rapide par division cellulaire des bactéries adhérees, mais aussi par recrutement continu de bactéries planctoniques.

Ce processus correspond donc à une occupation progressive de la surface disponible (colonisation horizontale) et à un développement en épaisseur, conduisant à la formation typique de microcolonies (CAPDEVILLE et NGUYEN, 1990).

d. Maturation du biofilm

La phase de stabilisation apparente, correspond à un équilibre dynamique avec perte de biomasse (mortalité et décrochement) et multiplication concomitante d'une partie de la biomasse fixée. Le point important est la diminution de l'activité métabolique globale. Celle-ci met en jeu des mécanismes qui peuvent expliquer, au moins en partie, la résistance des biofilms à certains antimicrobiens et son évolution en fonction de l'âge du biofilm. Ainsi, la biomasse adhérente est caractérisée par un taux de croissance faible qui selon certains auteurs (NGUYEN *et al*, 1989 ; JACQUELIN *et al*, 1994) serait corrélé à l'existence d'une masse active en « surface » du biofilm et d'une masse peu active à l'intérieur du biofilm. Les microcolonies formées, véritables entités structurales et biologiques, pourraient également exprimer une immunogénicité spécifique.

Au sein du biofilm, l'activité métabolique globale ralentit et l'architecture se modifie. Des canaux aqueux se créent entre les colonies permettant une circulation des nutriments, enzymes et déchets. Un gradient de nutriments et d'oxygène se crée, les cellules les plus proches du support étant les moins alimentées, en « dormance » et donc les mieux protégées vis-à-vis des agressions extérieures.

Tout au long du processus de formation du biofilm, l'expression génomique est modifiée (COSTERTON *et al*, 2003). Ceci conduit à des modifications phénotypiques drastiques que ce soit en terme de taille, de profil des protéines membranaires, d'hydrophobicité de surface. Le biofilm est caractérisé par une perte de sensibilité aux défenses immunitaires de l'hôte et aux traitements antimicrobiens qu'ils soient de nature physique ou chimique (COSTERTON., 1984 ; GRAY *et al*, 1984; DUGUID *et al*, 1992; CAMPANAC *et al*, 2002).

e. Détachement et mort cellulaire

Les microorganismes peuvent se détacher du biofilm soit par un processus passif sous l'effet de force de cisaillement engendrées par un flux (PARSEK et SINGH, 2003), soit par une séparation active suite à la dissolution de la matrice par des enzymes hydrolytique sécrétées par les microorganismes eux-mêmes comme cela a été montré pour les bactéries (PARSEK & SINGH, 2003), la diminution de la quantité de nutriments pourrait aussi entraîner un détachement des cellules.

La mort des cellules du biofilm fait aussi partie du processus de renouvellement et de dispersion de la biomasse. Un mécanisme original régissant l'autorégulation de la population des biofilms est proposé par WEBB *et al* (2003). Cette étape correspond aussi à la phase de dispersion, les microorganismes peuvent activement se séparer du biofilm parfois consommant la matrice qui représente une source d'énergie. Ces microorganismes retournent à l'état de libre circulation et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces complétant ainsi le cycle (SREY *et al*, 2013).

III.5. Ecologie d'un biofilm

III .5.1 Interaction microbienne

La communauté microbienne et ses membres sont sujets à différents types d'interactions qui peuvent exercées sur eux des effets positifs ou bien négatifs. On peut citer comme exemple bénéfique la coopération dans les systèmes de dégradation de certains nutriments

complexes, ou encore la production d'enzymes profitables à l'ensemble de la communauté de microorganismes (TOMLIN, 2005).

A l'opposé, les différentes colonies de micro-organismes occupant une même niche écologique entrent en compétition pour l'acquisition des ressources se trouvant dans le milieu. Deux mécanismes de compétition entre bactéries est la production de bactériocines et la baisse du pH (IRIE, 2008).

III .5.2. Matrice extracellulaire

Les biofilms sont dotés d'une architecture complexe et irrégulière, en forme de coraux ou de champignons. Cette architecture n'est pas figée, les micro-organismes bougent à partir du lieu de leurs premières divisions cellulaires, une véritable dynamique interne règne au sein des biofilms (CLUTTERBUCK, 2007). Les micro-colonies de bactéries sont imbriquées au sein d'une matrice d'exopolymères contenant des canaux aqueux et des pores, permettant des échanges d'eau, de nutriments, de déchets, ainsi que d'information et de caractères génétiquement transmissibles (caractères de résistance aux antibiotiques par exemple).

III .5.3. échange de matériel génétique

L'échange de plasmides au sein des biofilms se fait par des phénomènes de conjugaison. Ainsi, l'organisation en biofilm permet de sélectionner et de répandre des caractères de résistance à des agents antimicrobiens (DONLAN, 2002). Dans les régions inaccessibles à ces canaux, par exemple au sein des conglomérats de cellules, les échanges métaboliques sont assurés par des mécanismes de diffusion passive (STEWART, 2003 ; WANNER, 2006). La diffusion des nutriments se fait de façon inégale au sein du biofilm, suite à l'existence de gradients. Ceci explique que toutes les cellules n'ont pas la même activité métabolique et donc pas la même vitesse de croissance (SPORMANN, 2008).

III .5.4. Le quorum sensing et régulation de la formation des biofilms

Au sein d'un biofilm, les micro-organismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules. Ces derniers, appelés « quorum sensing », jouent un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilms. ils se résument on des mécanismes de contrôle des processus qui se déroulent au sein des cellules, exprimer par des signaux de cellules à cellules et dépendant de la quantité de cellules présentes. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (COSTERTON, 1999 ; TOMLIN, 2005).

III.6. Impact des biofilms et leurs applications

L'organisation bactérienne en biofilm est considérée comme étant une arme redoutable, rendant les bactéries plus fortes et plus efficaces face à l'environnement plus ou moins hostile dans lequel elles évoluent, comparée aux bactéries évoluant sous forme planctonique (DHAHRI *et al*, 2013). Les biofilms peuvent être source de contaminations indésirables ou au contraire peuvent être bénéfiques et utilisés en conséquence.

a. Impacts négatifs des biofilms

Les biofilms sont fréquemment une source majeure de problème sanitaire, industriel et écologique. En effet, la virulence des bactéries et les problèmes qu'elles occasionnent sont fortement liés à leur mode de développement sous forme de biofilm. Car, une fois le biofilm formé, les bactéries sont protégées contre les systèmes de défense immunitaires et les traitements, qu'ils soient physiques ou chimiques (désinfectants, détergents et antibiotiques). Les exemples pour l'illustrer sont abondants.

a.1. Dans le secteur médical,

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'Homme (figure 9). Plus de 80% des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (HALL-STOODLEY *et al*, 2004). Ces derniers peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme (lentilles de contact, cathéter veineux central, sonde endotrachéale, dispositifs intra-utérins, valves cardiaques artificielles, pacemakers, cathéters de dialyse péritonéale, sondes de tympanostomie, sondes urinaires, prothèses vocales...), 82% des infections nosocomiales sont dues à la présence d'implants médicaux contaminés (ARCHIBALD et GAYNES, 1997). la consommation d'aliments ayant été au contact des microorganismes pathogènes formant le biofilm peut entraîner le décès du consommateur. De même, les biofilms sont responsables des plaques dentaires et des caries générées principalement par des bactéries du genre *Streptococcus* (FARGE, 1998), ou bien des maladies parodontales (BOSCHIN *et al*, 2004).

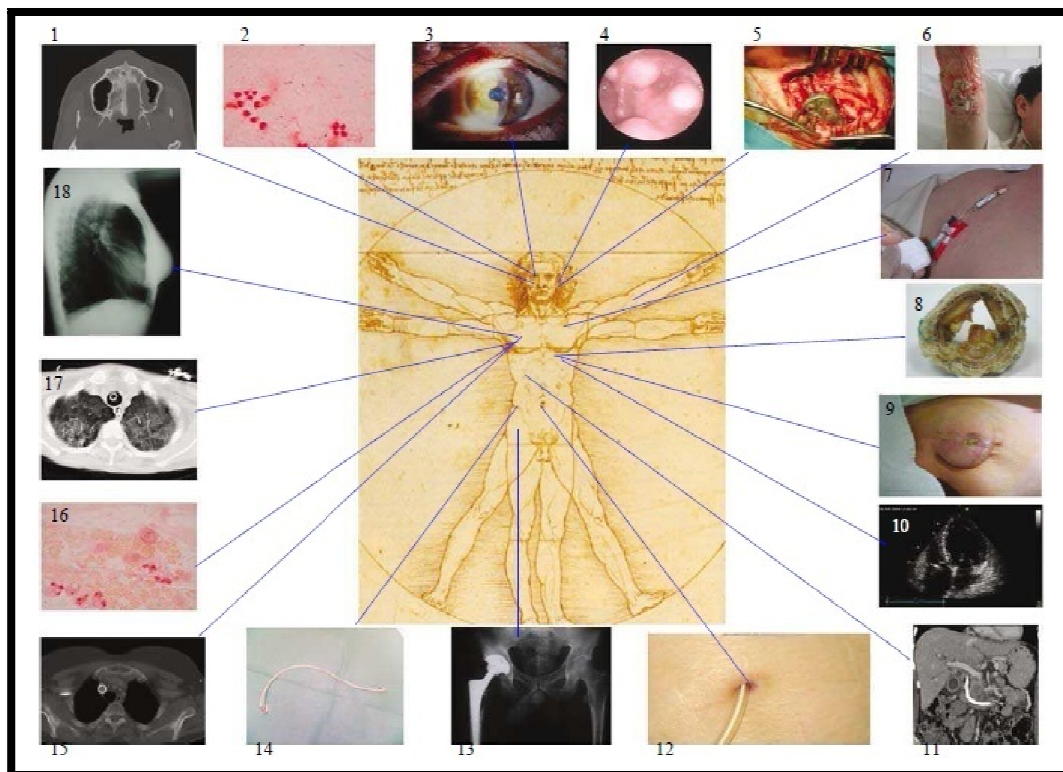


Fig. 9 : Diversité des infections associées à des biofilms.

(1) Scanner d'une sinusite chronique. (2) Infection du système nerveux central. coloration de Gram de microorganisme du liquide cébrospinal montrant des cocci intracellulaires à Gram-positifs. (3) Kératite associée aux lentilles de contact. (4) Otite chronique. (5) Infection cochléaire d'implant. (6) Infection liée à une brûlure. (7) Infection de cathéter intravasculaire (un cathéter de type Hickman est montré). (8) Endocardite d'une valve prothétique. (9) infection d'un pacemaker. (10) Electrophysiological wire endocarditis (vegetation shown in red circle). (11) Infection biliaire. (12) Infection du cathéter de la dialyse Péritonéale. (13) Infection d'une prothèse de la hanche. (14) Infection urinaire. (15) Infection intravasculaire. (16) Infection pulmonaire de la cystique fibreuse d'un patient. La coloration de Gram montrant des bacilles Gram-négatifs dans une matrice alginate. (17) Pneumonie. (18) Infection d'implant mammaire. (POZO et PATEL, 2007)

a. 2. Dans l'industrie

Les biofilms sont connus pour causer de graves problèmes dans les domaines de l'agro-alimentaire. En effet, les problèmes d'hygiène sont principalement dus à la prolifération de bactéries dites pathogènes pour l'homme, telles que *Listeria monocytogenes* (LEE WONG., 1998). Dans l'agro-alimentaire, ces biofilms représentent alors une menace sur la qualité sanitaire ainsi que les qualités organoleptiques des produits fabriqués. Les biofilms peuvent aussi être à l'origine de la détérioration des matériaux, par l'entartrage des canalisations ou encore le dépôt sur les échangeurs thermiques des installations gazières et pétrolières entraînant de grandes pertes économiques (SREY *et al.*, 2013).

a. 3. Dans l'environnement

L'impact des biofilms se traduit par le déséquilibre de certains écosystèmes. En effet, les biofilms peuvent se développer excessivement suite à la présence d'un niveau élevé de certains nutriments (effluents industriels par exemple) et pour métaboliser ces derniers ils consomment plus d'oxygène, en privant ainsi d'autres organismes qui partagent le même écosystème de leur source principale de vie. Ainsi, se créent, ce qui est appelé des « zones mortes » (phénomène « d'anoxie »). Les biofilms sont à l'origine d'un certain nombre de dégradations (bâtiments, corrosion et perforation de la coque des bateaux, altération de machines...) et ont par conséquent un impact économique important (WANNER et BAUCHROWITZ., 2006).

b. Impacts positifs des biofilms (Utilités)

Outre tous ces aspects négatifs, qui sont les plus évoqués quand il s'agit de biofilms, des aspects positifs existent. Certaines propriétés bactériennes peuvent être utilement exploitées afin d'en tirer avantage dans de nombreux domaines.

b. 1. Dans le domaine industriel

Les biofilms bactériens peuvent être utiles de par leurs propriétés de synthèse de certaines substances chimiques (éthanol, poly-3-hydroxybutyrate, benzaldéhyde, plastiques) ou encore par leurs propriétés électriques qui en font de bons candidats pour une récente application, celle de « piles à combustible microbiennes » (PACM) qui sont généralement désignées par l'acronyme « MFC » "microbial fuel cell" ou les biopiles dont des biofilms

bactériens assurent la conversion directe de matières organiques en énergie électrique ou catalysent des réactions électrochimiques (catalyse électro-microbienne) (WANNER et BAUCHROWITZ., 2006 ; SIENIUTYCZ et JEZOWSKI., 2013).

b. 2. Dans le domaine environnemental

Les biofilms peuvent être utilisés en bioremédiation de façon ciblée, dans l'épuration des nappes phréatiques souterraines contaminées, à la suite par exemple de pollutions chimiques accidentelles. Si les polluants sont biodégradables, des microorganismes spécifiques peuvent être injectés dans l'aquifère concerné et former des biofilms et utiliser les polluants comme source d'énergie pour leur métabolisme, à défaut d'autres substrats (WANNER et BAUCHROWITZ., 2006). Ils sont aussi utilisés comme bio-indicateurs, où ils jouent le rôle de marqueurs du degré de pollution d'un site donné (Mages *et al.*, 2004).

Les biofilms, de par leurs caractéristiques particulières, peuvent être utilisés et mis à profit, dans des procédés de traitement des eaux usées par exemple (auto-épuration des lacs, système de boues activées dans certaines stations d'épuration). En effet, les micro-organismes sont capables de dégrader les polluants présents dans les effluents.

III.7. Moyens de lutte contre les biofilms

Les biofilms posent de graves problèmes en matière de santé publique, industrie et environnement. De fait, la présence des biofilms a un impact économique considérable. C'est pourquoi il est absolument nécessaire d'éradiquer les biofilms nuisibles. La lutte contre eux peut se définir selon deux axes principaux : empêcher la formation de biofilms, et lorsqu'ils sont déjà présents, les détruire

III.7.1. Empêcher la formation de biofilms

a. Techniques couramment utilisées

Le meilleur moyen d'empêcher la formation de biofilms sur des implants en milieu hospitalier repose sur le respect des conditions d'hygiène strictes, afin d'éviter au maximum toute contamination bactérienne (MAKI., 1994).

b. Les nouvelles technologies qui se résument en

- Utilisation des revêtements destinés aux biomatériaux implantables, comme les sondes urinaires ou les cathéters veineux centraux qui empêchent l'adhérence des micro-organismes.
- Usage des molécules chargées retardent la fixation des microorganismes par le jeu de forces de répulsion. Les antibiotiques ou le système immunitaire auraient alors le temps d'agir contre ces micro-organismes non fixés (DONLAN., 2008).
- la vaccinologie qui a pour but de former des IgA qui vont inhiber les phénomènes responsables de l'adhésion des micro-organismes (DONLAN., 2008).
- essayer d'agir au niveau des molécules de signalisation du quorum sensing, afin de perturber l'architecture du biofilm et ses propriétés d'antibiorésistance (DONLAN., 2008 ; TOMLIN., 2005).

- une nouvelle piste de recherche exploitant une algue rouge, *Delisea pulchra*, car elle ne porte aucun biofilm à sa surface. Elle sécrète des furanones, qui sont des homologues des homosérinelactones, substances exerçant un contrôle inhibiteur sur la communication bactérienne (BURY-MONE., 2007).
- inhiber la synthèse des exopolysaccharides de la matrice, quelques études ont montré que
- les recherches en génie génétique consistent à rechercher des gènes spécifiquement exprimés au sein des biofilms afin de créer de nouvelles cibles (DONLAN., 2008).

III.7.2. Eliminer des biofilms déjà formés

a. Elimination mécanique du biofilm

Permet d'éliminer les biofilms en détachant les micro-organismes de leur support, grâce aux forces de cisaillement importantes créées. Cette méthode se révèle peu efficace car la plupart des antiseptiques et désinfectants ont du mal à pénétrer au sein des biofilms, et les bactéries de ces derniers sont résistantes à leur action. (STICKLER., 2002).

b. Les nouvelles technologies

b. 1. Utilisation de bactériophages

Des bactériophages peuvent être instillés localement au niveau des cathéters afin d'éradiquer les biofilms présents (DONLAN., 2008).

b. 2. Elimination ciblée d'une espèce microbienne au sein du biofilm :

Consiste à déstabiliser l'écosystème du biofilm en désorganisant totalement sa structure intime, par l'élimination ciblée d'une espèce bactérienne, que l'on aura choisi au préalable (BURY-MONE., 2007).

b. 3. Utilisation d'enzymes dégradant les exopolysaccharides de la matrice :

Prenons l'exemple des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces derniers produisent un exopolysaccharide, l'alginate, aux propriétés intéressantes : il retarde la diffusion des aminosides au sein du biofilm et inhibe leur activité anti-microbienne. Si on ajoute au milieu une enzyme dégradant l'alginate, l'alginate lyase, on augmente le pouvoir de pénétration et l'activité anti-microbienne de l'antibiotique dans le biofilm (DONLAN., 2008).

b. 4 .Recherche de nouvelles thérapies anti-microbiennes :

La thérapie combinée consiste à utiliser différents composés afin de potentialiser leurs effets. Certains composés comme les macrolides peuvent détruire la matrice d'exopolysaccharides du biofilm et favoriser la diffusion d'autres agents anti-microbiens associés au sein du biofilm (DONLAN., 2008).

III.8. Biofilms et antibiorésistances

De nombreux problèmes associés au développement des biofilms en milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants).

L'antibiorésistance développée par les biofilms bactériens pose de sérieux problèmes en matière de santé publique, puisqu'elle rend difficile le traitement des infections dues à des

biofilms. L'antibiorésistance d'une bactérie vivant sous forme de biofilm est 10 à 1000 fois plus élevée qu'une bactérie de la même espèce vivant sous forme planctonique (MAH et O'TOOLE GA., 2001). Cependant, tous les biofilms ne manifestent pas une insensibilité aux traitements antibiotiques (CONLEY *et al.*, 2003).

Les mécanismes d'antibiorésistance mis en œuvre par les bactéries au sein des biofilms sont nombreux et variés. ANDERSON et O'TOOLE font une dichotomie nette entre facteurs de résistance innés et facteurs de résistance induits par le contact avec les antibiotiques (ANDERSON et O'TOOLE GA., 2008). Ainsi, alors que les progrès de la médecine moderne permettent de lutter efficacement contre de nombreuses maladies infectieuses, celles qui sont liées à la présence de biofilms, échappent largement à ce type de traitements. Les antibiotiques sont en effet très peu efficaces contre les biofilms.

I. Matériels et méthodes

Notre étude a vue sa réalisation au niveau du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB), laboratoire commun I d'analyse physico-chimique, ainsi que le laboratoire pédagogique de la microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO).

I.1. Matériels

I.1.1. Appareillage

Les appareils utilisés sont les suivants :

- autoclave de paillasse (PBINTERNATIONAL);
- bain Marie (MEMMERT);
- balance de précision à 0,01mg (SARTORIUS) et balances analytiques à affichage digital (0,01g) (DENVER INSTRUMENT);
- centrifugeuse réfrigérée, (SIGMA 3-18K, SIGMA 4-16K) ;
- étuve (MEMMERT);
- four pasteur (BINDER);
- pH mètre (HANNA instrument);
- spectrophotomètre visible (SCHIMADZU);
- agitateurs variés (à barreau magnétiques chauffant et non chauffant, vortex).

I.1.2. Petit matériel

- anse, bec bunsen, cuves, micropipette, pinces, spatule, boîte de pétri, microplaques..... ;
- verreries de diverses dimensions (béchers, entonnoirs, éprouvettes, erlen Meyer, fioles jaugées, flacons, pipettes pasteur, tubes à essai) ;
- Papier filtre, papier Wattman.

I.1.3. Matériel végétal

I.1.3.1. Les feuilles de l'olivier sauvage et du laurier

Les feuilles de l'olivier sauvage ainsi que le laurier sont récoltées durant le mois de mars 2015 dans la région de Tizi-Ouzou (Algérie). Après récolte, les feuilles fraîches ont été transportées au laboratoire d'analyse physico chimique au niveau de l'UMMTO dans des sacs en plastiques à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les feuilles ont suivi un lavage intense à l'eau distillée et un égouttage à l'aide d'un tamis.

La préparation du matériel végétal pour l'expérimentation comprend les étapes suivantes:

- **Séchage** : le séchage des feuilles égouttées est effectué à l'air libre, à l'abri de la lumière et à une température ambiante pendant 8 jours.
- **Broyage** : les feuilles séchées sont à la suite broyées à l'aide d'un broyeur électrique (*Braun 450 WATT*), on vue de l'obtention d'une poudre fine.
- **Tamissage** : le broyat résultant est tamisé dans un tamiseur à mains, la poudre obtenue est ensuite conservée à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement fermés, afin de faire l'objet d'extraction des polyphénols totaux (PPT).

I.1.3.2. Les margines

Les margines utilisées sont issues d'une huilerie moderne de la région de Tizi-Ouzou (Oued Aissi) provenant de la campagne 2015. Les margines sont conservées à -20°C.

I.1.3.3. Les brindilles

Les brindilles (tiges) utilisées lors de notre expérimentation ont été prises du même oléastre d'où proviennent les feuilles et ont suivies les mêmes étapes de préparation que ces dernières. Les brindilles sont récoltées durant le mois de mars 2015 dans la région de Tizi-Ouzou (Algérie).

I.1.4. Les produits utilisés

• Produits chimiques :

Pour notre étude expérimentale divers produits chimiques ont été utilisés. Le tableau V regroupe ces différents produits comme suit :

Tableau V. Les produits chimiques utilisés dans notre étude.

		Référence	Utilisation
Solvants	n-butanol	Sigma-Aldrich	Extraction des polyphénols
	Diéthyléther		
	Ethanol absolu		
	Acétate d'éthyle	GPR RECTAPUR	Dépigmentation et délipidation
	n- Hexane	AnalaR NORMAPUR	
	Chloroforme	Scharlau	
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	Sigma-Aldrich	Solubilisation et conservation des extraits
Réactifs	Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich	Dosage des polyphénols
	Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich	
	Acide gallique (AG)	Sigma	
	DPPH [•] 2,2-diphenyl-1picrylhydrazyl	Sigma-Aldrich	Activité antioxydante

• Composés phénoliques

- **Acides phénoliques** : acide tannique (AT).

• Préparation du composé phénolique standard

Une concentration de 10 mg/ml du CP est préparée dans 1 ml de DMSO. Puis, cette solution est bien agitée à l'aide d'un vortex jusqu'à la dissolution complète de l'AT.

• Les milieux de cultures

Suivant les méthodes employées et selon les souches ; les milieux de culture utilisés sont :

- Gélose Müeller Hinton (MH) (CONDA);
- Agar-Agar (CONDA);
- Bouillon nutritive N 1 (Fluka Biochemika);
- Bouillon Cœur- Cerveille (BHIB).

I.1.5. Les souches bactériennes utilisées

Pour notre étude microbiologique nos tests ce sont effectués sur des souches pathogènes de référence.

Tableau VI. Les souches bactériennes utilisées dans notre étude microbiologique.

Groupes	Souches	Codes
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC10876
	<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 9885
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Brochotrix thermosphacta</i>	CIP 103251
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 0409
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25322
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700600
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC4352
	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Pseudomonas marginalis</i>	DSM 13124

I.2. Méthodes

I.2.1. Extraction des polyphénols des margines, des feuilles et des brindilles

I.2.1.1. Feuilles et brindilles de l'olivier sauvage et feuilles du laurier

I.2.1.1.1. Préparation des extraits bruts aqueux

Une quantité de 1 g de poudre de feuilles de l'olivier et du laurier prise séparément, est mélangée avec 30 ml d'eau distillée dans un bécher, ce dernier est placé sous une agitation magnétique pendant 3h à 40°C. Une filtration est ensuite effectuée. Ce procédé est illustré dans le schéma représenté par la figure 10.

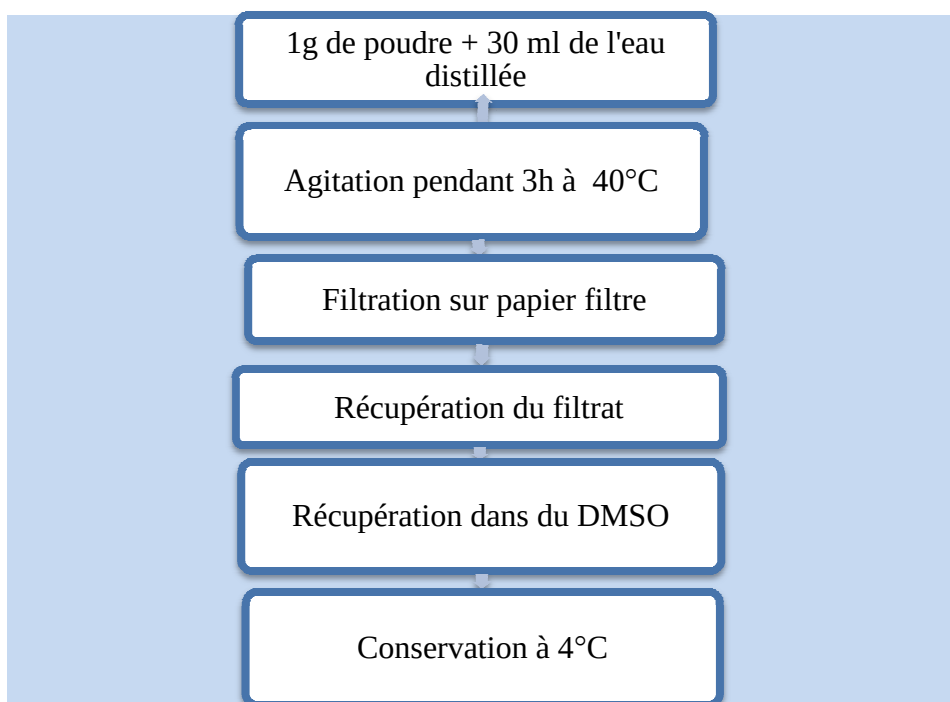


Figure 10. Protocole d'obtention des extraits aqueux. (modifié)

Les filtrats sont lyophilisés, puis récupérés dans un minimum de volume du DMSO et vont être conservés dans des flacons à 4° C, à l'abri de la lumière dans le but de préserver la stabilité des principes actifs présents jusqu'à leur utilisation ultérieure.

I.2.1.1.2. Préparation des extraits organiques (éthanol et acétate d'éthyle)

• Extraction sans délipidation et dépigmentation

Une quantité de 5 g de poudre (feuilles et brindilles) est macérée dans un volume de 150 ml de solvant, ce volume est ensuite placé dans un b cher de 250 ml sous une agitation magnétique pendant 2h à température ambiante. Une filtration sur papier filtre est effectuée pour les mélanges à l'éthanol et une centrifugation pour ceux à l'acétate d'éthyle à 5000trs/5 min, le filtrat et/ou le surnageant récupéré est séché à 40 C. Après évaporation du solvant, l'extra t sec résultant est reconstitué dans du DMSO (figure 11).

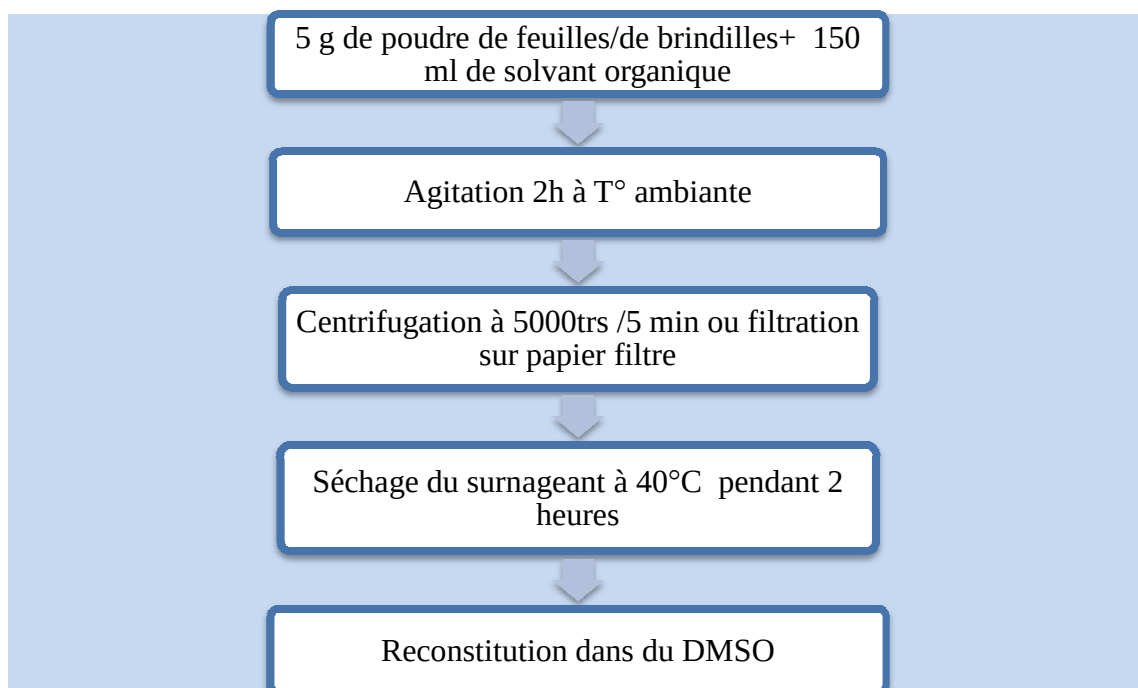


Figure11. Protocole d'extraction des composés phénoliques par les solvants organiques.(modifié)

I.2.1.1.3. Préparation d'infusions de feuilles (oléastre/laurier) et de brindilles (oléastre)

Une décoction de feuilles/ brindilles fraîches dans de l'eau distillée est préparée à 100°C laissée pendant 2h, puis filtrée à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat sera utilisé pour les tests à suivre.

I.2.1.2. Les margines

✓ Préparation des extraits organiques (acétate d'éthyle et diéthyle éther)

• Extraction sans délipidation et dépigmentation

Un volume de margines est additionné de solvant (v/v), le mélange est ensuite versé dans un bécher sous une agitation magnétique pendant 2h à température ambiante. L'ensemble est centrifugé à 4°C, à une vitesse de 5000trs/5min. Après la centrifugation le mélange est complètement séparé en deux phases : le solvant riche en polyphénols (surnageant) et les margines (résidus). Le surnageant est récupéré et séché à 40°C jusqu'à évaporation du solvant. L'extrait sec est récupéré dans un volume minimum du DMSO (figure 12).

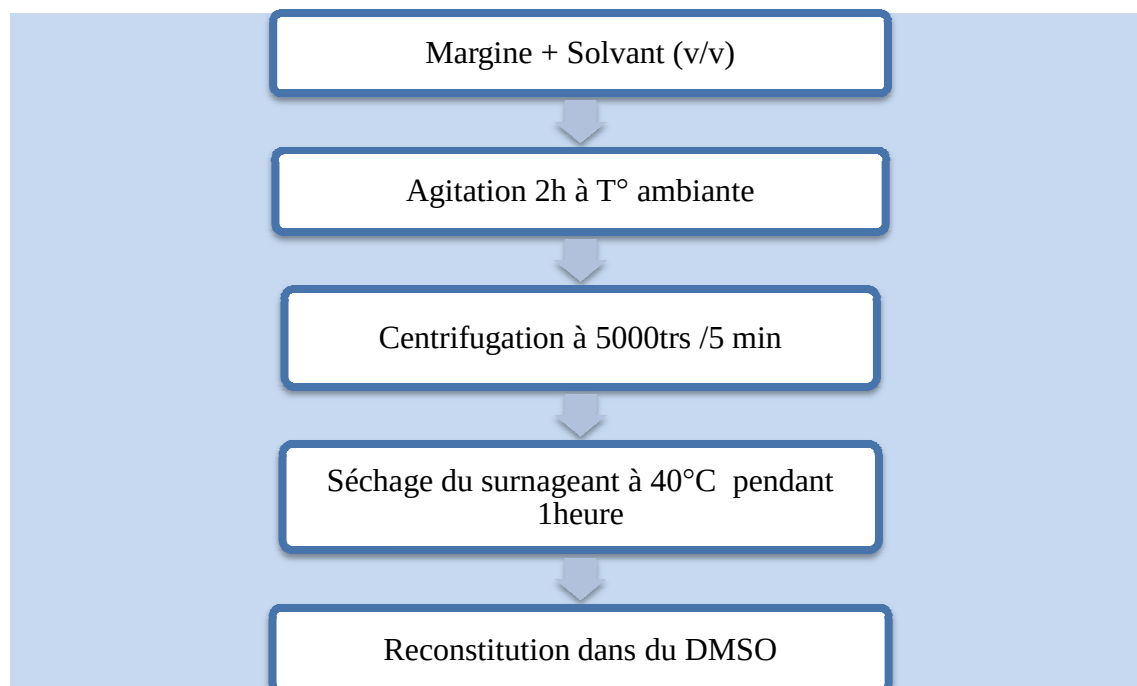


Figure 12. Protocole d'obtention des polyphénols à partir des margines.

- **Extrait d'acétate d'éthyle après délipidation et dépigmentation**

Un volume de margines est additionné à un volume d'hexane, le mélange ensuite est mis dans un bécher de 1000 ml sous une agitation magnétique pendant 2h à température ambiante. Après l'agitation, l'ensemble est centrifugé à température 4°C, à une vitesse de 5000trs/5min. Après la centrifugation le mélange est complètement séparé en deux phases : l'Hexane riche en (lipides, pigments) (surnageant) et les margines. Les margines sont traités par l'acétate d'éthyle (figure 13).

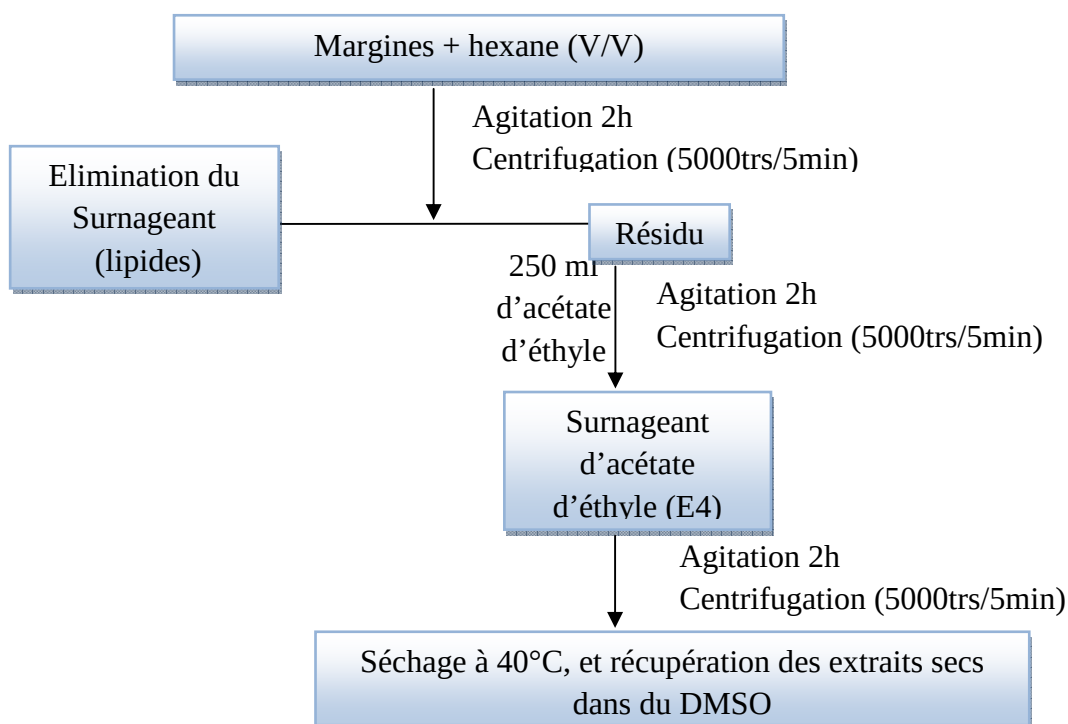


Figure 13. Protocole d'extraction des polyphénols des margines après délipidation.(modifié)

I.2.2. Analyse quantitative des échantillons

I.2.2.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

- **R (%)** : Rendement exprimé en % ;
- **M**: Masse en gramme de l'extrait sec résultant ;
- **M₀**: Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

I.2.2.3. Dosage des phénols totaux des feuilles et brindilles de l'olivier sauvage des margines et des feuilles du laurier

• Principe

L'ensemble des CP est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (RIBEREAU-GAYON, 1968). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de CP présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 750 nm.

• Protocole

Le dosage des phénols des margines, des brindilles et des feuilles d'olivier, ainsi que les feuilles du laurier illustré par la figure 14, est déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu (MACHEIX *et al*, 1990).

La gamme étalon est réalisée dans une gamme de 0 à 10 mg/l d'AG. La teneur en phénols totaux des extraits est exprimée en équivalent d'AG.

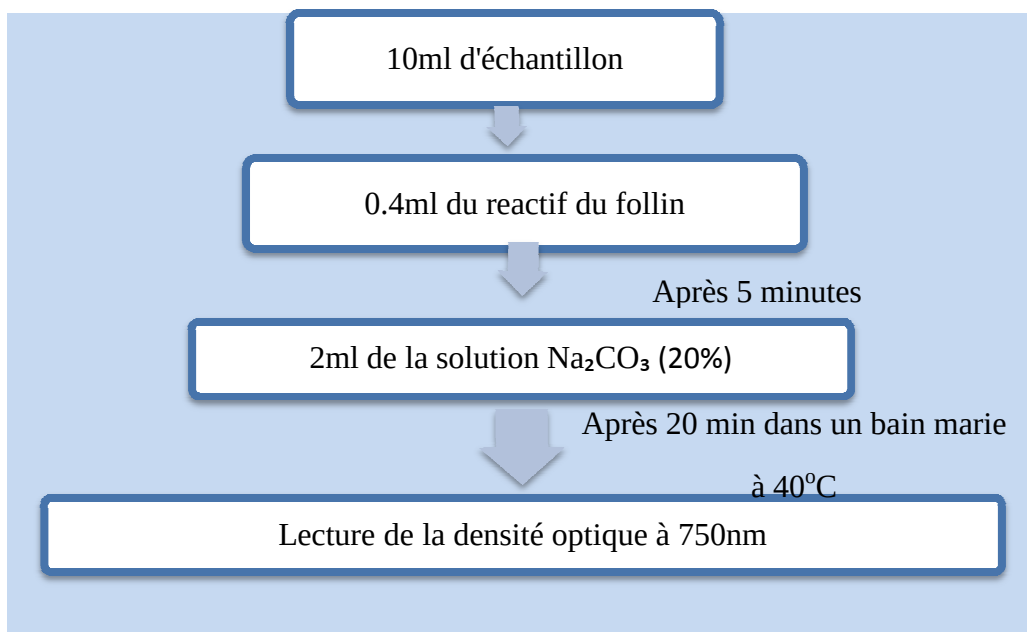


Figure 14. Protocole du dosage des polyphénols.(modifié)

I.2.2.4. Mise en évidence de l'activité antioxydante

- Test de piégeage du radical DPPH•

• Principe

Cette méthode utilisant le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), un radical libre, colore, stable, facile à doser et capable d'arracher les atomes hydrogène labiles des groupements OH les plus réactifs, et présentant un maximum d'absorption à 517 nm. En présence d'un antioxydant, le DPPH• est réduit en DPPH et sa réduction se traduit par le passage de la couleur violette de la solution à la couleur jaune. Ceci conduit à la diminution de l'absorbance du radical libre à 517nm. La structure ainsi que la réaction impliquant le DPPH• se résume dans la figure 15 de la façon suivante :

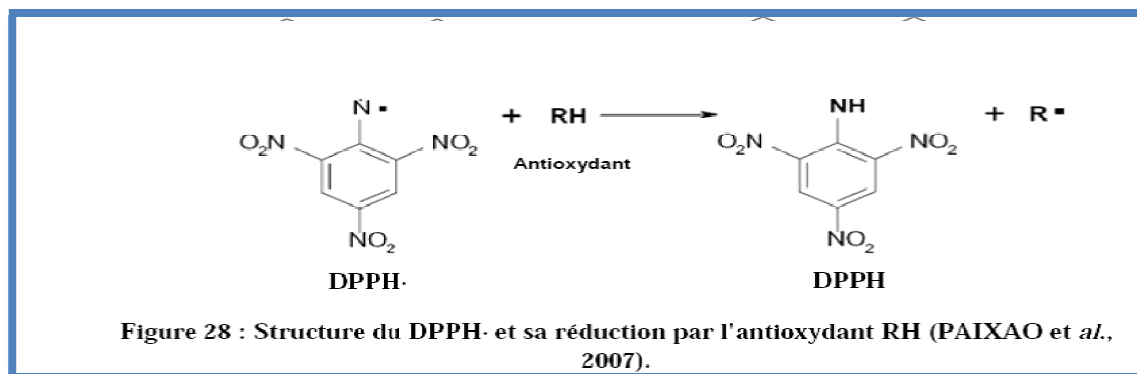


Figure 28 : Structure du DPPH• et sa réduction par l'antioxydant RH (PAIXAO *et al*, 2007).

Figure 15. Structure du DPPH• et sa réduction par l'antioxydant RH (PAIXAO *et al*, 2007).

- **Protocole expérimental**

La capacité de piégeage du DPPH• est déterminée suivant la méthode décrite par BRAND-WILLIAMS *et al*, (1995). Brièvement, 2 ml d'une solution de DPPH•, 0,1mM dans de l'éthanol, sont rajoutés à 20µl des extraits à tester. Le mélange est par la suite agité. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH•. L'activité de piégeage du radical DPPH• est calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Le \% de piégeage du radical DPPH} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

Où :

A₀ : l'absorbance du contrôle à temps t = 0 en absence des extraits à tester.

A₁ : l'absorbance de l'échantillon à temps t (temps nécessaires pour atteindre l'état stationnaire), il varie suivant l'extrait testé et sa concentration.

Une cinétique du suivi de l'oxydation des extraits par le DPPH a été effectuée, une prise des DO d'un intervalle de 10 min est faite. Cela, est suivi d'une tracée de courbes.

I.2.3. Évaluation de l'activité antibactérienne

I.2.3.1. Tests antibactériens

Une méthode a été choisie pour évaluer l'effet antibactérien des différents extraits bruts des feuilles, brindilles de l'olivier, feuilles du laurier, margines, et l'AT:

-La méthode de diffusion en milieu gélosé, qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne, suivi par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture, par la méthode de micro-dilution .

- **Préparation des pré-cultures**

Des repiquages successifs sont effectués à partir des milieux de conservation des souches de référence. Ils sont réalisés sur des boîtes de gélose nutritive (ensemencement par stries) après revivification dans des bouillons de culture à 37°C/24h, (30°C/24h pour *B. thermosphacta*).

- **Préparation de la suspension bactérienne**

A partir de culture bactérienne jeune, des colonies sont prélevées est remises en suspensions dans de l'eau physiologique stérile. Une agitation au vortex est ensuite effectuée pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à 10⁶ UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm.

Selon Mac Farland, on admet qu'une densité optique (DO) comprise entre 0,08-0,1 correspond à une concentration de 10⁷ à 10⁸ germes/ml, la suspension d'inoculum est diluée au 1/10 pour avoir une concentration de 10⁶ germes/ml.

I.2.3.1.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé

- Test de sensibilité aux extraits bruts, et au composé phénolique

• Ensemencement et dépôt des disques

L'écouvillonnage est la méthode d'ensemencement réalisée sur boîtes de Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. Ensuite un étalement de haut en bas en stries serrées est effectué avec l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée. L'écouvillon est à chaque fois rechargé pour ensemenecer une nouvelle boîte de Pétri avec la même souche. Des disques imprégnés de 20 µl d'extraits ou de CP sont déposés délicatement sur la surface de la gélose précédemment inoculée à l'aide d'une pince stérile. Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C (30°C/24h pour *B. thermosphacta*).

• Lecture des résultats

La lecture a été faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions formées autour des disques. Chaque essai a été réalisé deux fois et les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne $\pm$ écart type. La sensibilité aux différents extraits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit :

- Non sensible (-) pour le diamètre moins de 8 mm ;
- Sensible (+) pour un diamètre entre 9 à 14 mm;
- Très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour le diamètre plus que 20 mm (MOREIRA *et al*, 2005).

I.2.3.1.2. Détermination des paramètres d'inhibition: CMI, CMB

La détermination de la CMI n'est faite que pour les extraits et CP ayant montrés une activité meilleure sur milieu solide.

- Méthode de dilution en milieu liquide (micro-méthode)

✓ Mode opératoire

Une progression géométrique de raison d' 1/2 des concentrations du CP, d'extraits de margines et feuilles d'olivier, laurier et brindilles d'oléastre (tableau VI) a été réalisée dans 100 µl de bouillon cœur cervelle (BHIB). Un volume d'inoculum de 10⁶ UFC /ml a été par la suite ensemenecer. Les témoins sont réalisés comme suit :

- Témoin négatif : extrait brut + milieu de culture ;
- Témoin positif : inoculum bactérien + milieu de culture.

Les cultures ont été incubés pendant 24h à 37 °C à l'exception de *B. thermosphacta* qui a été incubée à 30°C/24h. Après incubation, la CMI a été déterminée comme étant la plus faible concentration ayant inhibé toute croissance visible.

✓ Préparation de la gamme des dilutions

Tableaux VII. Représentant les dilutions réalisées pour la détermination des CMI.

Rapport de dilution extrait brut ou CP/BHIB	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
%	50	25	12,5	6,25	3,12

Dans le cas où l'effet est bactéricide, le même principe est appliqué pour déterminer la CMB, qui est définie comme étant la plus faible concentration pour laquelle les bactéries sont détruites.

- **Rapport CMB/CMI**

Les CMI et les CMB déterminées sont caractéristiques d'un extrait pour une souche donnée. Ainsi donc, l'action d'un extrait sera considérée comme bactéricide si le rapport CMB/CMI est égal à 1. L'action est dite bactériostatique si le rapport CMB/CMI est supérieur à 1 (KAROU *et al.*, 2005).

I.2.4. Evaluation de l'activité antibiofilm

La méthode entreprise pour évaluer l'activité antibiofilm de nos différents extraits est celle de la microplaque de titration à 96 puits. Ce test est précédé d'une préparation de précultures et de suspensions bactériennes.

.Test de formation du biofilm

L'aptitude d'adhérence des souches de références sur la microplaque est vérifiée en ayant déposé un inoculum de la suspension bactérienne neuve préparée dans du BHIB. Le dépôt est répété dans trois puits pour chaque souche. Ensuite, la microplaque est incubée à 37°C pendant 24 heures.

La révélation de la formation est établie par la méthode colorimétrique au cristal violet. Celle-ci consiste à effectuer des colorations et lavages des puits vidés de la microplaque.

Le contenu des puits est ensuite exploité pour une éventuelle lecture des DO au spectrophotomètre à 595 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{\text{DO du contrôle négatif} - \text{DO du test}}{\text{DO du contrôle}} \times 100$$

II. Résultats et Discussion

II.1. Le rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage (%) par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction. Le Rendement d'extraction des extraits organiques des feuilles et brindilles d'oléastre et feuilles de laurier sont consignés dans le tableau ci-dessous.

L'analyse du tableau VIII nous montre que les rendements d'extraction varient en fonction du solvant organique utilisé pour les extraits organiques.

Tableau VIII. Résultats du rendement (%) d'extraction des extraits bruts de feuilles, brindilles de l'olivier et feuilles de laurier.

Extraits	Rendement (%)
EEB	18
EAEB	8,80
EEFL	24
EAEFL	11,60
EEFO	38

EEB : extrait de brindilles à l'éthanol ;

EAEB : extrait de brindilles à l'acétate d'éthyle ;

EEFL : extrait de feuilles du laurier à l'éthanol ;

EAEFL : extrait de feuilles du laurier à l'acétate d'éthyle ;

EEFO : extrait de feuilles d'oléastre à l'éthanol.

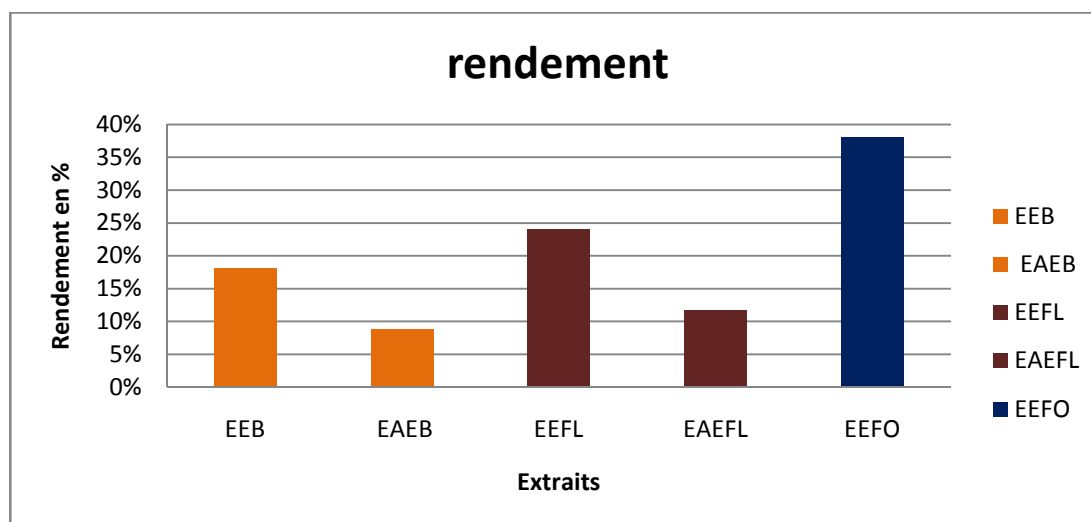


Figure 16. Rendement en (%) des extraits bruts des feuilles, brindilles de l'oléastre et feuilles du laurier.

Les résultats obtenus révèlent que les extraits organiques à l'éthanol représentent un rendement en PPT d'extraction meilleur avec un pourcentage de 38%, 24% et 18% pour les extraits de feuilles d'olivier, de laurier et brindilles d'oléastre respectivement. Cependant, ceux obtenus avec l'acétate d'éthyle qui sont nettement inférieur avec un rendement faible de (11,60% et 8,80%) pour les extraits de feuilles de laurier et brindilles d'oléastre respectivement.

Ces résultats confirment les études qui ont rapportés que les hauts rendements sont habituellement obtenus avec l'éthanol et le méthanol et leurs mélanges avec l'eau. En effet l'eau joue un rôle important dans le processus d'extraction des polyphénols en augmentant leur diffusion des tissus végétaux (ALTIOK *et al*, 2008). Aussi, nos résultats sont très proches à ceux obtenus par ARAB *et al* (2013) avec 38,74% pour l'extrait des feuilles de l'olivier sauvage au méthanol.

Comparer les résultats avec ceux de la bibliographie s'avère difficile, vu que le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénols et flavonoïdes ainsi que l'activité antioxydante (LEE *et al*, 2003).

II.2. Résultats des dosages de PPT des extraits des feuilles et brindilles de l'olivier sauvage et feuilles de laurier

La réalisation du dosage des PPT se fait par la méthode de Folin-Ciocalteu. Une méthode considérée comme étant la meilleure méthode de détermination du taux des PPT des extraits de plantes (DJERIDANE *et al*, 2010) du fait qu'elle est standardisée, simple, reproductible et les interférences avec la matrice de l'échantillon qui est souvent coloré sont minimisés à la grande longueur d'onde d'absorption (765 nm) utilisée (HUANG *et al*, 2005 ; 2013). La figure ci-dessous représente le courbe étalon obtenue.

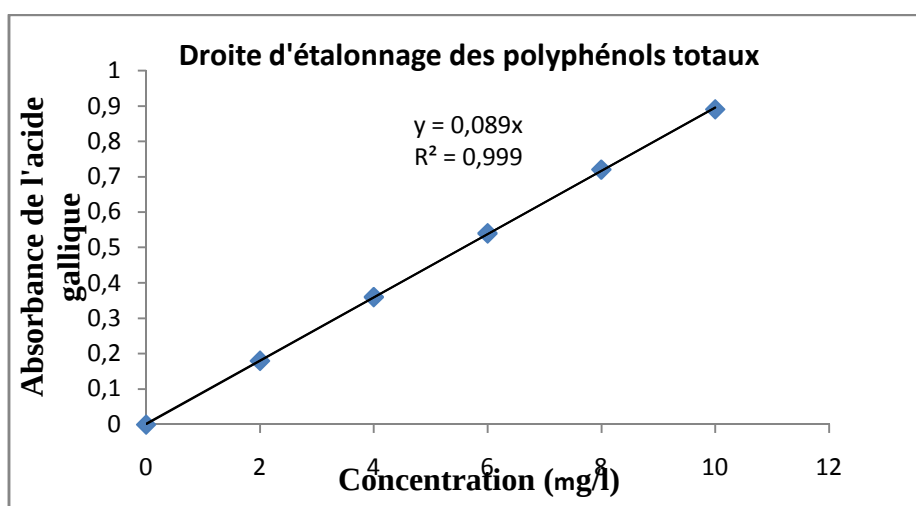


Figure 17. Courbe d'étalonnage pour le dosage des PPT en équivalent d'acide gallique.

II.2.1. La teneur en PPT des extraits de feuilles et brindilles de l'olivier sauvage

Tableau IX. Résultats du dosage des PPT des extraits d'oléastre

Exprimée en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g) de matériel végétal, les valeurs sont la moyenne de 2 essais $\pm$ SD.

	Extraits	Teneur en polyphénol (mgEAG/g)
Extraits organiques	EEFO	65,75 $\pm$ 0
	EAEFO	64,31 $\pm$ 0,858
	EEB	62,29 $\pm$ 4,004
	EAEB	21,78 $\pm$ 0,286
	EEBD	87,64 $\pm$ 4,131
	EAEBD	14,02 $\pm$ 0,381
Extraits aqueux	LFO	99,44 $\pm$ 4,767
	IFO	18,26 $\pm$ 0,953
	IBO	3,31 $\pm$ 0,083

EAEFO : extrait de feuilles d'oléastre à l'acétate d'éthyle;

EEBD : extrait de brindilles à l'éthanol à DMSO;

EAEBD : extrait de brindilles à l'acétate d'éthyle à DMSO;

LFO : lyophilisat feuilles d'oléastre;

IFO : infusion feuilles d'oléastre;

IBO : infusion brindilles d'oléastre.

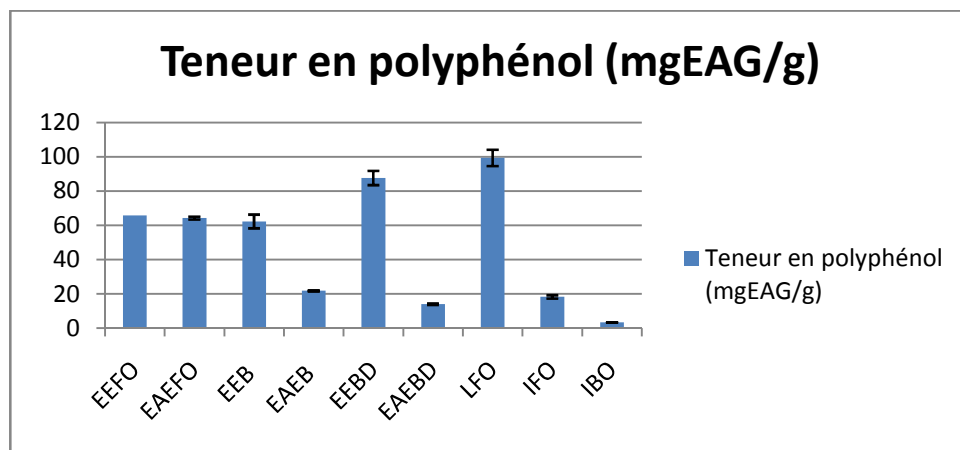


Figure 18. Teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles et brindilles d'oléastre.

II.2.2. La teneur en polyphénols totaux des feuilles de laurier

Tableau X. Résultats du dosage des PPT des extraits de laurier : exprimée en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g) de matériel végétal, les valeurs sont la moyenne de 2 essais $\pm$ SD.

	Extraits	Teneur en polyphénols (mgEAG/g)
Extraits organiques	EEFL	28,65 $\pm$ 0,953
	EAEFL	2,54 $\pm$ 0,002
	EEFLD	7,01 $\pm$ 0,238
Extraits aqueux	LFL	76,35 $\pm$ 9,296
	IFL	1,54 $\pm$ 0,04

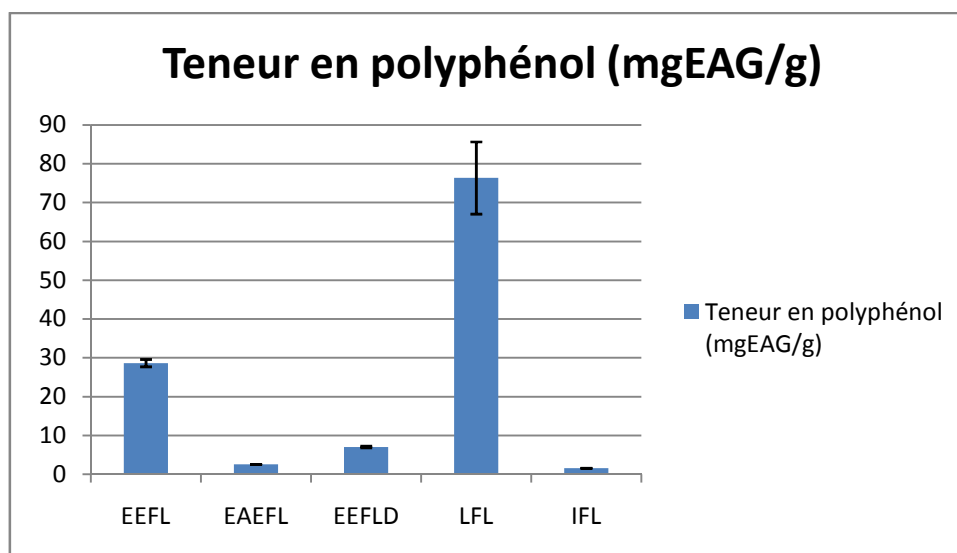


Figure 19. Teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles laurier.

EEFL : extrait éthanolique feuilles de laurier ;
EAEFL : extrait acétate d'éthyle feuilles de laurier ;
EEFLD : extrait éthanolique feuilles de laurier DMSO;
LFL : lyophilisat feuilles de laurier ;
IFL : infusion feuilles de laurier.

Les valeurs obtenues pour le contenu phénolique sont récapitulées dans les tableaux VIII et IX. Parmi les différents extraits de l'oléastre la fraction éthanol - eau a montré le montant le plus élevé en CP. Cette quantité diminue avec la polarité du solvant utilisé, l'éthanol puis l'acétate d'éthyle. Dans des études précédentes, il a été signalé que des solvants tels que le méthanol et l'éthanol, en combinaison avec l'eau ont été employés habituellement pour l'extraction du contenu phénolique et flavonoïdes de plantes (SAHA *et al*, 2008). En

outre la polarité du solvant est d'intérêt dans le processus d'extraction des CP et flavonoïdes. Habituellement les solvants les plus polaires sont considérés comme les plus appropriés à l'extraction de ces composés.

Pour l'extrait organique des feuilles d'oléastre, la fraction phénolique la plus importante est enregistrée avec l'EEFO ($65,75 \pm 0$) mg/g de matériel végétal suivi par l'EAEFO ($64,31 \pm 0,86$) mg/g. Pour ce qui est des extraits aqueux, on remarque que l'LFO présente une teneur importante en CP ($99,44 \pm 4,77$), par rapport à l'IFO ($18,26 \pm 0,95$).

Pour les extraits de brindilles, l'EEB et l'EEBD présentent une teneur élevée en CP ($62,29 \pm 4,00$ et $87,64 \pm 4,13$) mg EAG/g de poudre respectivement, par contre l'EAEB et l'EAEBD ($21,78 \pm 0,28$ et $14,02 \pm 0,38$) mg/g respectivement, présentent une teneur basse en CP. Ceci indique que l'éthanol rapporte mieux les CP que l'acétate d'éthyle. L'extrait aqueux IBO a enregistré la plus faible valeur avec ($3,31 \pm 0,08$) mg/g MV.

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de la poudre de feuilles selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction.

En comparant nos résultats à ceux obtenus par (KHLIF *et al*, 2015), la teneur en polyphénols enregistrée pour les extraits de feuilles et brindilles de l'olivier (variété *chetoui*) obtenue, sont de l'ordre de ($105,21 \pm 1,83$ pour le solvant méthanoïque et $86,64 \pm 1,42$ pour l'acétate d'éthyle) mg EAG/g d'extrait de feuilles, et de ($90,01 \pm 0,62$ pour le solvant méthanoïque et $65,10 \pm 0,80$ pour l'acétate d'éthyle) mg EAG/g d'extrait de brindilles.

Pour les résultats obtenus pour les feuilles de laurier aux solvants organiques, les taux les plus élevés en PPT sont enregistrés avec les extraits éthaniques (EEFL avec $28,65 \pm 0,953$ et EEFLD avec $7,01 \pm 0,238$) mg EAG/g de MV. Les résultats de (MOHSEN et AMMAR, 2009) ont prouvé que l'éthanol est le meilleur solvant pour l'extraction des CP du corn tassels, suivi du méthanol et finalement par l'eau.

Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif, donnant un taux phénoliques apparent élevé (TAWAHA *et al*, 2007). En outre, certaines substances, telles que la vitamine C, les caroténoïdes, les sucres réducteurs et les acides aminés phénoliques, peuvent en réduisant le complexe phosphotungstique-phosmolybdénique interférer et conduire à une surestimation de la teneur en CP (OBIED *et al*, 2005). En fait cette méthode donne un aperçu sur la qualité réductrice d'un ensemble de composés en plus des CP.

La différence de teneur en PPT entre nos résultats et celles des autres auteurs peuvent être due aux méthodes d'extraction utilisés, la quantité de poudre, et le volume de solvant dans lequel la poudre est macérée. La variation de la teneur en PPT est souvent considérable, elle est dépendante de plusieurs facteurs : les conditions climatiques et géographiques (VASILEIOS ZIOGAS *et al*, 2010), les variétés de l'olivier, les conditions de culture et du degré de maturation (BOUDHRIOUA *et al*, 2009 ; VASILEIOS ZIOGAS *et al*, 2010), l'état physiologique et l'âge de la plante (DE LEONARDIS *et al*, 2008).

Plusieurs facteurs influencent l'extraction des CP à partir de la matière végétale tels que le type et le volume du solvant utilisé, la taille des particules de l'échantillon, le temps d'extraction, les conditions de stockage de l'échantillon, le pH et la température (NACZK et SHAHIDI, 2004 ; ALTIOK, 2010).

Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (SEIDEL, 2005). De plus, le déroulement de la macération sous agitation pendant un temps étalé et à température ambiante permet, respectivement, l'épuisement du solvant en composés extraits et la prévention de leur altération ou modification probable par la température élevée.

Les teneurs en PPT déterminées ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols du matériel de départ, elles sont en fait, basées sur la capacité réductrice relative à une capacité réductrice équivalente à l'acide gallique (EAG). Les valeurs obtenues par la méthode colorimétrique fournissent des informations directes sur la quantité des groupes phénoliques antioxydants de l'extrait qui dépend essentiellement du nombre des groupes hydroxyles de ces derniers (BALASUNDRAM *et al*, 2006).

II.2.3. La teneur en PPT des extraits de margines

Parmi les trois extraits à l'acétate d'éthyle, la teneur la plus élevée en polyphénols est obtenue pour l'extrait EMA (986.52±0.04), suivi de EMA2 (534,27 ±0.79). Puis vient ensuite l'EMA1 (210,67 ±0.016).

Tableau XI. Résultats du dosage des PPT des extraits de margines : exprimée en ug/ml, les valeurs sont la moyenne de 2 essais ± SD.

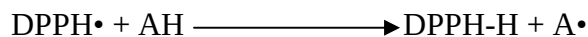
Extrait	Teneur en PPT en ug/ml
EMA 2	534,27 ±0.79
EMA1	210,67 ±0.016
EMA	986,52 ±0.04

Ces valeurs sont proches à celles des margines marocaines de la région de Marrakech rapportées par EL HADJOUJI *et al*, (2008) qui sont de l'ordre de (0,79 ± 0,11) g/l, elles sont très loin de celles trouvées par SIFOUNE, (2008) pour les margines algériennes, par ENA *et al*, (2007) pour les margines Italiennes, et par Goncalves *et al*, (2011) pour des margines portugaises qui sont respectivement de l'ordre de 5,48 g/l, et de 4,36 g/l, et de 7,7 g/l.

En effet, ALLOUCHE *et al*, (2004) ont démontré que l'acétate d'éthyle est plus efficace que les autres solvants d'extraction avec un taux d'extraction élevé. L'acétate d'éthyle est confirmé être un solvant convenable pour la récupération des CP contenus dans la margine (VISIOLI *et al*, 1999 ; BCHERRAWI, 2002).

II.3. Résultats de la mise en évidence de l'activité antioxydante

Test DPPH : Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH•. La réduction de ce radical par un donneur d'atome H venant de l'antioxydant à tester AH conduit à la formation de la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore DPPH-H et au radical A•.



L'activité antioxydante des différents extraits de l'olivier (feuilles, margines) ont été évaluée en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Ce chromogène violet est facile à utiliser, a une grande sensibilité, permet l'analyse rapide de l'activité antioxydante d'un grand nombre d'échantillons et donne des résultats reproductibles (GULÇIN *et al*, 2010).

II.3.1. Activité antioxydante des extraits d'oléastre, des feuilles de laurier et margines

Douze de nos extraits ont été soumis à la détermination de leur activité antioxydante, par la méthode du DPPH.

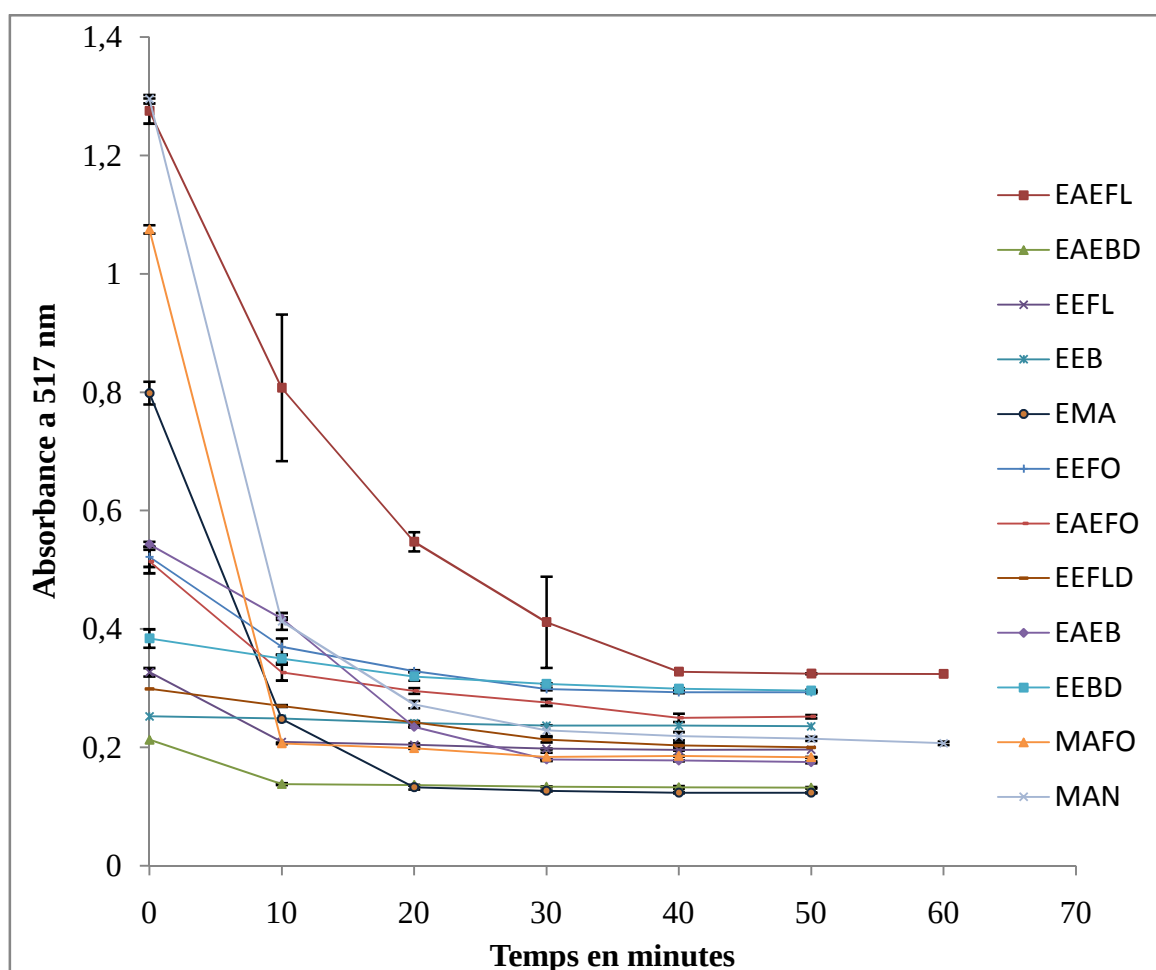


Figure 20. Cinétique de l'activité antioxydante des différents extraits de l'oléastre, laurier et margines.

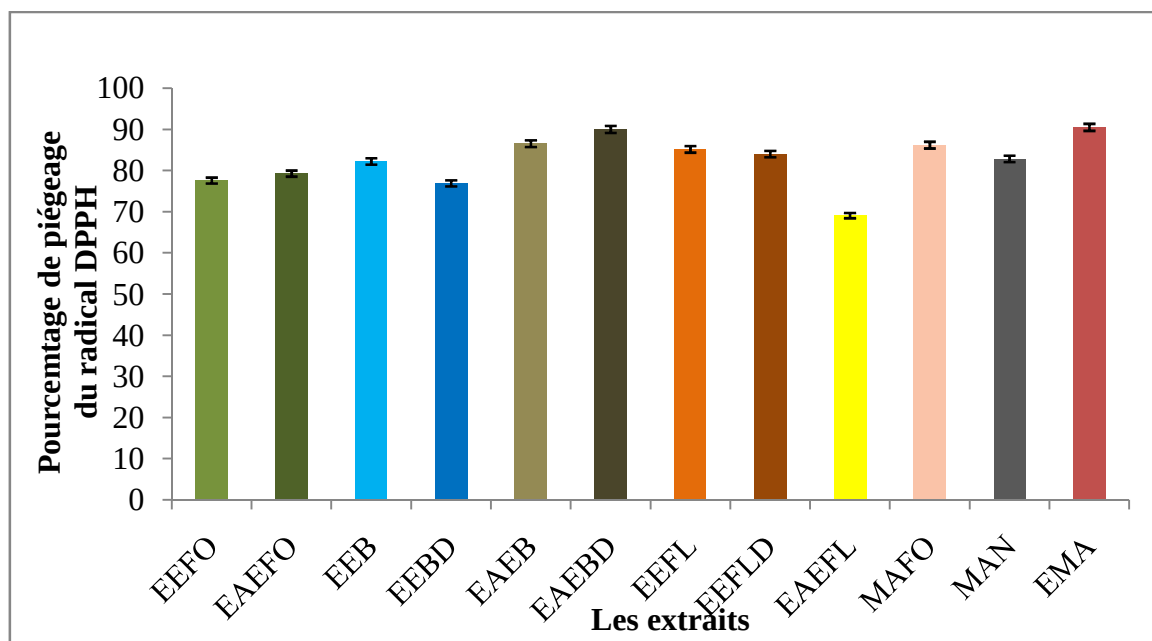


Figure 21. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits des feuilles et brindilles de l'olivier sauvage, les feuilles de laurier et les margines.
(Chaque valeur représente la moyenne de deux essais $\pm$ SD).

La figure 20, montre l'évolution du piégeage du radical libre DPPH de nos extraits par l'enregistrement des DO à 517 nm chaque 10 minutes. Les résultats obtenus dans les graphes et histogrammes on montré une activité antioxydante remarquable des différents extraits. Avec une évolution rapide des extraits de margines et brindille à l'acétate d'éthyle alors que le taux de piégeage du DPPH le plus élevé est enregistré avec l'extrait EAEFL (figure 21).

Les résultats de KHLIF *et al* (2015) montrent que les extraits méthanoliques ont une activité antioxydante plus élevée que les extraits à l'acétate d'éthyle, cette différence entre nos résultats et les leurs pourrait être dû à la variation de la composition chimique de nos extraits testés et leurs concentrations.

II.4. Résultats de l'activité antibactérienne : Méthode de diffusion sur l'agar

L'activité antibactérienne des extraits bruts (feuilles et brindilles de l'oléastre, feuilles de laurier et margines), ainsi que l'AT a été évaluée dans cette étude par la technique de diffusion sur l'agar (méthodes des disques) vis-à-vis de 14 souches bactériennes après 24 heures d'incubation à une température adéquate pour chaque souche. Cette méthode permet de tester différents composés contre un seul microorganisme (RIOS et RECIO, 2005).

Notre étude microbiologique, a fait l'objet d'utilisation de 14 souches bactériennes pour ces tests. Le choix retombé sur ces bactéries est d'une part leurs incrimination à causer plusieurs maladies infectieuses qui constituent un sérieux problème de santé publique en raison de leurs résistances fréquentes aux agents antimicrobiens (antibiotiques, et autres agents biocides), tels que *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* et *K. pneumoniae* ; et d'autre part sur leur contribution à des maladies liées à la toxi-infection alimentaire.

D'autres bactéries par contre ne sont pas considérées comme pathogènes pour l'Homme, mais peuvent contaminer certains aliments et provoquer parfois une intoxication alimentaire comme *B. subtilis*. Alors que, *P. marginalis* est une bactérie du sol qui peut éventuellement causer des pourritures des tissus végétaux (SMITH *et al*, 1988) et *B. thermosphacta* est une bactérie d'altération des viandes.

II.4.1. Tests de sensibilités

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des extraits de l'olivier sauvage, margines, du laurier noble et de l'AT par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de nos produits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis des bactéries choisies, après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C (30°C pour *B. thermosphacta* CIP 103251). Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux représentés ci-dessous.

II.4.1.1. La sensibilité bactérienne aux extraits de feuilles et brindilles de l'olivier sauvage

Tableau XII. Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne $\pm$ SD) provoquées par les extraits de feuilles et brindilles de l'olivier sauvage et leurs sensibilité.

Bactéries testées	Valeurs des diamètres d'inhibition (mm) et sensibilité bactérienne						
	EEFO	EAEFO	EEB	EAEB	LFO	IFO	IB
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	/	/	11,5 $\pm$ 0,7	11 $\pm$ 0	10,5 $\pm$ 0,7	/	/
	-	-	+	+	+	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7,5 $\pm$ 0,70	/	8,5 $\pm$ 0,7	/	8,5 $\pm$ 0,70	/	/
	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25322	/	/	11,5 $\pm$ 0,7	/	9 $\pm$ 0	/	/
	-	-	+	-	+	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	24,4 $\pm$ 0,7	27,5 $\pm$ 0,7	31,5 $\pm$ 0,7	28,5 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,70	/	/
	+++	+++	+++	+++	+	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	/	/	/	/	7 $\pm$ 0	/	/
	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	7,5 $\pm$ 0,7	-	12,5 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,7	9,5 $\pm$ 0,7
	-	-	+	+	+	+	+
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	25 $\pm$ 0	20,5 $\pm$ 0,70	31,5 $\pm$ 0,7	20,5 $\pm$ 0,70	/	/	/
	+++	+++	+++	+++	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	8 $\pm$ 0	/	10,5 $\pm$ 0,7	/	8,5 $\pm$ 0,7	/	/
	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	8 $\pm$ 0	/	12,5 $\pm$ 0,7	/	9,5 $\pm$ 0,7	/	/
	-	-	+	-	+	-	-

<i>C. freundii</i>	7,5±0,70	/	8,5±0,7	9,5±0,7	7±0	/	/
ATCC 8090	-	-	-	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	/	/	/	/	9,5±0,7	/	/
ATCC 0409	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	/	/	/	/	10,5±0,7	/	/
ATCC 49452	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	7±0	/	/	/	10,5±0,7	/	/
ATCC 700600	-	-	-	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	8±0	/	10±0	/	/	/	/
ATCC 4352	-	-	+	-	-	-	-

(/) : pas de zone d'inhibition.

Les mesures des halos d'inhibition nous ont permis de classer les bactéries suivant leur degré de sensibilité aux extraits.

- Non sensible (-) pour un diamètre moins de 8 mm ;
- Sensible (+) pour un diamètre entre 9 à 14 mm ;
- Très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour un diamètre de plus de 20 mm (MOREIRA *et al*, 2005).

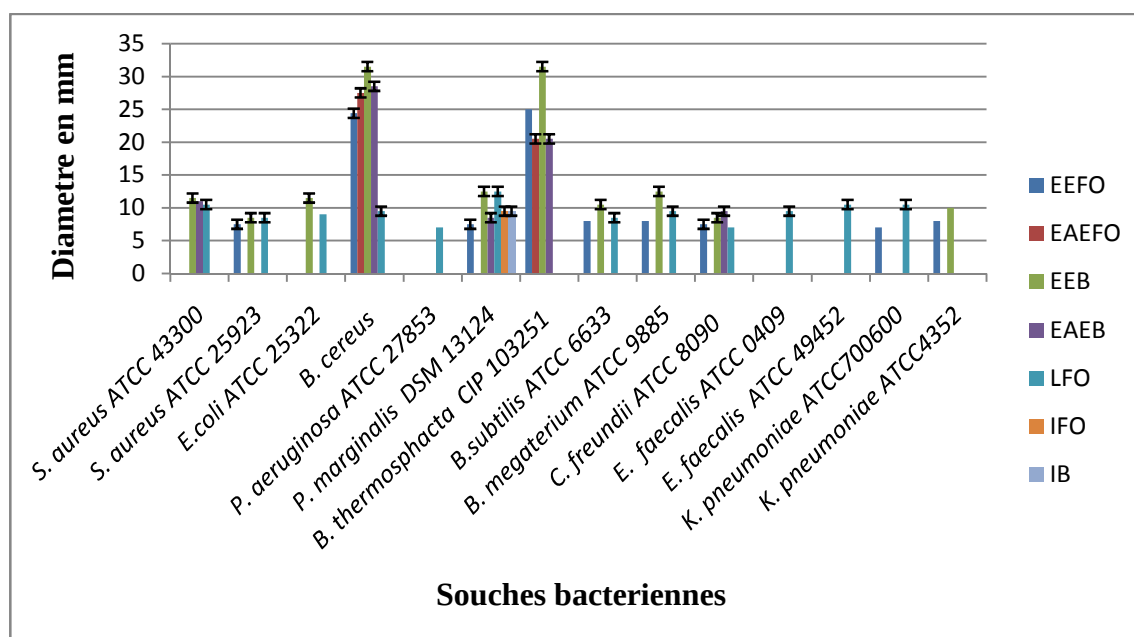


Figure 22. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exercés par les extraits bruts de feuilles et brindilles de l'olivier sauvage.

D'après le tableau XII, on remarque que, pour les extraits de feuilles de l'olivier sauvage (EEFO, EAEFO), la majorité de nos souches s'avèrent résistantes à ces derniers avec des zones de moins de 8 mm de diamètre, excepté les souches *B. cereus* ATCC 10876, *B. thermosphacta* CIP 103251 qui ont montré une forte sensibilité avec des zones importantes

de (24,4±0,7 et 25±0 pour EEFO ; et de 27,5±0,7 et 20,5±0,70 pour EAEFO) respectivement pour les deux souches.

Pour ce qui est des extraits de brindilles d'oléastre (EEB et EAEB), les souches *B. cereus* et *B. thermosphacta* CIP 103251 expriment une extrême sensibilité vis-à-vis de ces extraits avec des diamètres de (31,5±0,7 ; 28,5±0,7 et 31,5±0,7 ; 20,5±0,70)mm de ϕ , et une faible sensibilité est marquée par les souches (*P. marginalis* DSM 13124, *S. aureus* ATCC 43300). Alors qu'une non sensibilité totale a été relevée pour les souches *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 0409/ ATCC 49452 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700600. Tandis que les souches *E.coli* ATCC 25322, *B.subtilis* ATCC 6633, *B. megaterium* ATCC 9885 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 sont sensibles pour l'EEB et non sensible pour EAEB.

Près de la totalité des souches sont non sensibles pour les extraits aqueux (IFO et IB), sauf pour *P. marginalis* DSM 13124 qui a donnée une zone d'inhibition (9,5±0,7) pour les deux extraits, alors que l'extrait aqueux lyophilisé (LFO) a donné des résultats qui variables entre non sensible et sensible.

D'après nos résultats, les souches, *S. aureus* ATCC 25923, et *P. aeruginosa* ATCC 27853 sont des bactéries ayant une résistance totale pour tous les extraits de l'olivier sauvage testés. Néanmoins, *B. thermosphacta* CIP 103251 et *B. cereus* présentent les souches les plus sensibles pour tous les extraits.

Les résultats obtenus par OUTAYEB et TOUABI (2014), montrent que les extraits bruts des feuilles d'olivier variété *chamlal* n'ont aucun effet antibactériens vis-à-vis des *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. marginalis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*. Ces résultats sont confirmés par les nôtres. Ils ont enregistré une activité antibactérienne de 13 et 12.5± 0.7 mm pour les extraits organiques contre la souche *B. thermosphacta*, comparé à nos résultats ils sont inférieurs (25±0 et 20,5±0,7), cette différence peut être due à la différence entre les variétés testées.

En comparant ces résultats à ceux obtenus par AKROUR et HARANI (2011), l'extrait brut de la variété de *chamlal* a une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus* (15,33 mm) et une faible activité avec *E. coli* (10 mm). Cette différence est due probablement à la diversité des régions de collecte des feuilles, la variété, la période, la partie de l'arbre considéré pour leur récolte et l'altitude de la région par rapport au niveau de la mer.

Par ailleurs, les résultats obtenus par DJENANE et ses collaborateurs en 2012, avec la variété *azarradj*, vis-à-vis de *S. aureus* (16, 33 ± 1,8 mm) et *P. aeruginosa* (15, 29 ± 1,9 mm), montrent que nos valeurs sont remarquablement faibles. Ceci est dû principalement à la différence des variétés utilisées.

D'après les résultats exprimés dans le tableau VIII, les extraits organiques des brindilles ont une activité appréciable contre la plupart des souches étudiées avec des zones allant de 8,5±0,7mm à 31,5±0,7 pour EEB et de 9,5±0,7 à 28,5±0,7 pour EAEB. Par contre aucune inhibition n'a été marquée pour ces deux extraits par les souches *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 0409/ ATCC 49452 et *K. pneumoniae* ATCC700600. Aussi mis à part *P. marginalis* DSM 13124, toutes les souches ont exprimées une résistance à l'extrait aqueux IB.

HUSSAIN *et al* (2014) ont trouvés des zones d'inhibitions important pour l'extrait éthanolique des brindilles contre les souches *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *C. freundii* ($18,16 \pm 0,28$; $20,33 \pm 0,57$; $18,33 \pm 0,57$; $16,5 \pm 0,5$; $20,5 \pm 0,5$) respectivement. Ces résultats sont nettement supérieurs aux notre, cela pourrait être du à la variation des méthodes d'extraction donc en teneur en PPT, qui est influencée par le degré de maturité, comme il a été signalé par FABBRI *et al* (2008).

En général, les *S. aureus* sont résistants aux extraits naturels des plantes, comme celles obtenues par KALOUSTIAN *et al*, (2008) qui ont observé une absence d'activité antibactérienne des huiles essentielles de *lavande* vis-à-vis de la souche *S. aureus*.

L'efficacité de l'activité antibactérienne des extraits dans cette étude, pourrait être attribuée à la présence de concentrations élevées en oleuropéine, hydroxytyrosol et verbascoside. Les trois polyphénols sont considérés par plusieurs auteurs comme des antibactériens et antifongiques potentiels (AZIA *et al*, 1998 ; BISIGNANO *et al*, 2000 ; SUDJANA *et al*, 2009).

Les résultats de notre étude montrent que les extraits organiques se sont avérés plus efficaces contre les bactéries Gram positifs que les bactéries Gram négatifs, ces dernières possèdent une forte résistance. Cette résistance est probablement liée avec la nature de leurs membranes externes (imperméable à la plupart des agents biocides) (FAUCHER et AVRIL, 2002). Cette dernière est composée de lipopolysaccharides (LPS) qui forme une barrière imperméable aux composés hydrophobes (MANN *et al*, 2000) et limite la diffusion de ces composés (LAMBERT *et al*, 2001 ; TIAN *et al*, 2009). En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre ces bactéries deviennent actives. En plus, la configuration spatiale des molécules qui empêchent les antibactériens de traverser les protéines de transport (porine) de la membrane externe, et ne pouvant pas donc atteindre le peptidoglycane de la paroi bactérienne (BOUSSEBOUA, 2001 ; PAGES *et al*, 2003).

L'exemple de *P. aeruginosa* ATCC 27853, qui c'est révélée résistante pour tous les extraits de feuilles et brindilles de l'olivier sauvage. Celle-ci est connue pour ces résistances à certains antibiotiques ainsi qu'à une grande variété d'agents chimiques, d'où son implication fréquente dans les infections hospitalières (MANN *et al*, 2000). L'un de ces mécanismes de résistance est lié à sa capacité de changer de phénotype par mutation (MARTIN *et al*, 1993). Ou bien à développer chez ce pathogène un autre moyen de résistance propre et naturel contre les composants antimicrobiens (STOVER *et al*, 2000).

Plusieurs auteurs ont rapporté la faible sensibilité des souches de *P. aeruginosa* vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (THUILLE *et al*, 2003 ; BOUHDID *et al*, 2006). Pour cela nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des CP mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires.

En outre, les activités antimicrobiennes de ces extraits sont difficiles à corrélér à un composé spécifique en raison de leur complexité et leur variabilité. Néanmoins, certains chercheurs ont signalé qu'il existe une relation étroite entre la composition chimique en élément les plus abondants et l'activité antimicrobienne (DJENANE *et al*, 2012).

Les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques, cela est dû principalement aux peptidoglycanes constituant la paroi.

En effet, les bactéries perdent leur rigidité et se lysent sous leur pression osmotique interne qui rompt leur membrane cytoplasmique (ATHAMENA *et al*, 2010).

II.4.1.2. La sensibilité bactérienne aux extraits de feuilles de laurier noble

Les diamètres d'inhibition exprimés par les extraits de feuilles de laurier sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau XIII. Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne $\pm$ SD) exprimés par les extraits de feuilles de laurier noble et leurs sensibilité.

Bactéries testées	Valeurs des diamètres d'inhibition (mm)			
	EEFL	EAEFL	LL	IL
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	12,5 $\pm$ 0,7	9 $\pm$ 0	/	13 $\pm$ 0
	+	+	-	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	13,5 $\pm$ 0,70	/	/	/
	+	-	-	-
<i>E.coli</i> ATCC 25322	11,5 $\pm$ 0,7	10,5 $\pm$ 0,7	/	/
	+	+	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	21,5 $\pm$ 0,70	12,5 $\pm$ 0,7	10,5 $\pm$ 0,7	9 $\pm$ 0
	+++	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	/	9 $\pm$ 0	/	/
	-	+	-	-
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	11,5 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,7-	10 $\pm$ 0	9 $\pm$ 0
	+	+	+	+
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	24,5 $\pm$ 0,7	12 $\pm$ 0	13,5 $\pm$ 0,7	/
	+++	+	+	-
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	10 $\pm$ 0	7,5 $\pm$ 0,7	/	/
	+	-	-	-
<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	11 $\pm$ 0	9 $\pm$ 0	/	/
	+	+	-	-
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	9,5 $\pm$ 0,7	/	8,5 $\pm$ 0,7	/
	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 0409	/	/	8,5 $\pm$ 0,7	/
	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	/	9,5 $\pm$ 0,7	/	/
	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700600	8 $\pm$ 0	9,5 $\pm$ 0,7	/	/
	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC4352	10 $\pm$ 0	11 $\pm$ 0	8 $\pm$ 0	/
	+	+	-	-

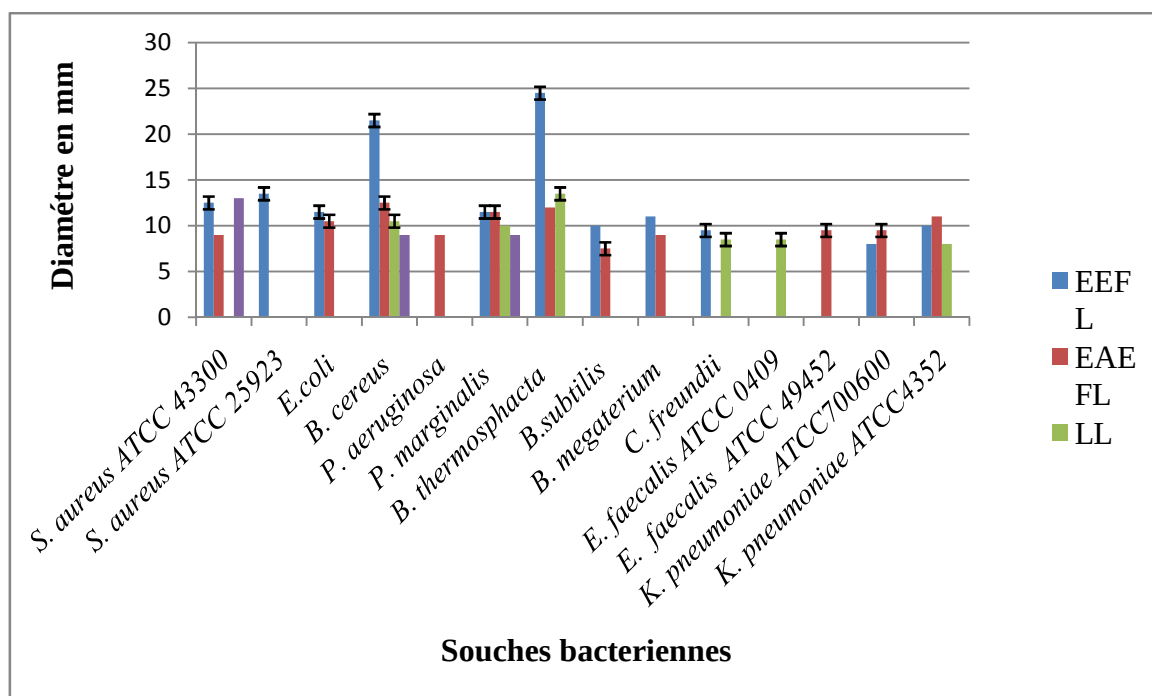


Figure 23. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibitions en (mm) exprimées par les extraits bruts de feuilles de laurier.

Les extraits organiques testés de *Laurus nobilis* ont présentés un large spectre d'action; agissant aussi bien sur les bactéries à Gram + que sur les bactéries à Gram -. Néanmoins, les diamètres des zones d'inhibition ne dépassent pas 24,5 mm. Notons que le pouvoir antibactérien de l'EEFL s'est révélé plus important que l'EAEFL.

Les souches *E. faecalis* ATCC 0409, et *P. aeruginosa* ATCC 27853 se sont en revanche d'une grande résistance vis-à-vis des extraits de laurier. Contrairement à *B. thermosphacta* CIP 103251, *B. cereus* ATCC 10876.

P. aeruginosa est connue pour sa résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associée à la nature de sa membrane externe. Cette barrière a une capacité de synthétiser et sécréter des agrégats structurés appelés biofilms ou matrices composées de polysaccharides. Ces biofilms forment une barrière physique contre l'entrée d'agents antimicrobiens et elle sécrète aussi des complexes enzymatiques extracellulaires qui peuvent même dégrader des huiles essentielles (MAOZ et NEEMAN, 2000)

Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions trouvés par OUIBRAHIM (2015) pour l'huile essentielles de *Laurus nobilis*, sont plus élevés (*E coli* ATCC 25922 (15,9mm), *P aeruginosa* ATCC 27853 (11,4 mm) et *S aureus* ATCC 25923 (15mm)) à ceux retrouvés dans notre étude pour les extraits organiques. Cette importante bioactivité des huiles essentielles comparé au extraits organiques est en relation avec leur composition chimiques, et l'interaction entre ces divers structures aromatiques (DORMAN et DEANS, 2000 ; MARINO et al, 2001 ; DELAQUIS et al, 2002). D'après OUSSOU et al (2004), ces molécules agiraient le plus souvent par une action synergique au sein de l'huile essentielle. En outre, l'activité

d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants qui deviennent inactifs individuellement (SARKER *et al*, 2005).

II.4.1.3. La sensibilité bactérienne aux extraits de margines

Les diamètres d'inhibitions provoqués par les extraits de margines sont consignés dans les tableaux suivants :

Tableau XV. Diamètres des zones d'inhibitions et sensibilité des espèces aux extraits de margines. (moyenne $\pm$ SD).

Bactéries testées	Valeurs des diamètres d'inhibition (mm)						
	EMA1	EMA2	EMA3	EMAD	EMApH2	EMADpH2	EMDE
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	12 $\pm$ 0	15,5 $\pm$ 0,7	NT	NT	NT	NT	NT
	+	++					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	11,5 $\pm$ 0,70	16 $\pm$ 0	13 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0	15,5 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,7
	+	++	+	+	++	+	+
<i>E.coli</i> ATCC 25322	10,5 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 0,7	12 $\pm$ 0	11,5 $\pm$ 0,7	12 $\pm$ 0	11,5 $\pm$ 0,7
	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	14,5 $\pm$ 0,70	13,5 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,7	14 $\pm$ 0	16,5 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 0,7	10,5 $\pm$ 0,7
	+	+	+	+	++	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11 $\pm$ 0	11 $\pm$ 0	10,5 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,7	8,5 $\pm$ 0,7
	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	11,5 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 0,7	NT	NT	NT	NT	NT
	+	+					
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	19,5 $\pm$ 0,7	20,5 $\pm$ 0,7	NT	NT	NT	NT	NT
	++	+++					
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	13,5 $\pm$ 07	14,5 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 0,7	12 $\pm$ 0	13,5 $\pm$ 0,7	14,5 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,7
	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	11,5 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 0,7	12 $\pm$ 0	12,5 $\pm$ 0,7	13 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0	10,5 $\pm$ 0,7
	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	12,5 $\pm$ 0,70	12 $\pm$ 0	NT	NT	NT	NT	NT
	+	+					
<i>E. faecalis</i> ATCC 0409	10 $\pm$ 0	11,5 $\pm$ 0,7	NT	NT	NT	NT	NT
	+	+					
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	12,5 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 0,7	13 $\pm$ 0	13,5 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 0,7	14 $\pm$ 0	11,5 $\pm$ 0,7
	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700600	10,5 $\pm$ 0,7	12 $\pm$ 0	11,5 $\pm$ 0,7	12 $\pm$ 0	13 $\pm$ 0	13 $\pm$ 0	10,5 $\pm$ 0,7
	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> ATCC4352	12 $\pm$ 0	12 $\pm$ 0	NT	NT	NT	NT	NT
	+	+					

NT : non testé.

Selon les résultats décrits dans le tableau, tous les extraits de margines à l'acétate d'éthyle délipidés ou non (EMA1, EMA2, EMA3, EMAD, EMADpH₂, EMADpH₂) présentent un large spectre d'action vis-à-vis de toutes les souches bactériennes (Gram positif et Gram négatif) testées avec des diamètres qui varient de 10 à 20,5±0,7 mm. Ces résultats sont supérieurs à ceux exprimés par l'EMDE. Ce dernier ne présente pas une grande activité contre les souches testées, ce qui nous amène à dire que cette différence de sensibilité des souches vis-à-vis de ces extraits pourrait être due à la méthode et au solvant d'extraction.

Selon CANDAN et ses collaborateurs (2003), les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'insérer dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

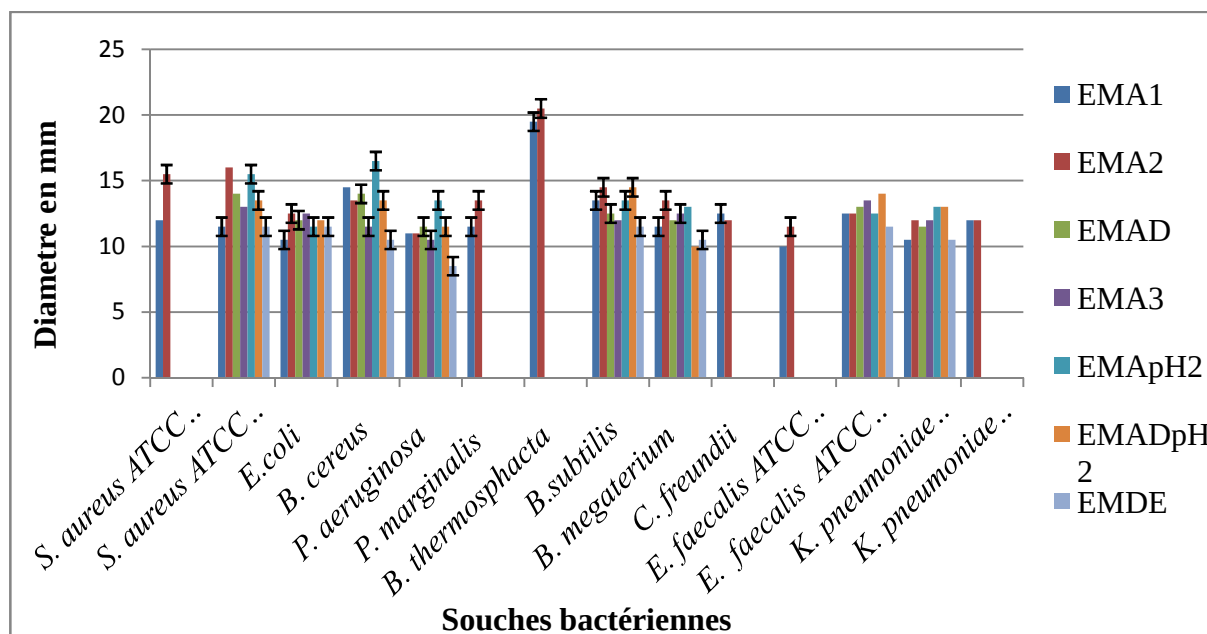


Figure 24. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition provoqués par les extraits de margine.

EMA1 : extrait de margines à l'acétate d'éthyle 1;

EMA2 : extrait de margines à l'acétate d'éthyle 2;

EMA3 : extrait de margines à l'acétate d'éthyle 3;

EMAD : extrait de margines à l'acétate d'éthyle délipidé ;

EMADpH₂ : extrait de margines à l'acétate d'éthyle à pH₂;

EMADpH₂ : extrait de margines à l'acétate d'éthyle délipidé à pH₂;

EMDE : extrait de margines au diéthyle éther.

Concernant les deux extraits après délipidation (EMAD, EMAD , pH₂), ils ont presque le même effet antibactérien.

Les substances phénoliques contenues dans les margines sont potentiellement toxiques et inhibent le développement des micro-organismes (VERCAUTEREN, 1998). Le degré de

toxicité des polyphénols dépend de leur nature et de leur degré de polymérisation (BECCARI *et al*, 1996).

Les effluents d'huilerie d'olive possèdent un effet antimicrobien (RAMOS-CORMENZANA *et al*, 1996), qui est lié essentiellement à l'action exercée par les phénols monomériques et les pigments bruns ou catécholmélanique (HAMDI et ELLOUZ, 1993). Ces composés phénoliques sont connues par leur capacités dénaturante des protéines agissent sur les bactéries en causant une fuite des constituants cytoplasmiques tels les protéines et minéraux, en se liant aux peptidoglycanes et causé ainsi la rupture de la paroi bactérienne (ARAB *et al*, 2013 ; DAHECH *et al*, 2013), ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassium, une perturbation de la force proton motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires (LAMBERT *et al*, 2001 ; BURT, 2004 ; BAKKALI *et al*, 2008).

II.4.1.4. La sensibilité bactérienne aux composés phénoliques standards

Les diamètres des zones d'inhibitions provoqués par les CP sont consignés dans les tableaux suivants :

Tableau XVI. Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne $\pm$ SD) exprimées par le composé phénolique AT et sensibilité des espèces vis-à-vis de ce CP.

Bactéries testées	Sensibilité et valeur des diamètres d'inhibition (mm)
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	17 $\pm$ 0
	++
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	8,5 $\pm$ 0,7
	-
<i>E.coli</i> ATCC 25322	10 $\pm$ 0
	+
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	11,5 $\pm$ 0,7
	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	12,5 $\pm$ 0,7
	+
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	22,5 $\pm$ 0,7
	+++
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	23 $\pm$ 0
	+++
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	8,5 $\pm$ 0,7
	-
<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	21 $\pm$ 0
	+++
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	8 $\pm$ 0
	-

<i>E. faecalis</i> ATCC 0409	11 ± 0
	+
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	12 ± 0
	+
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700600	9 ± 0
	+
<i>K. pneumoniae</i> ATCC4352	19 ± 0
	++

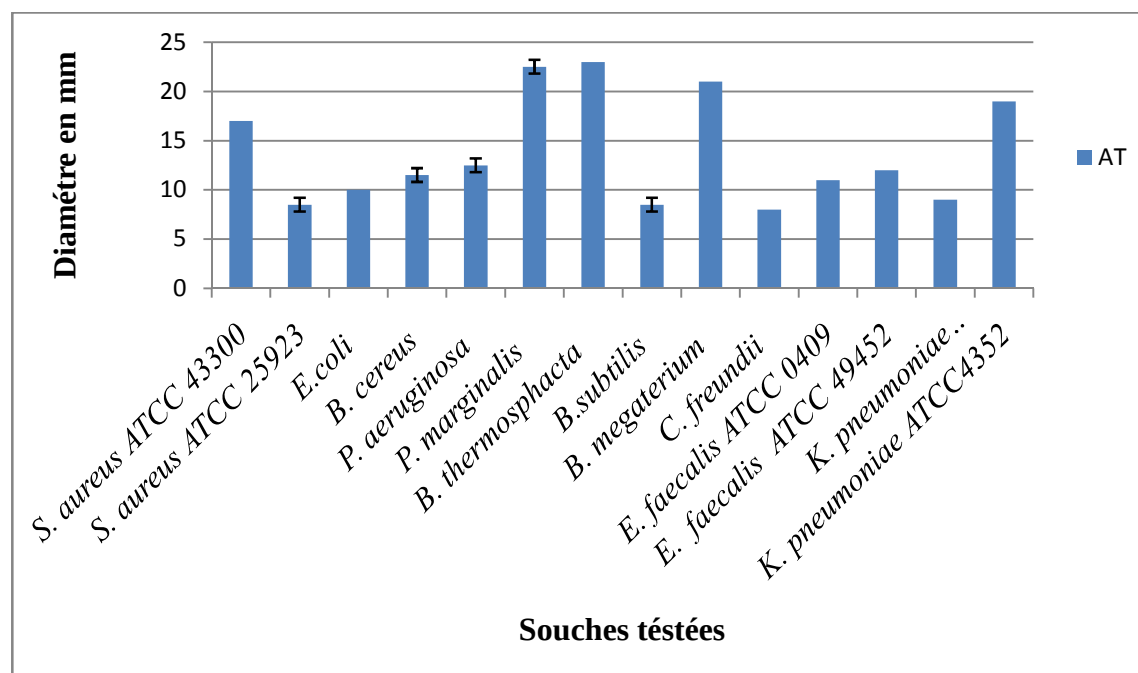


Figure 25. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition exprimés par l'acide tannique.

On remarque que l'AT exerce un large spectre d'activité car il agit sur toutes les bactéries Gram positif et négatif, mais généralement le degré de sensibilité diffère d'une souche à une autre.

Une forte activité antibactérienne est obtenue par l'AT avec des diamètres des zones d'inhibitions allant jusqu'à 23 mm, ce qui nous a permis de dire que ce CP est très actif vis-à-vis de toutes les souches bactériennes. Comparativement aux résultats obtenus par MADI (2009), l'AT possède un effet considérable et important sur *S. aureus* ATCC 43300 (15 mm), ce qui est en accord avec notre résultat sur la même souche (17±0) mm. Selon CUEVA *et al* (2010), les acides phénoliques ont une activité antibactérienne (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, et *B. megaterium*).

Les polyphénols, tel que les tanins et les flavonoïdes, ont une activité antibactérienne importante (MACHADO *et al.*, 2002). L'activité antimicrobienne des flavonoïdes est dû à leur

capacité de solubiliser les protéines et de former des complexes avec la paroi cellulaire pendant que les tanins peuvent être en rapport avec leur capacité de désactiver des adhésions microbiennes, enzymes et les protéines de la membrane cellulaire (RAVIKUMAR *et al*, 2005).

Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certaines sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyvirio fibrisolans*, *C. proteoclasterium* (CHATTERJEE *et al*, 2004 ; LEITAO, 2005), Ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *E. coli*, *S. aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*. L'inhibition bactérienne par les tannins est dépendante de la structure et du degré dépolymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (SIVAKUMARAN, 2004).

La sensibilité de la souche *S. aureus* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram positif aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (BALENTINE *et al*, 2006).

La membrane des bactéries à Gram positif peut être traversée facilement par les polyphénols qui peuvent atteindre leurs sites d'action. En effet, il a été démontré que les polyphénols détruisent la membrane plasmique, détériorent la force motrice des protons et le mouvement des électrons active le transport et la coagulation des contenus cellulaires (SHAN *et al*, 2007).

A partir de ces résultats, on peut déduire et confirmer le pouvoir antibactérien des polyphénols, dont l'acide phénolique AT.

- Concentration en CP déposé dans le disque

La concentration préparée pour AT dans du DMSO et déposé par chaque disque est (200µg/ 20µl).

Les CP sont produits en réponse à l'infection microbienne par les plantes. Par conséquent, l'efficacité de ces substances évaluées *in vitro* ont montré une action inhibitrice sur les microorganismes.

II.5. Résultats des paramètres d'inhibitions

II.5.1. Résultats de l'activité antibactérienne testée par la méthode de micro-dilution en milieu liquide (détermination des CMI)

Nous rapportons dans le (tableau VII) les CMI des extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide, dont les diamètres d'inhibition sont >10 mm (choix arbitraire), qui sont obtenues par la méthode de micro-dilution en milieu liquide.

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement au témoin de croissance, il y a une diminution du trouble provoqué par la croissance des germes au fur et à mesure que la concentration en extrait augmente. Nos résultats montrent que les extraits organiques EEBD, EMA, EEFLD et l'AT ont eu une activité antibactérienne en inhibant la croissance des germes bactériens selon une relation dose-réponse. Cela nous a donc permis de déterminer les différents paramètres antibactériens à savoir la CMI et la CMB.

Selon COWAN (1999), les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes possédants des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes.

- Les CMI retenues par les extraits de feuilles de laurier, brindilles de l'olivier sauvage et AT

Les CMI obtenues par les différents extraits sont reportées dans le tableau ci-dessous :

Tableau XVII. Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en µg/ml) retenues par les extraits EEBD, EEFLD et l'AT.

	EEB	EEFL	AT
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	12640,45	NT	78,125
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	1580,06	156,5	78,125
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	NT	78,25	625

NT : non testé.

ALIGIANNIS et ses collaborateurs, (2001) in FABRI *et al.*, 2009) ont proposés une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- Forte inhibition : CMI inférieure à 500µg/ml ;
- Inhibition modérée : CMI varie de 600 µg/ml à 1 500 µg/ml ;
- Faible inhibition : CMI supérieure à 1 600 µg/ml.

D'après le tableau XVIII, l'AT inhibe *P. marginalis* DSM 13124 et *B. thermosphacta* CIP 103251 à la même CMI (78,125 µg/ml). Tandis qu'il inhibe *S. aureus* ATCC43300 à une CMI de 625 µg/ml. Selon ces résultats, on constate une forte inhibition obtenues avec l'AT (CMI ≤ 500 µg/ml) vis-à-vis des souches bactériennes *P. marginalis* DSM 13124 et *B. thermosphacta* CIP 103251 et une inhibition modérée pour *S. aureus* ATCC43300.

Comparé ces résultats obtenus avec l'AT à ceux de OUTAYEB et TAOUBI (2014), ils sont remarquablement proches, avec 500 µg/ml pour *S. aureus* ATCC 43300, et 62.5 µg/ml pour *B. thermosphacta* CIP 103251 et *P. marginalis* DSM 13124.

De même, l'extrait organique EEFLD inhibe *B. thermosphacta* CIP 103251, et *S. aureus* ATCC 43300 à des CMI (156,5; 78,25 µg/ml respectivement). Ces CMI indiquent une forte inhibition de cet extraits pour les souches testées. Cependant, l'EEBD inhibe *B.*

thermosphacta CIP 103251 à une CMI égale à 1580,06 µg/ml, et *P. marginalis* DSM 13124 à 12640,45 µg/ml. Donc l'EEBD exerce une faible inhibition. C'est pourquoi, il possède la plus faible inhibition par rapport aux autres extraits.

Nous avons comparé nos résultats avec ceux de THUILLE et ses collaborateurs, (2003), qui ont déterminé les CMI d'extraits méthanoliques de *Thymus vulgaris* sur sept souches microbiennes, notamment : *S. aureus* 25923 (2 500 µg/ml), *E. coli* ATCC 25922 (> 5 000 µg/ml). Ils ont enregistré une faible activité par rapport à nos extraits.

Dans les travaux de HOSSAIN et al (2010), l'huile essentielle du basilic a affichée des CMI allant de 62 à 500 µl/ml, à l'encontre de *Salmonella typhi*, *E. coli*, *S. aureus* et *B. subtilis*. Ces résultats sont similaires à ceux de l'AT et l'EEFLD, et sont nettement inférieur à ceux de l'EEBD.

II.5.2. Détermination des CMB et la nature de l'activité antibactérienne

La CMB est déterminée après l'ensemencement des bactéries prélevées à partir des puits où la concentration est $\geq$ à la CMI. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Les CMI et les CMB déterminées sont caractéristiques d'un extrait pour une souche donnée. Ainsi donc, l'action d'un extrait sera considérée comme bactéricide si le rapport CMB/CMI est égal à 1. L'action est dite bactériostatique si le rapport CMB/CMI est supérieur à 1 (KAROU *et al.*, 2005).

Tableau XVIII. Les CMB et la nature de l'activité obtenue par les différents extraits.

Extraits	Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
EEB	<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	1/64	ND	ND	ND
	<i>P. marginalis</i> DSM 13124	1/8	1/8	1	Bactéricide
EEFL	<i>S. aureus</i> ATCC43300	1/64	ND	ND	ND
	<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	1/32	ND	ND	ND
AT	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	1/8	ND	ND	ND
	<i>P. marginalis</i> DSM 13124	1/64	ND	ND	ND
	<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	1/64	ND	ND	ND
EMA	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	1/8	ND	ND	ND
	<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	1/4	ND	ND	ND
	<i>P. marginalis</i> DSM 13124	1/8	1/4	1/2	Bactériostatique
	<i>C. freundii</i> ATCC 8090	1/32	ND	ND	ND
	<i>E. faecalis</i> ATCC 0409	1/8	ND	ND	ND
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1/2	ND	ND	ND

ND : non déterminé.

D'après le tableau ci-dessus, l'EEB exerce un effet bactéricide contre *P. marginalis* DSM 13124. Par contre, EMA provoque un effet bactériostatique contre *E. P. marginalis* DSM 13124.

Les résultats de OUTAYEB et TAOUBI (2014), ont montré un effet bactéricide de l'extrait de margines à l'acétate d'éthyle contre *P. marginalis* DSM 13124. Alors que notre extrait à exprimer un effet bactériostatique contre cette souche.

KIM et ses collaborateurs, (1995) ont déjà indiqué qu'en raison de la variation dans la diffusion et des propriétés de solubilité des différents composés dans les différents milieux, les résultats obtenus par la méthode des disques ne peuvent pas être directement comparables à ceux obtenus par la méthode de micro-dilution.

La plupart des méthodes utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs. Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus concernant l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations. Les notions de CMI, CMB, CMFS et CMFC ne sont pas définies de façon précise et universelle, les auteurs ont exprimé les résultats avec différentes unités. Ces concentrations peuvent être exprimées en µg/ml (OUSSOU *et al*, 2008) en µl/ml (De BILLERBECK *et al*, 2002) ou en % (v/v) (BOURKHIS *et al*, 2007) ce qui rend la comparaison des résultats entre eux difficile.

II.6. Activité antibiofilm

II.6.1. Test d'adhérences des souches sur microplaque

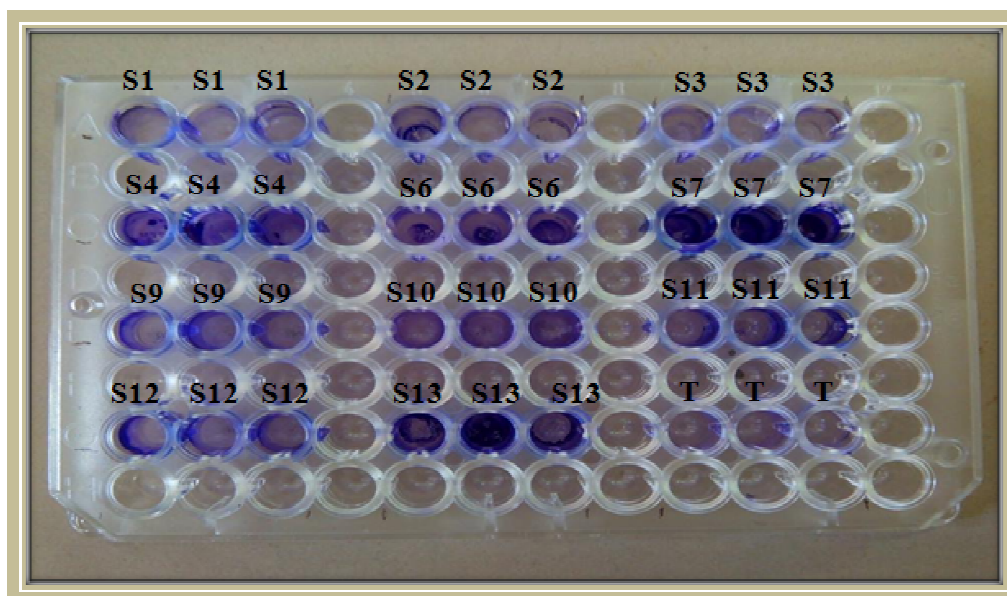


Figure 26. Test d'adhérence de souches bactériennes sur microplaque 96 puits.

-Répartition des souches dans la microplaque

S1: *C. freundii* / S2: *B. cereus* / S3 : *E. feacalis* (ATCC0409) / S4 : *P. aeruginosa* / S5 : *P. marginalis* / S6 : *E. feacalis* (ATCC 49452) / S7 : *K. pneumoniae* (ATCC 700600) / S8 : *B. thermosphacta* / S9 : *B. megaterium* / S10 : *K. pneumoniae* (ATCC) / S11 : *S. aureus* (ATCC25923) / S12 : *E. coli* / S13 : *B. substilis* / T : témoin négatif.

Après révélation au cristal violet les résultats de la microplaque à 96 puits montrent que les souches *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Enterococcus faecalis* 49452, *Klebsiella pneumoniae* 700600, *Bacillus megaterium*, *Klebsiella pneumoniae* 4352, *S. aureus* 25923, *E. coli* 25922, *B. subtilis* sont formatrices de biofilm bactériens.

II.6.2. Test de l'activité antibiofilm des extraits

II.6.2.1. Test de l'activité antibiofilm de l'AT contre les souches formatrices

Un choix arbitraire des souches a été fait pour les tests de sensibilité.

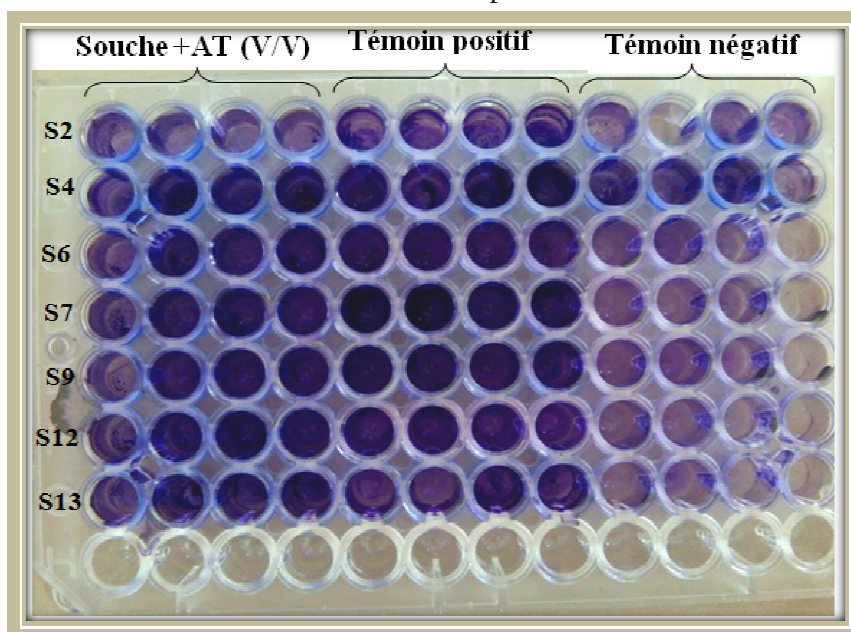


Figure 27. Effet antibiofilm de l'AT sur quelques souches formatrices, en microplaque à 96 puits.

II.6.2.2. Test de l'activité antibiofilm de l'EMA contre les souches formatrices

Les mêmes souches sont testées avec l'extrait de margines à l'acétate d'éthyle les résultats obtenus sont montrés par la figure suivante, une même répartition est entreprise :

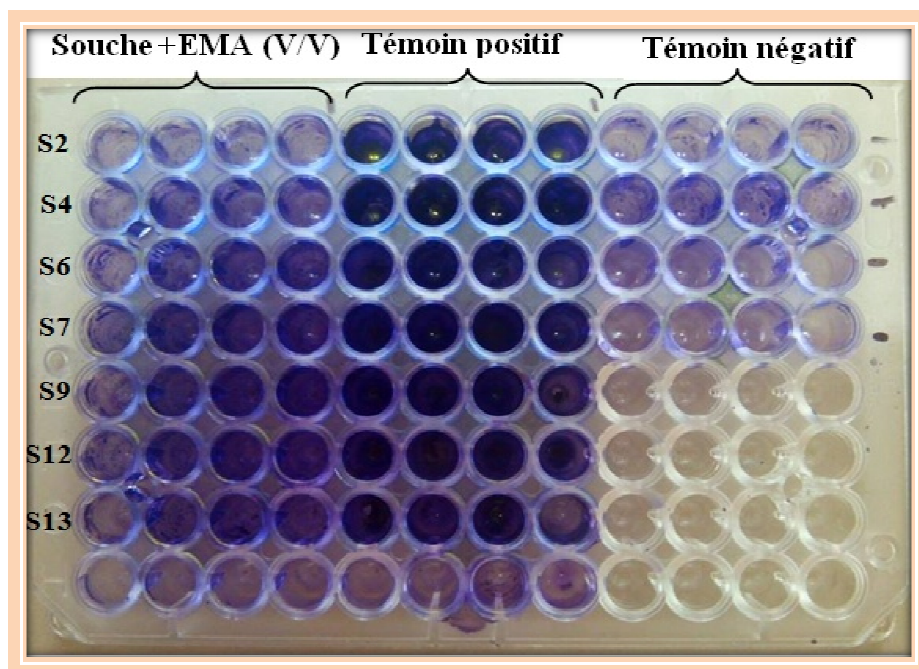


Figure 28. Effet antibiofilm de l'EMA sur quelques souches formatrices, en microplaque à 96 puits

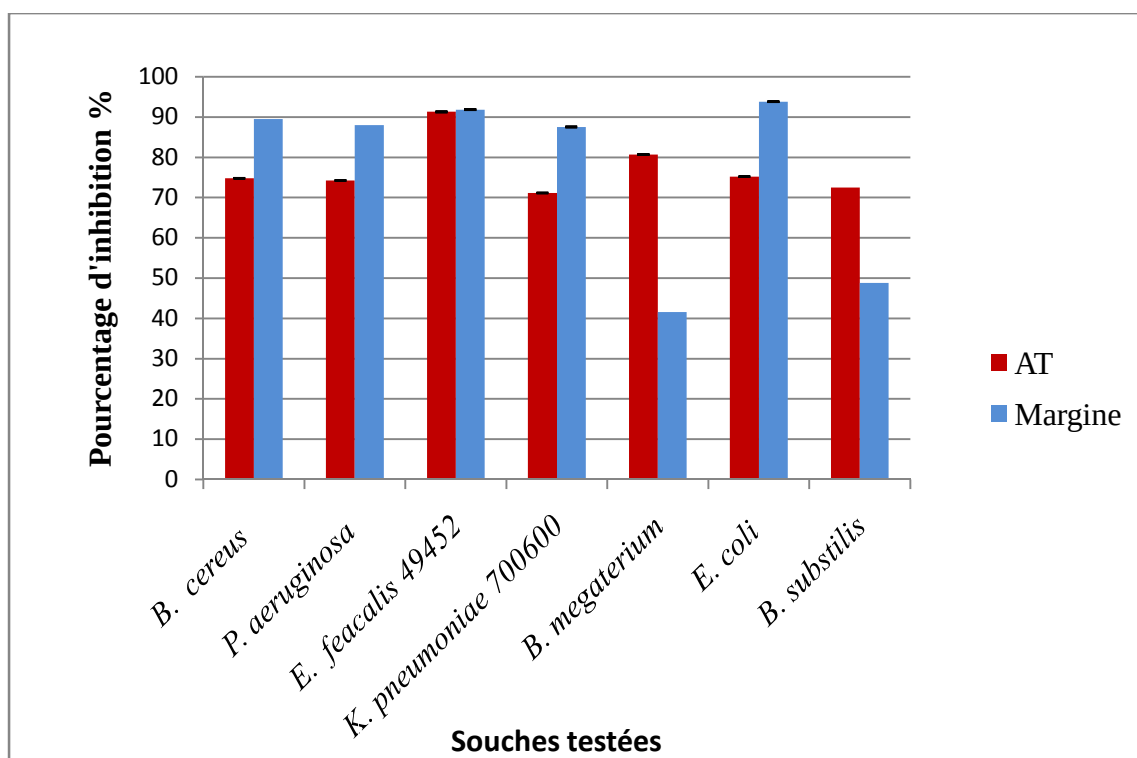


Figure 29. Effet d'extraits (EMA, AT) sur la formation de biofilm exprimé en pourcentage d'inhibition.

Les deux extraits ont montré une bonne activité antibiofilm contre les souches testées (figure 31). Des pourcentages de plus de 70% d'inhibition ont été enregistrés pour l'AT et de plus de 40% pour l'EMA. Néanmoins, aucun extrait n'a pu inhiber complètement la formation de biofilm.

Avec l'extrait EMA, *E. faecalis* c'est avérée la plus sensible avec un taux d'inhibition de 93,8%, suivi de *E. coli* (91,8%), tandis que *B. subtilis* et *B. megaterium* se sont montrés les plus résistantes avec 48.8% et 41.6% respectivement. L'extrait commercial AT a donné des résultats appréciables dans l'inhibition des biofilms bactériens avec des taux qui varient de 71,2% à 91,3%. Ces résultats montrent qu'en plus de leurs effets antibactériens ces extraits sont dotés d'une activité antibiofilm remarquable.

Les résultats obtenus dans ce test ouvrent une voie prometteuse dans l'inhibition des biofilms par les extraits polyphénoliques et pour la réduction de la colonisation microbienne sur les surfaces qui peut conduire par la suite à des infections chez les êtres vivants. La facilité avec laquelle l'extrait EMA et l'AT arrivent à inhiber la fixation des cellules confirme les études précédents où il a été constaté que l'inhibition de la fixation des cellules sur un substrat est plus facile à réaliser que l'inhibition de la croissance d'un biofilm déjà établie (CERCA *et al*, 2005).

Le succès dans l'inhibition de la fixation des cellules sur la microplaque peut être expliqué par différentes manières. Tout d'abord, la fixation des cellules est l'étape initiale dans la formation de biofilm suivant au conditionnement de surface qui crée un environnement favorable à la fixation des bactéries (KUMAR et ANAND, 1998). Pendant ce stade, la plupart des cellules sont encore dans la phase fluide et donc possèdent toujours les mêmes propriétés que les bactéries planctoniques qui les rendent sensibles aux agents antimicrobiens. En outre, le conditionnement de surface est réalisé par l'adsorption de substances qui comprennent des éléments nutritifs, des molécules organiques et inorganiques, qui sont importantes pour la croissance des cellules, ce qui à son tour favorise l'adhésion cellulaire. On peut donc mettre l'hypothèse que le prétraitement d'une surface avec des extraits de plantes produit un film défavorable qui repousse les cellules et réduit l'adhérence aux surfaces. Certains chercheurs ont également démontré le succès de revêtement de dispositifs médicaux avec des biocides tels que l'argent pour réduire l'adhérence microbienne (KLUEH *et al*, 2000 ; HASHIMOTO, 2001).

Il serait ainsi très intéressant d'étudier le type de composés phénolique responsables de l'activité de antibiofilm des margines.

La littérature n'a pas apportée beaucoup d'information sur l'utilisation d'extrait ou d'huiles essentielles pour l'inhibition de la formation de biofilms. Parmi il y a une étude qui rapporte que l'effet de l'huile essentielle de *T. capitata* sur la réduction du métabolisme du biofilm déjà formé de *C. albicans* à 62,71 % et sur la réduction de sa biomasse à 71,96 % à une concentration de 0,64 µl/ml (PALMEIRADE- OLIVEIRA *et al*, 2012).

Une autre équipe a étudié l'effet de différents extraits aux solvants sur la formation du biofilm de *S. aureus* résistant a la methicilline (QUAVE *et al*, 2008), ou les extraits a l'éthanol des feuilles et des tiges de *D. carota* L. subsp. *carota*, de *F. vulgare* subsp. *piperitum* et de *F. vulgare* subsp. *vulgare* ne présentaient aucune inhibition de la formation du biofilm dans la gamme de concentrations étudiée (4–128 µg/ml). L'extrait à l'éthanol des feuilles, des tiges, des fleurs et des racines de *M. pulegium* n'avait aussi aucun effet inhibiteur.

Alors que celui des feuilles, des tiges et des fleurs de *R. officinalis* subsp. *officinalis* avait une CMI₅₀ de croissance de 512 µg/ml (dans la gamme de 8–512 µg/ml) et une CI₅₀ de formation de biofilm de 16 µg/ml.

D'autres auteurs ont étudié l'effet des huiles essentielles sur des biofilms déjà formés. NOSTRO *et al* (2007) ont rapporté l'effet de l'huile essentielle d'*O. vulgare* subsp. *vulgare* et ses composants majoritaires, le carvacrol et le thymol, sur l'éradication des biofilms de *S. aureus* et *S. epidermidis* avec une CIB (concentration inhibitrice de biofilm) de 0,031–0,500 % (v/v) qui était plus élevée que la CMI de la croissance planctonique (0,015–0,125 % (v/v)), tandis que la CEB (concentration d'éradication de biofilm) était plus élevée que la CIB (0,125–1 % (v/v)).

Les dernières décennies sont marquées par l'intérêt particulier porté à la mise en valeur des plantes à intérêt médicinale comme source de substances bioactives naturelles. De ce fait, de nombreuses études s'intéressent, de plus en plus, aux effets biologiques d'origine naturelle. Dans ce contexte, nous avons élaborés notre étude.

L'extraction des feuilles et brindilles de l'olivier, margineset feuilles de laurier a donné de bons rendements. Les résultats montrent que les extraits polaires éthanoliques ont présenté une rentabilité importante en rendement par apport au extraits à polarité décroissante à l'acétate d'éthyle. Le rendement le plus élevé a été l'EEFO (38%), tandis que l'extrait EAEB a montré le rendement le plus faible avec 8,80%.

La quantification des CP de nos extraits, a permis de mettre en relief la richesse de ces derniers en structures phénoliques, avec la prédominance de ces derniers dans l'EEB (91.30 ± 1.48) mgEAG/g de poudre végétale, en raison de leur solubilité plus élevée dans l'éthanol. Ces résultats montrent que le type de solvant et sa polarité ont une influence sur la teneur en PPT.

Le test antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, a permis de conclure que les extraits de feuilles de l'olivier et les margines représentent une source prometteuse d'agents antioxydants et une forte activité anti radicalaire liée au contenu polyphénolique.

Indépendamment du type d'extrait et de la concentration déposée dans le disque, les bactéries Gram positifs révèlent une sensibilité apparente que les Gram négatifs pour les extraits de brindillesd'olivier et feuilles de laurier. Alors que, les extraits de margines et l'AT ont une efficacité très marquée vis-à-vis des Gram positif et des Gram négatif et également un effet antibiofilm appréciable. Tandis que les extraits issus de feuilles d'oléastre n'ont pas montré une bonne efficacité, ce pouvoir est appréciable et mérite d'être mieux développé et étudié.

Notre travail n'est qu'un premier pas dans la valorisation des sous produits de l'olivier et du laurier. D'autres essais et études complémentaires et approfondis seront nécessaires et souhaitables ils peuvent se résumer dans les points suivants :

- L'isolement et l'identification de la ou les molécule (s) bioactive (s) responsables de l'activité antioxydants, antibactérienne et antibiofilm de chaque extrait par les techniques appropriées ;
- L'orientation des recherches afin d'approfondir les aspects entrevue dans ce travail, par l'exploration d'autres facettes des propriétés biologiques (antidiabétiques, anticancéreuses ... et autres) de ces plantes;
- L'évaluation de l'activité antioxydante, antibactérienne et antibiofilm, *in vivo* est souhaitables pour déterminer les tissus et organes cibles et rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire.

ABU KHAYER M.D., MUKTADIRUL B.C., CHRISTOS S.A., DIMITRIOS V.V., STAVROS P. (2013). Olive mill wastewater composting: A review. *Inter. Biodeter. biodegr.* **85**, 108-119.

AGUILERA M., QUESADA M.T., GUIRRA DEL AGUILA V., MORILLO J.A., RIVADENEYRA M.A., RAMOS-CORMONZANA A. et MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2008). Characterization of *Paenibacillus jamilae* that produce exopolysaccharide during growth and detoxification of olive mill wastewaters. *Biores. technol.* **99**, 5640-5644.

AISSAM H. 2003. Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. *Universite sidi mohamed ben abdellah. Fes.* **156p.**

AIT AMEUR S. & BOUZIDI F. (2013). Etude de quelques paramètres physicochimiques et microbiologique des margines issues de deux système d'extraction d'huile d'olive : système de presse(traditionnel) et système de centrifugation à tris phases(moderne). Mémoire d'ingénieure .Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Algérie.

AIT BADDI G., CEGARRA J., MERLINA G., REVEL J.C., HAFIDI M. (2008). Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an Olive-mill waste–wheat straw mixture. *Journal of Hazardous Materials. Article in press.*

AKOWAUH G.A., ZHARI I., NORGYATI I., SADIKUN A., KHAMSAH S.M. (2004). The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, **87**, 559-566.

AKROUR N., HARRANI F. (2011). Contribution à l'amélioration de l'activité antibactérienne d'extrait de feuilles d'olivier par addition de la Nisine, et leur application à la conservation de la viande hachée bovine. Mémoire d'ingéniorat en sciences agronomiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Algérie.

AL-AZZAWIE H.F., ALHAMDANI M.S. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of Oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Science*, **78**, 1371-1377.

ALBANO S.M. and MIGUEL M.G. (2010). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 1-6.

ALIGIANNIS N., KALPOTZAKIS E., MITAKU S., CHINOU I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum species*. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 4168-4170.

ALLOUCHE N., FKI I. et SAYADI S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewater. *J. Agricul. Food. Chem*, **52**, 267-273.

ALMEIDA-DORIA R.F., REGITANO-DARCE AB. (2000). Antioxydant level of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Ciencia tecnologia alimentos* 20(2), campinas May/August, <http://www.scielo.br>

ALMI D. (2010). Etude du pouvoir antioxydant des composés et extraits phénoliques issus des olives et sous-produits de l'olivier (feuilles et margines) variété *chemlal* sur l'oxydation thermique simulant la friture de deux huiles à large consommation: huile d'olive et huile de tournesol. Mémoire de magister en sciences biologiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

ALLOUCHE N., FKI I. et SAYADI S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewater. *J. Agricul. Food. Chem*, **52**, 267-273.

ALONSO-SALCES R.M., HEBERGER K., HOLLAND M.V., MORENO-ROJAS J.M., MARIANI C., BELLAN G., RENIERO F., GUILLOU C. (2010). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, **118**, 956–965.

ALTIOK E. (2010). Recovery of phytochemicals (having antimicrobial and Antioxidant characteristics) from local plants. These in Chemical Engineering. *Izmir Institute of Technology*.

ALTIOK EVREN., DENIZ BAYC,IN1., OGUZ BAYRAKTAR., SEMRA ÜLKÜ. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, **62**, 342–348.

AMARAL CARLA., MARCO S., LUCAS., JOAˆO COUTINHO., ANTONIO L., CRESPI´., MARIA DO ROSA´RIO ANJOS A., CE´LIA PAIS B. (2008). Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal. *Bioresource Technology*, **99**, 7215–7223.

AMOURETTI M.C. et BRUN J.P. (1993). Olivier et huile dans l'antiquité : découverte archéologique récente. *Colloque Aix- Toulon, Sup. 26, BCH, Athène Paris*.

ANDRIKOPOULO N.K., KALIORA A.C., ASSIMOPOULOU A.N., PAPAGEORGIOU V.P. (2002). Inhibitory activity of minor polyphenolic and non polyphenolic constituents of olive oil against *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Medicinal Food*, **5**, 1-7.

ANDERSON GG, O'TOOLE GA (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 85-105]

ARROYO GARICIAL, MARTINEZ-ZAPATER J, PRIETO F, ARBESU R - AFLP evaluation of genetic similarity among laurel populations (*Laurus nobilis* L.) - Euphytica. Vol. 122.pp.155-164,Spain .2001.

ATTOU A. (2011).Contribution à l'étude photochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) dev la région d'Ain T'émouchent. Thèse de magister de l'Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie.

Arab K., Bouchenak O. & Yahiaoui K. 2013.Evaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé .Université M'Hamed Bougara, Boumerdes, Algérie. ISSN 1813-548X.

ARRAEZ-ROMÁN D., CORTACERO-RAMIREZ S., SEGURA-CARRETERO A., MARTIN-LAGOS CONTRERAS J.A. & FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2006). Characterization of the methanolic extract of hops using capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **27**, 2197-2207.

ARRAEZ-ROMÁN D., ZUREK G., BÄßMANN C., ALMARAZ-ABARCA N., QUIRANTES R., SEGURA-CARRETERO A. and FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. (2007). Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **389**, 1909-1917.

ATHAMENA S., CHALGHEM I., KASSAH-LAOUAR A., LAROUI S., KHEBRI S. (2010). Activité antioxydants et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* L. Mémoire de Magister en biologie. Université de Batna. Algérie.

AZIZ N.H., FARAG S.E., MOUSA L.A. and ABO-ZAID M.A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds Microbios, **93**, 43-54.

BABAR A. M., HAHN E.J., PAEK K.Y. (2007). Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*, **12**, 607-621.

BAHORUN T. (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source D'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiass*, p83-94.

BAIDEZ A.G., GOMEZ P., DEL RIO J.A. and ORTUNO A. (2007). Antifungal capacityof major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon des tructans* (Zinssm.) Scholten. *Physiol Mol Plant*, **69**(4-6), 224-229.

BAKKALI, F., AVERBEK, K. AND IDAOMA, M. 2008 .Biological effects of essential oils, *Food and Chemical Toxicology*.46; 446-475.

BALASUNDRAM N., SUNDRAM K. & SAMMAN S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**, 191–203.

BALLABIO R, GOETZ P - Huile de graine/fruit de laurier *Laurus nobilis* L., *Laurus azorica* (seub.) Franco, *Laurus novocanaensis* Rivas Mart., Lous ã, Fern . prieto, E. Dias, j.c. Costa et C.A guiar- Phytothérapie. Vol.8.pp.141-144, France. **2010**.

BALENTINE C.W., CRANDALL P.G., O'BRYAN C.A., DUONG D.Q., POHLMAN F.W. (2006). The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and Meat Science color during storage of ground beef, **73**, 413-421

BALLELL L., FIELD R.A., DUNCAN K., YOUNG R.J. (2005). New small molecule synthetic antimycobacterials. *Antimicrob. Agents Chemother*, **49**, 2153-2163.

BARLA A., TOPÇU G., ÖKSÜZ S., TÜMEN G., KINGSTON D.G.I., (2007) Identification of cytotoxic sesquiterpènes from *Laurus nobilis* L., *Food chemistry* **104** : 1487-1484.

BATTINELLI L., DANIELE C., CRISTIANI M., BISIGNANO G., SAIJA A. and MAZZANTI G. (2006). In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine*, **13**, 558-563

BCHERRAWI N. (2002). Extraction des polyphénols des margines. Mémoire de fin D'études d'Ingénieur Agronome. *Université Libanaise*. 111 pages.

BECCARI M., BONEMAZZI F., MAJONE M., RICCARDI C. (1996). Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive-oil mill effluent. *Water Research*, **30** (1), 183-9.

BEISA S, DUNFORD N - Supercritical fluid extraction of Daphne (*Laurus nobilis* L.) seed oil -JAOCS. Vol.83(11),Turkey. **2006**.

BELKHIRI F. (2009). Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du *Tymus communis* L. et *Carthamus caerleus* L. Mémoire de Magister, Université de SETIF. P 26-27
47

BELOUED A. (2005) PLANTES médicinales d'Algérie. *Office des publications universitaires*. Alger. Pp : 124.

BELAID C., KALLEL M. et ELLEUCH B. (2002). Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive (margines). *Déchets sciences & technique*, **27**, 30-34.

BELOUED A - Plantes médicinales d'Algérie - 5ème édition. pp. 124-125 ,Ben aknoun (Alger). **2005**

BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., LORENTE J., ORTUNO A. et DEL RIO J.A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chem*, **68**, pp 457-462.

BENBROOK C.M., (2005). Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Rapport sur l'état des connaissances scientifiques. *The Organic Center for Education and Promotion*, **45**.

BENDINI A., BONOLI M., CERRETANI L., BIGUZZI B., LERCKER G. & TOSCHI T.G. (2003). Liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A*, **985**, 425-433.

BENHAOUN G. et YVETTE L. (2007). L'Olivier en Méditerranée : Du Symbole à l'Economie. *Ed. l'Harmattan, Paris*.

BENARD C. (2009). Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de doctorat, Univ. France, p 265.

BLIKA K.P.S., STAMATILATOU K., KORNAROS M. et LYBERATOS G. (2009). Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Glob. NEST. J*, **11**(3), 364-372.

BENDINI ALESSANDRA., CERRETANI LORENZO., CARRASCO-PANCORBO ALEGRIA., GÓMEZ- CARAVACA ANA MARIA., SEGURA-CARRETERO ANTONIO., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ ALBERTO & LERCKER GIOVANNI. (2007). Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. *An Overview of the Last Decade. Molecules*, **12**, 1679-1719.

BILLING J., SHERMAN P.W. (1998). Antimicrobial function of spices. *Quarterly Review of Biology*, **73**, 3-49.

BISIGNANO G., TOMAINO A., LO CASCIO R., CRISAFI G., UCCELLA N., SAIJA A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm Pharmacol*, **51**, 971-4.

BITONTI M.B., CHIAPPETTA A., INNOCENT A.M., MUZZALUPOI. & UCCELLA N. (2000). Biophenol functionality and distribution in *Olea Europa L.* Drupes. *Olivo & Olio*, **3**(1/2), 20-29.

BITTER C.M., VIALE T.M., BASSAM DAMAJ B., CREA R. (2005). Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti inflammatory activity. *J. Nutr*, **135**, 1475-4762.

BONOLI M., MONTANUCCI M., TOSCHI T.G. & LERCKER G. (2003). Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *J. Chromatogr. A*, **1011**, 163-172.

BOROS B., JAKABOVA S., DORNYEI A., HORVATH G., PLUHAR Z., KILAR F., FELINGER A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 7972–7980.

BOSSOKPI I.P.L. (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloides* LAM (*Rutaceae*). These de pharmacie, Bamako, 133 p.

BOUDHRIOUA NOURHÈNE., BAHLOUL NEILA., BEN SLIMEN IMEN., KECHAOU NABIL. (2009). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products. Article in Press*.

BOUHDID S., IDAOMAR M., ZHIRI A., BOUHDID D., SKALI N.S., ABRINI J. (2006). *Thymus essential oils*: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès International de biochimies, Agadir*, 324- 327.

BOURKHIS B, OUHSSINE M, HNACH M, BOURKHISS M, SATRANI B, FARAH A. (2007). Composition chimique et bio activité de l’huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis Articulata*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **146**, 75-84.

BOUSSEBOUA H. (2001). Elément de microbiologie général. pp 160-167.

BOUTABET K. (2007). Etude pharmacochimique de l’extrait de propolis au cours d’un stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine. Thèse de Magistère de l’université de Jijel.

BOUZID W., YAHIA1 M., ABDEDDAIM M.C., ABERKANE. et A. AYACHI. (2011). Evaluation de l’activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *l’aubépine monoxylé*. *Leban. Scien. J*, **12**, 1-8.

BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E. & BERSET C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*, **28**, 25-30.

BRESCIA M.A., PUGLIESE T., HARDY E. and SACCO A. (2007). Compositional and structural investigations of ripening of table olives, Bella Della Daunia, by means of traditional and magnetic resonance imaging analyses. *Food Chem*, **105**, 400-404.

BRENES M., HIDALGO F., GARCIA A., RIOS J., GARCIA P., ZAMORA R. & GARRIDO A. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **77** (7), 710-716.

BROUSSE G., LOUSSERT R. L'olivier. (1978). Maisonneuse la rose, Paris.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3ème éd). Editions Tec & Doc Lavoisier, p 1120.

BRUNETON J., (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3ème Ed. Lavoisier. Paris, 199-388.

BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal Food Microbiology* **94** (2004) 223-253.

CANDAN F, UNLU M, TEPE B, DAFERERA D, POLISSIOU M, SÖKMEN A. & AKPULAT H.A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Mille folium* A fan. (*Asteraceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 215-220.

CAPONIO F. et CATALANO P. (2001). Hammer crushers versus disk crushers : The influence of working temperature on the quality and preservation of virgin olive oil. *Eur. Food. Res. Technol*, **213**, 219-224.

CARPENTIER B., O. CERF. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygien in the food industry-a review. *Journal of applied bacteriology*, **75**: 499-511.

CARRASCO-PANCORBO A., ARRAEZ-ROMAN D., SEGURA-CARRETERO A. & FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2006). Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*, **27**, 2182-2196.

CARRION Y., NTINOU M., BADAL E. (2010). *Olea europaea* L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early-Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews*, **29**, 952-968.

CASAS-SANCHEZ J., ALSINA M.A., HERRLEIN M.K. and MESTRES C. (2007). Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *Colloid Polym Sci*, **285**, 1351-1360.

CATURLA N., PEREZ-FONS L., ESTEPA A. & MICOL V. (2005). Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem. Phys. Lipids*, **137**, 2-17.

CERCA N., MARTINS S., PIER G.B., OILIVEIRA R and AZEREDO J. (2005) The relationship between inhibition of bacterial adhesion to a solid surface by sub-MICs of antibiotics and subsequent development of a biofilms. *Res Microbiol*, **156**, 650-655.

CHABOT S., BEL-RHLID R., CHÊNEVERT R., PICHÉ Y. (1992). Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific falconoid compounds under CO₂ enriched conditions. *New Phytol*, **122**, 461-467.

CHAIEB, K., KOUIDHI, B., JRAH, H., MAHDOUANI, K., et BAKHROUF, A. (2011). Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **11**: 29.

CHAN K.N. et MAZNAH I. (2009). Supercritical carbon dioxide fluid extraction of hibiscus *Canna binus* L. seed oil: A potential solvent-free and high antioxydative edible oil. *Food chemistry*, **6**, 1291-1296

CHATTERJEE A. (2004). Inhibition of *Helicobacter pylori*; in-vitro by various berry extracts with enhanced susceptibility of clarithromycine. *Mol. Cell. Biochem*, **265**(1-2), 19 - 26.

CHIRA K., SUH J.H., SAUCIER C. & TEISSEDRE P.L., (2008). *Les polyphenols du raisin. Phytothérapie*, **6**, 75- 82.

CHMIELEWSKI R.A.N. AND J.F. FRANK., 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. comprehensive reviews in food science and food safety. BENYAHIA TLEMCEN

CHUN OK., CHUNG S.J, SONG W.O. (2007). Estimation de la dose de flavonoïdes alimentaires et les sources d'adultes américains majeurs alimentaires. *J Nutr*, **137**, 1244-1252.

CLEMENTS J.M., COIGNARD F., JOHNSON I., CHANDLER S., PALAN S., WALLER A., WIJLMANS J., HUNTER M.G. (2002). Antibacterial activities and characterization of novel inhibitors of LpxC. *Antimicrob. Agents Chemother*, **46**(6), 1793-1799.

CLUTTERBUCK AL, WOODS E J, & al (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.*, Mar 31; 121 (1-2): 1-17

CNUCED.2010. Huile d'olive

CONFORTI F, STATTI G, UZUNOV D, MENICHINI F - Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* sub sp. *Piperitum* (Ucria) coutinho seeds - *Biol.Pharm.Bull.* Vol.29(10). pp.2056-2064, Italy. **2006.**

CONLEY J, OLSON ME et al. (2003) Biofilm formation by group A Streptococci: is there a relationship with treatment failure? *J. Clin. Microbiol.* 4043-4048]

COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G. AND CHENG, G.K. (1978) How bacteria stick. *Scientific American* 238, 86-95.

COSTERTON, J.W., IRVIN, R.T. AND CHENG, K.J. (1981) The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology* 35, 299-324.
SSALAUN

COSTERTON J. W., Z LEWANDOWSKI, D.E. CALDWELL, D. R. CORBER, H.M. LAPPIN-SCOTT. 1995. Microbial biofilms. *Annual reviews of microbiology*, 49: 711-745.

COSTERTON, J.W.; 1999; Introductions to biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **11**: 217-221

COSTERTON, J.W., VEEH, R., SHIRTLIFF, M., PASORE, M., POST, C., EHRLICH, G. 2003. The application of biofilm science to the study of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* **112**: 1446-1477

COWAN M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microb. Rev.*, **12**, 564-582.

COWAN MM. (1999). Les produits végétaux comme des agents antimicrobiens. *Cliniques avis de microbiologie*, **12** (4), 564-570

CUENDET M. (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsia alpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* » (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 24.

CROZIER A., DEL RIO D., CLIFFORD M.N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**, 446-467.

CUVELIER ME., Berset C., RICHARD H., PELLERIN P. (1990). Pouvoir antioxygène d'extraits naturels. *9ème journée internationale des huiles essentielles, Digne les Bains*, 374-385.

CUEVA C., MORENO-ARRIBAS M.V., MARTÍN-ÁLVAREZ P.J., BILLS G., VICENTE M.F., BASILIO A., LÓPEZ C.R., REQUENA T., RODRÍGUEZ J.M., BARTOLOM B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, **161**, 372-382.

DACOSTA Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. *Ed Yves Dacosta. Paris*. p317.

DACOSTA E. (2003). Les phytonutriments bioactifs. *Yves Dacosta (éd). Paris*, p317.

DAGLIA M. (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 1-8.

DAI J., ZHU L., YANG L., QIU J. (2013). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrate*. *Experimental and Clinical Sciences International Online Journal*, **19**(3), 1185-1191.

D'ANGELO S., INGROSSO D., MIGLIARDI V., SORRENTINO A., DONNARUMMA G., BARONI A., MASELLA L., ANTONIETTA TUFANO M., ZAPPIA M. et GALLETTI P. (2005). Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **38**, 908-919.

DAUCHET L., AMOYEL PH., DALLONGEVILLE J. (2005). Consommation de fruits et légumes risque d'accident vasculaire cérébral et cardiaque :Méta-analyse des études épidémiologiques prospectives. *Cah. Nutr,Diét*, **40**,(1), 31-40.

DAVEY ME, O'TOOLE GA. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **64**:847-67

DE BILLERBECK VG., ROQUES C., VANIERE P., MARQUIER P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Revue hygiène*, **10**, 248-254.

DE BOER V.C.J. (2007). Towards functional effects of polyphenols. Modulation of energy metabolism revealed. These de Doctorat. Université de Wageningen. *Pays-Bas*.

DEL POZO JL and PATEL R. (2007). The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. Doi:10.1038/sj.clpt.6100247. *Clin. Pharmacol. Ther.* **82**, 204-9.

DIMITRIOS B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trend in food Science and technology*, **17**, 505-512.

DEMIR V., GUHAN T., YAGCIOGLU A.K., DDEGIRMENCIOGLU A., (2004)
Mathematical modeling and the Determination of some Quality Paramaters of Air-dried Bay leaves. *Biosystems Engineering*. **88** (3) : 325-335.

DE LA CASAJ., LORITE M., JEMENEZ J. et CASTRO E. (2009). Valorization of waste water from two-phase olive oil extraction in fired clay brick production. *J.Hazard.Mat*, **169**, 271-278.

DE LEONARDIS A., ACETINI A., ALFANO G., MACCIOLA V. et RANALLI G. (2008). Isolation of a hydroxytyrosol rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *Eur. Food. Res. Technol*, **226**, 653-659.

DELGADO M.E., HAZA A.I., ARRANZ N., GARCIA A., et MORALES P. (2008). Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo (a) pyrene induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *European journal of nutrition*, **47** (8), 479- 490.

DEL RIO J.A., BAIDEZ A.G., BOTIA J.M. and ORTUNO A. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chem*, **83**, 75-78.

DE MARCO E., SAVARESE M., PADUANO A. et SACCHI R. (2007). Characterisation and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chemistry*, **104**, 858–867.

DE MARCO E., SAVARESE M., PADUANO A., et SACCHI R., (2007).Characterization and fractionation of its antioxidants properties and bioactivity. *Eur. Food. Res.Technol*, **226**, 653-659.

DE MARCO ELENA., MARIA SAVARESE., ANTONELLO PADUANO., RAFFAELE SACCHI. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, **104**, 858–867.

DE MARINO S, IORIZZI M, ZOLLO F - Antioxidant activity and biological properties of phytochemicals in vegetables and spices (Capsicum, Laurus, Foeniculum) - EJEAFICHE. Vol.7(10).pp.3174-3177,Italy.**2008**.

DEMBINSKA-KIEC A., MYKKÄNEN O., KIEC-WILK B., MYKKÄNEN H. (2008). Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, **99**, 109-117.

DERAKHSHAN, S., SATTARI, M., et BIGDELI, M. (2010). Effect of cumin (*Cuminum cyminum*) seed essential oil on biofilm formation and plasmid integrity of *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacognosy Magazine*, 6 (21): 57–61.

DE RIJKE E., ZAPPEY H., ARIESE F., GOOIJER C. & BRINKMAN U.A.T. (2003). Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *Journal of Chromatography (A)*, **984** (1), 45-58.

DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F., MICHAUD P., Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, **1538**, 1532-1552.

DERWICH E, BENZIANE Z, BOUKIR A- Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *laurus nobilis* from morocco- Australien journal of basic and applied sciences . Vol.3(4). pp.3818-3824,Morocco.**2009**.

DJENANE D., YANGÜELA J., DERRICHE F., BOUARAB L., RONCALES P. (2012). Utilisation des composés de feuilles d’olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature and Technologie*, **07**, 53-61.

DJERIDANE A., YOUSFI M., BRUNEL J.M. & STOCKER P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome Arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2599-2606.

DOMENICO T., FRANCESCO C., MARIA G.S., VINCENZA V., MARIATERESA C.D., ANTONELLA S., GABRIELA M., et GIUSEPPE B. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 2474-2478.

DONLAN R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **2002**. *Emerge Infect Dis.*, 8: 881-90.

DONLAN, R.M., AND J.W. COSTERTON. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, Vol.15 (2): 167-193.

DUGUID, I.G., EVANS, E. BROWN, M.R., GILBERT, P. 1992;Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J Antimicrob Chemother.* **30**: 803-810

DUPONT F.J., L. GUIGNARD. (2007). Botanique systématique moléculaire. Edition Elsevier Masson. 14 éditions révisées. pp285.

DWYER J. T. & PETERSON J. J. (2002). «Measuring flavonoid: intake need for advanced tools». *Public Health in the Northern territory*, 5 (6), 925-930.

EDDARI H. (1994). Etude de la sauge officinale, *Thèse de doctorat, université de Lyon*.

EL ABED, S., HOUARI, A., LATRACHE, H., REMMAL, A., et IBNSOUDA KORAICHI, S. (2011a). *In vitro* activity of four common essential oil components against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Journal of Microbiology*, 6 (4): 394–401.

EL ABED, S., IBNSOUDA KORAICHI, S., LATRACHE, H., GHIZLANE, Z., MOURADI, H., et REMMAL, A. (2011b). Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (20): 3229–3232.

EL HADJOUJI H., AIT BADDI G., YAACOOBI A., HAMDI H., WINTERTON P., REVEL J.C. & HAFIDI M. (2008). Optimization of biodegradation condition for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol*, 99, 5505-5510.

EMAM A, MOHAMED M, DIAB Y, MEGALLY N - Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of *Laurus nobilis* and *Emex spinosus* - Drug Discoveries & Therapeutics. Vol.4(3).pp.202-207,Egypt.**2010**.

ENA A., CARLOZZI P., PUSHBARAJ B., PAPERI R., CARNEVALE S. & SACCHI A. (2007). Ability of the aquatic fern *Azolla* to remove chemical oxygen demand and polyphenols from olive mill wastewater. *Gras.Acei*, 58(1), 34-39.

ESMAEILI-MAHANIA S., REZAEZADEH-ROUKERDA M., ESMAILPOURA K. (2010). Olive (*Olea europaea* L) leaf extract elects anti nociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppress morphine hyperalgesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 200-205.

ESRA S. Z., SEDAT I. & LALE E. (2001). Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water. Res*, 35(9), 2336-2340.

FABRI R.L., NOGUEIRA M.S., BRAGA F.G., COIMBRA E.S. & SCIO E. (2009). *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial anti leishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology*, 100, 428-433.

FALLEH H., KSOURI R., CHAIEB K., KARRAY-BOURAOU N., TRABELSI N., BOULAABA M., ABDELLY C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.

FAVIER A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en chimie*,

FEDORAK P.M. & HRUDEY S.E. (1984). The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. *Water.Res.*, **18**, 361-7.

FERHAT M. (2009). Recherche de substances bioactives de *Centaurea microcarpa* coss et dur.DES.Univ. Msila.

FIESS M. (1994). Antioxygènes contre le rancissement. *Revue de l'Industrie Agroalimentaire*, **520**, 47-50.

FIESTAS ROS J.A. (1986). Vegetation water used as fertilizer, proceedings of international Symposium on olive By-Products Valorization. *FAQ, UNDP, Sevilla, Spain*, 321- 330.

FKI INES., ALLOUCHE NOUREDDINE., SAYADI SAMI. (2005). The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, **93**, 197–204.

FLEMING H.P., WALTER W.M., JR. and ETCHELLS J.L. (1973). Antimicrobial Properties of Oleuropein and Products of Its Hydrolysis from Green Olives. *Appl. microbiol*, **26**(5), 777-782.

FLEURIET A., JAY-ALLEMAND C., MACHEIX J.J. (2005). Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, 121-216.

FLEURIET. & MACHEIX. (2003). Les polyphenols en agroalimentaire, *Lavoisier* 2006 (France), ISBN 2-7430-0805-9, ISSN 0243-5624. pp 20.

FLORENTIN E (Relu). (2004). fruits et légumes, polyphenols et santé.

FURNERI P M., MARINO A., SAIJA A., UCCELLA N. & BISIGNANO G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob Ag*, **20**, 293-296.

GAMEL T.H. & KIRITSAKIS A. (1999). Effect of methanol extracts of rosemary and olive vegetable water on the stability of olive oil and sunflower oil. *Grasas y Aceites*, **50**, 345-350.

GARCIA M., RUIZ Y., MOUMEN A., ALCAIDE M. (2006). Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaf fermentation in continuous fermenters. *Small Ruminant Research*, **61**, 53-61.

GARDNER G. A. (1981). *Brochothrix thermosphacta* (*Microbacterium thermosphactum*) in the spoilage of meats: a review, p. 139-173. In T. A. Roberts, G. A. Hobbs, J. H. B. Christian,

and N. Skovgaard (ed.), Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. Academic Press, London, England.

GARIBOLDI P. JOMMI G. and VEROTTA L. (1986). Sercoiridoïds from *Olea Europaea*, *Phytochemistry*, **25** (4), 865-896.

GAUSSEN H., DEUROY J.F. and OZENDA P. (1982). Précis de botanique II « les végétaux supérieurs ». Ed : MASSON, 215-408.

GAUSSORGUES R. (2009). L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique, *Revue française d'allergologie*, **49**, 2–6.

GEE J.M., JOHNSON I.T. (2001). Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*, **8**, 1-182.

GHEDIRA K. (2005). Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **04**, 162-169.

GHEDIRA K. (2008). L'olivier article de synthèse .Pharmacognosie. *Phytothérapie*, **6**, 83–89.

GHOSH D., SCHEEPENS A. (2009). Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53**, 322 – 331.

GOMEZ-CARAVACA A.M., Gomez-Romero M., ARRAEZ-ROMAN D., SEGURA-CARRETERO A., FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1220-1234.

GOMEZ-ROMERO M., ARRAEZ-ROMAN D., MORENO-TORRES R., GARCIA-SALAS P., SEGURA-CARRETERO A. & FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2007). Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Sep. Sci*, **30**, 595-603.

GOMEZ-ROMERO M., ARRAEZ-ROMAN D., SEGURA-CARRETERO A. and FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2007). Analytical determination of antioxidants in tomato: Typical components of the Mediterranean diet. *J. Sep. Sci*, **30**, 452-461.

GONCALVES M.R., COSTAJ.C., MARQUES I.P. et ALVES M.M. (2011). Inoculum acclimation to promote the conversion of olive mill wastewater to methane. *Appl.Microbio. Biotechnol. Ener*, **36**, 2138-2141.

GONZALEZ-GALLEGO J., GARCIA-MEDIAVILLA M.V., SANCHEZ-CAMPOS S., TUNON M.J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*, **104**, 15-27.

GRAY, ED., PETERS, G., VERSTEGEN, M. 1984. Effect of extracellular slime substance from *staphylococcus epidermidis* adhesion on human cellular response; *Lancet*; **18**: 365-367

GRESELE P., CERLETTI C., GUGLIELMINI G., PIGNATELLI P., DE GAETANO G. and VIOLI F. (2011). Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. of Nutr. Biochem*, **22**, 201–211.

GUINEBERT E., DURAND P., PROST M., GRINAND R. and BERNIGAULT R. (2005). Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*, 554-558.

GULCIN I., HUYUT Z., ELMASTAS M. and ABOUL-ENEIN., H.Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, **3**,43-53.

GUO C., YANG J., WEI J., LI Y., XU J., JIANG Y. (2003). Antioxydant activities of peel pulp, and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr. Res*, **23**, 1719-1726.

HADI M. (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine, Oxford, UK.

HALLIWELL B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutritional Review*, **52**, 253-265.

HAMROUNI I ,AIDIWANNES W, BETTAIB I , BERRIMA S , CHAHED T- Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods- *FoodChemistry*.Vol.126.pp.691-697,Tunisia.**2011.**

HAMDEN K., ALLOUCHE N., DAMAK M. et ELFEKI A. (2009). Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats, *Chemico-Biological Interactions*, **180**, 421-432.

HAMDI K.H., CASTELLON R. (2005). Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **334**, 769-778.

HAMDI M. (1996). Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry*, **31**, 105-110.

HAMDI M. (1993). Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olives : l'utilité de la microbiologie industrielle. *Olivae*, **46**, 20-24.

HAMDI M. (1991). Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse de l'université de Provence. Marseille, France. 166 p.

HAMILTON-MILLER J.M.T et SHAH S. (2004). Activity of tea componement epicatechin gallate and analogues against methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **46**, 279-285.

HANDIQUE J.G. & BARUAH J.B. (2002). Polyphenolic compounds: an overview. *React Funct Polym*, **52**, 163- 188.

HANDBOOK OF SPICES, seasonings, and flavorings. Second edition. Raghavan S. Taylor & Francis. CRC press .pp.73-77.**2007**.

HARAGUCHI H., TANIMOTO K., TAMURA Y., MIZUTANI K., KINOSHITA T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, **48**, 125-129

HATANO T., KUSUDA M., INADA K., OGAWA T.O., SHIOTA S., TSUCHIYA T. & YOSHIDA T. (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, **66**, 2047-2055.

HAYOUNI E.A., ABEDRABBA M., BOUIX M et HAMDI M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phénolic contents and biological activities in vitro of Tuinsian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts.Food.

HE Z., XIA W. & CHEN J. (2008). Isolation and structure elucidation of phenolics compounds in Chinese olive (*Cnarium album* L.) fruit. *European Food Research and Technology*, **226**, 1191-1196.

HEIM K.E., TAGLIAFERRO A.R., BOBILYA, D.J. (2002). Flavonoids antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, **13**, 572- 584.

HEMAISWARYA S., KRUTHIVENTI A. K., & DOBLE M. (2008). Synergism between natural Products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, **15**, 639- 652.

HENNEBELLE T., (2006). Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologie de Lille, Lille 1. Ecole Doctorale Sciences de la Matière du rayonnement et de l'Environnement. *France*.

HEYDORN A., A. T. NIELSEN, M. HENTZER, C. STERNBERG, M. GIVSKOV, B. K. ERSBØLL, S. MOLIN. 2000. Quantification of biofilms structures by the novel computer program COMSTAT *Microbiology*, **146**: 2395– 2407.

HILLIARD J.J., KRAUSE H.M., BERNSTEIN J.I., et autre. (1995). A comparison of active site binding of 4- quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv. Exp. Med. Biol*, **390**, 59-69.

HEIM K.H., TAGLIAFERRO A.R. and BOBILYA D.J. (2002). Flavonoid oxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 572-584.

HODGSON J. M., CROFT K.D. (2010). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**, 495-502.

HOEKOU Y.P., BATAWILA K., GBOGBO K.A., KAROU D.S., AMEYAPOH Y. & SOUZA C. (2012). Laboratoire de Microbiologie de l'Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA), *Université de Lomé, Togo*. pp 3094.

HOSTETTMANN K. & MARSTON A. (2002). *Phytochem. Rev*, **1**, 275-285.

HUANG A.C., WILDE A., EBMAYER J., SKOUROUMOUNIS G. & TAYLOR D.K. (2013). Examination of the Phenolic Profile and Antioxidant Activity of the Leaves of the Australian Native Plant *Smilax glycyphylla*. *J. Nat. Prod*, **76**(10), 1930-6.

HUANG D., OU B. & PRIOR R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.

HUDAIB M., GOTTI R., POMPONIO R., & CAVRINI V. (2003). Recovery evaluation lipophilic markers from *Echinacea purpurea* roots applying microwave-assisted solvent of extraction versus conventional methods. *J. Sep. Sci*, **26**, 97-104.

ISERIN P. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème Ed. Larousse. Londres Pp : 143 et 225-226.

IVAN A. ROSS. (2001) medicinal plants of the world, chemical constituents, traditional and modern medicinal uses - HUMANA PRESS. Volume 2. pp.261-264, United states of America.

KANSOLE M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin).

JACQUELIN, L.F., LE MAGREX, E., BRISSET, L., CARQUIN, J., BERTHET, A., CHOISY, C.1994. Synergism of the combination of enzymes or surfactants and a phenolic disinfectant on a bacterial biofilm. *Pathol Biol. (Paris)*. **42(5)**: 425-431

JADE FOURNIER LARENTE. (2014). Modulation de l'expression des gènes reliés à la virulence et au stress chez *Porphyromonas gingivalis* par les polyphénols du thé vert. Maitrise en Microbiologie.univ. Laval.p14.

JAPON-L UJAN R., LUQUE-RODRIGUEZ J.M., LUQUE DE CASTRO M.D. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenol from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, **1108**, 76–82.

JASSIM S.A., NAJI M.A. (2003) Novell antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Appl. Microbiol.* **95** (3) : 412-27.

JEMAI H., BOUAZIZ M., FKI I., EL FEKI A., SAYADI S. (2008). Hypolipidimic and Antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from *Chemlali* olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, **176**, 88-98.

JESSE WAGSTAFF D - International poisonous plant checklist- CRC Press. London . 2008.

JUST N., NYUNGA M., LELONG J., WALLAERT B. (2005). Allergie immédiate aux glucocorticoïdes de synthèse oraux. *La Revue de Médecine Interne*, **26**, 331-334.

KALAM S., SINGH R., MANI A., PATEL J., NAEM KF. & PANDEY A. (2012). Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*, **1**, 18-34.

KALMIS E., AZBAR N., YILDIZ H.,& KALYONCU F. (2008). Feasibility of using olive mill effluent(OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. *Biores.Technol*, **99**, 164-169.

KALOUSTIAN J., CHEVALIER J., MIKAIL C., MARTINO M., ABOU L., VERGNES M. (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne Phytothérapie, **6**, 160-164.

KANG D.G., YUN C.K. & LEE H.S. (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacol*, **87**, 231-236.

KARAKAYA S. (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves : potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, **67**(11), 632-8.

KAROU D., DICKO M.H., SIMPORE J., TRAORE A.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethno medicinal plants of Burkina Fasso African, *journal of Biotechnology*, **4**(8), 823-828.

KATARZYNA U., ANNA M., MARTA M., JOANNA J.B. & GRZEGORZ W. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, **62** (2), 132-135.

KEBBAB R. (2014). Etude de pouvoir antioxidant des polyphénols issues des margines d'olive de la variété *Chamlal* : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Algérie.

KILIC A, ALTUNTAS E- Wood and bark volatile compounds of laurus nobilis L.- Holzals Rohund Werkstoff. Vol.64.pp.317-320, Turkey. 2006.

KIM J., MARSHALL MR., WEI C. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43 pp. 2839-2845.

KIRBY G.C. (1996). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*, **90**,605-609.

KIVÇAK B., MERT T. (2002) Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia*. **73**: 242-243.

KLUEH I., WAGNER V., KELLY S., JOHSON A., and BRYERS J.D. (2000) Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *J Biomed Mater Res* **53**, 621-631.

KNAGGS A.R. (2003).The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, **20**, 119- 36.

KOURI G., TSIMOGIANNIS D., HAIDO BARDOUKI H. & OREOPOULOU V (2007). Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative of Food. Science and Emerging Technology*, **8**, 155-168.

KUMAR C.G and ANAND S.K. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry : a review. *Int J Food Microbiol* , **42**, 9- 27.

LAFKA T.A., LAZOU A.E., SINANOGLU J.V. & LAZOS E.S. (2011). Phenolic and antioxidants potential of olive oil mill wastes. *Food. Chem*, **125**, 92-98.

LAFKA T., LAZOU A.E., SINANOGLU V. J., LAZOS E. S. (2010). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, **125**, 92–98.

LAKHTAR H., ISMAILI-ALAOUI M.A., PERRAUD-GAIME I., PHILIPPOSSIS A. & ROUSSOS S. (2010). Screening of *Lentinula edodes* grow on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for Polyphenol biodegradation. *Inter.biodeterior. Biodegr*, **64**, 167-172.

LALAS S., ATHANASIADIS V., GORTZI O., BOUNITSI M., GIOVANOUDIS I., TSAKNIS J., BOGIATZIS F. (2011). Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*, **127**, 1521-1525.

LAMBERT R. J. W., SKANDAMIS P. N., COOTE P. J. & NYCHAS G. E. (2001). A study of the Minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 453- 462.

LATTE L.P., KOLODZIEJ H. (2000). Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch*, **55**(5-6), 467- 72.

LASA I, PENADES JR. 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, **157**, pp 99-107

LEE-HUANG S., ZHANG L., P.L., CHANG Y.T. & HUANG P.L. (2003). Anti-HIV activity of olive leaf extracts (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **307**, 1029-1037.

LEE-HUANG S., HUANG P.L., ZHANG D., LEE J.W., BAO J., SUN Y., CHANG Y.T., ZHANG J. & HUANG P.L. (2007). Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. Integrase inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **354**, 879-884.

LEE-HUANG S., ZHANG L., CHANG Y.T. and HUANG P.L. (2003). Anti-HIV activities of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **307**, 1029-1037.

LEE O.H., LEE B., LEE J., LEE H-B., SON J.Y., PARK C.S., SHETTY K., KIM Y.C. (2009). Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bio resource Technology*, **100**, 6107-6113.

LEE O.H., LEE B.Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. Short Communication *Bioresource Technology*, **101**, 3751–3754.

LEMON KP, EARL AM, VLAMAKIS HC, AGUILAR C, KOLTER R. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322, pp 1-16.

LEON W., NITIEMA., SAVADOGO A., JACQUES S., DAYERI D. et ALFRED S. (2012). Traoré Activité antimicrobienne in vitro de certains composés phénoliques (Coumarine et quercétine) contre la gastroentérite souches bactériennes, 183-187.

LEONG, L.P., SHUI, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 76, 69-75.

LEGER C. (1999). Coproduits de l'huilerie d'olive: les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques. *OCL. Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **6**, 60-63.

LEITAO DP. POLIZELLO AC., ITO IY., SPADARO AC. (2005). Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J Med Food*, **8(1)**, 36-40.

LETELLIER M. & BUDZINSKI H. (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, **27**, 259-271

LEULMI N. (2011). La valorization nutritionnelle des margine et de leur impact sur la réduction de la méthanogènes ruminale chez l'ovin. Thèse de Magister en biotechnologie microbienne. Faculté des Science de la Nature et de la Vie. Université Mentouri, Constantine, Algérie.

LEV N., GILGUN-SHERKI Y., OFFEN D., & MELAMED E. (2007). The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: Current State. In: Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. 1st ed. Elsevier BV. (Amsterdam), 283-295.

LEVI-MINZI R., GAVIOZZI A., RIFFALDI R., et FALZI L. (1992). L'épandage aux champs des margines : Effet sur les propriétés de sol. *Oliv*, **40**, 20-25.

LIBERATORE L., PROCIDA G., D'ALESSANDRO N. & CICHELLI A. (2001). Solid-phase extraction and gaz chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Chem*, **73**, 119-124.

LIMA L.M., BABAKHANIB. BOLDAJIS A.H., ASADIM. BOLDAJI R.M. (2013). Essential oils composition and antibacterial activities of *Eucalyptus camaldulensis*. *Dehn. International Journal of Medical and Aromatic Plants*, **3**, 214-219.

LISU W., JUI-HUNG Y., HSIAO-LING L., MING-JIUAN W. (2003). Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn), *Journal of food and drug analysis*, **11**(1), 60-66.

LIU F., LIAOS., ZOU Y. & XIAO G. (2014). Antioxidant activity of *Phellinus igniarius* extracts, *The FASEB Journal*, **28**(1), 830-32.

LOŽIENE KRISTINA., VENSKUTONIS PETRAS R., AUSRA SIPAILIENE., JUOZAS LABOKAS RADICAL (2007). Scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, **103**, 546–559.

LUGASI A., HÓVÁRI J., SÁGI K.V. & BIRO L. (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, **47** (4), 119-125.

MACHEIX J.J., FLEURIET A. & JAY-ALLEMAND C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, *Lausanne*, p. 4-5.

MACHEIX JEAN-JACQUES., ANNIE FLEURIET., CHRISTIAN JAY –ALLMEND. (2005). Les composés phénoliques des végétaux .collection biologie. Presses polytechniques et universitaires romandes. *Lausanne*.

MACHEIX J.J., FLEURIET A. & JAY-ALLEMAND C.H. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, *Lausanne* p, 190. ISBN, 2- 88074-625-6.

MADI A. (2009). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de Magister (Biotechnologie végétale), Ecole doctorale. Université Mentouri de Constantine. pp 88.

MAH TL, O'TOOLE GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**: 34- 39

MAKOI J.H.J.R., NDAKIDEMI P.A. (2007). Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*, **6**(12), 1358-1368.

MALIK, N. S.A., BRADFORD, J. M., (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in “Arbequina”olives. *Scientia Horticulturae* 110, 274-278.

MANNA C., GALLETTI P., CUCCIOLLA V., MONTEDERO G. & ZAPPIA V. (1999). Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **10**, 159-165.

MANACH C., MAZUR A., SCALBERT A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, **16**, 1–8.

MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C. & JIMENEZ L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, **79**, 727-747.

MANN C.M., COX S.D., MARKHAM J.L. (2000). The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* infecting nctc 6749 contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), letters in appl. *Microbial*, **30**, 294-297.

MANSOUR-BENAMAR M., SAVOIE J.M.et CHAVANT L. (2013). Valorisation of solid olive mill waste water by cultivation of a local strain of edible mushrooms: Valorisation du grignon d'olive par la culture d'une souche locale de champignon comestible. *C.R.Bio*, **336**, 407-415.

MARFAK A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides: étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools (Formation des depsides). Thèse de Doctorat. *Faculté de Pharmacie, Université de Limoges* (France).

MARSILIO V., CAMPESTRE C., LANZA B. (2001). Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, **74**, 55–60.

MARTHA E. (2008). Caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune: Etude de leur capacité antioxydante. *Thèse de Doctorat, Université Laval*. P, 31-54.

MARTIN S., ANDRIANTSITOHAINA R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéologie*, **51**, 304–315.

MARTIN, S., ANDRIANTSITOHAINA, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 51, 304-315. (FIGURE)

MARTIN D.W., SCHURR M.J., MUDD M.H., GOVAN J.R., HOLLOWAY B.W., DERETIC V. (1993). Mechanism of conversion to mucoidy in *pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **90**, 8377-8381.

MASSADEH M.I., et MODALLALN. (2008). Ethanol production from olive mill wastewater (OMWW) pretreated with pleurotus sajor-caju. *Energy. Fuels*, **150** (22), 150-154.

MACHADO T.D., LEAL I.C.R., AMARAL A.C.F., DOS SANTOS K.R.N., DA SIVA M.G., KUSTER R.M. (2002). Antimicrobial ellagitannin of Punica granatum fruits. *J Braz Chem Soc*, **13**, 606-610.

MAYTAR A., KAYA A et DINCER S. (2008) Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, *Turkey science of the Total Environment*, **15**, 279-285.

MCDUGALD D., S. A. RICE, N. BARRAUD, P. D. STEINBERG, S. KJELLEBERG. 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 39-50.

MEKKI A., DHOUB A. & SAYADI S. (2006). Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiol. Res*, **161**, 93-101.

MENDEZ J.A., VAZQUEZ-MARTIN A., COLOMER R., BRUNET J., CARRASCO-PANCORBO A., GARCIA-VILLALBA R., FERNANDEZ-GUTIERRES A., SEGURA-CARRETERO A. (2007). Olive oil's bitter principal reverses acquired autoresistance to trastuzumab (HerceptinTM) in HER2- over expressing breast cancer cells. *Journal of BMC Cancer*, **7**, p80.

MEYER A., DEIANA J. (1988). Cours de microbiologie générale. *Doin éditeurs, paris*. p 201-224.

MICOL V., CATURLA N., PEREZ-FONS L., MAS V., PEREZ L. & ESTEPA A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antivir Res*, **66**, 129-136.

MOHSEN S.M., AMMAR A.S.M. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem*, **112**, 595-598.

MOHAMMEDI. Z (2011). Etude du pouvoir Antimicrobien et Antioxydant des Huile Essentielles et flavanoides de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister Université de Tlemcen. p 18-24-25-49-50.

MOMPON B., LEMAIRE B., MENGAL P. & SURBLED M. (1998). Extraction des Polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. In : Veracauteren, Joseph. *Polyphénols* 96.édition. INRA. Paris. 31-43. ISBN 2-7380-0796-1.

MORI A., NISHINO C., ENOKI N., TAWATA S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, **26**, 2231-2234.

MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E., ROURA S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, **38** p, 565-570.

MOUSOUNI A. (2011). Etude de fiabilité de nouvelles techniques pour la valorisation du déchet dans le secteur agroalimentaire au Maghreb. *REME*, 1- 51.

NGUYEN, V.T., MORANGE, M., BENSAUDE, O. 1989. Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells. *J Biol Chem*. **264(18)**: 10487-1092

NACZK M., SHAHIDI F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 95–111.

NAYAK S, NALABOTHU P, SANDIFORD S, BHOGADI V, ADOGWA A- Evaluation of wound healing activity of Allamanda Cathartica L. and Laurus nobilis L. extracts on rats- BMC complementary and Alternative Medecine. Vol. 6(12). **2006**.

NEFZAOUI A. (1991). Valorisation des sous produits de l'olivier. Options Méditerranéennes-Série séminaire. **16**: 101-108.

NEFZAOUI A. (1987). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par une valorisation optimale des sous-produits. *Séminaire sur l'économie de l'olivier*, Tunisie.

NEKHILI EZ. (2009). Polyphénols de l'alimentation : Extraction, Interaction avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat, Univ . Marrakech, p 320

NEURATH AR et al., *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infect Dis*, (**2004**), Oct 14; 4:41.

NIAOUNAKIS M., HALVADAKIS C.P. (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey, second ed. *Elsevier, Amsterdam*.

NIKI E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, **49**, 503-515.

NOSTRO, A., CELLINI, L., ZIMBALATTI, V., BLANCO, A. R., MARINO, A., PIZZIMENTI, F., DI GIULIO, M. ET BISIGNANO, G. (2012). Enhanced activity of carvacrol against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an acidic environment. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 120 (12): 967–973.

NOUBIKH A., ABDERRABBA M. & PROVIST E. (2007). Temperature and addition effects on the solubility behavior of some phenolic compounds in water *J. Chem. Thermody*, **39**, 297-303.

NURBAS M, BAL Y- Recovery of fixed and volatile oils from *Laurus nobilis* L. fruit and leaves by solvent extraction method- Eng & Arch. Fac.Vol.XVIII,2. **2005**.

OBIED H. K., ALLEN M. S., BEDGOOD D. R., PRENZLER P. D., ROBARDS K. & STOCKMANN R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 823–837.

OCHIKH O, CHAHED S, KSOURI R, TAARIT M, FALEH H, ABDELLY C, KCHOUK M, MARZOUK B- The effects of extraction method on the measured Tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs-Journal of food composition and analysis. Vol.24,pp.103-110, Tunisia. **2011**.

OLCOTT HS., MATHILL HA. (1936). Antioxidants and autoxidation of fats. VII. Preliminary classification of inhibitors. *J Am Chem Soc*, **58**, 2204-2208.

OMAR SH. (2010). Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci Pharm*.

OMAR S.H. (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Journal of Sci Pharm*, **78**,133- 154.

ORTURNO A., BAIDEZ A., GOMEY P., ARENAS MC. (2005). *Citrus perasidi* and *Citrus sinensis* flavonoïds: Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*.

OUSSOU KR., YOLOU S., BOTI JB., GUESSENND KN., KANKO C., AHIBO C., CASANOVAD J. (2008). Etude chimique et activité antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *Eur J Sci Res*, **24**, 94-103.

OVASKAINEN M.L., TÖRRÖNEN R., KOPONEN J.M, SINKKO H, HELLSTRÖM J, REINIVUO H, et al., (2008). L'apport alimentaire et les sources de polyphénols chez les adultes finlandais majeurs alimentaires. *J Nutr*, **138**, 562-566.

OWEN. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* (2003) May; **41** (5), 703-17.

OWEN P. & JOHENS T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, **64**, 149-160.

OZKAYA, M.T, ET CELIK, M., (1999). Quantitative analysis of phenolic compounds in olive cuttings. *Acta Horticulturae*, 474, 477-480.

PAGES J.M., GARNOTEL E. (2003). Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. *Revue Française des Laboratoires*, **352**, 57-63.

PAIXAO N., PERESTRELO R., MARQUES J.C. and CAMARA J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red rosé and white wines. *Food Chem*, **105**, 204-214.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A., GASPAS, C., PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R., SILVA-DIAS, A., SALGUEIRO, L., CAVALEIRO, C., PINA-VAZ, C., MARTINEZ DE-OLIVEIRA, J., QUEIROZ, J. A., ET RODRIGUES, A. G. (2012). The anti-*Candida* activity of *Thymbra capitata* essential oil: Effect upon pre-formed biofilm. *Journal of Ethnopharmacology*, 140 (2): 379–383.

PANDEY K.B. and RIZVI S.I. (2011). Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomedical paper of medicine faculty- University Palacky Olomouc-Czech Republic*, **155**, 131-136.

PANSERA M.R., IOB G.A., ATTI-SANTOS A.C., ROSSATO M., ATTI-SERAFINI L. & CASSEL E. (2004). Extraction of Tannin by *Acacia mearnsii* with Supercritical Fluids. *Braz Arch BioL Techn*, **47** (6), 995-998.

PARASKEVI., MOUTSATSOU. (2007). The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones*, **6** (3), 173-193.

PEREIRA S.A., PEREIRA A.P.G., FERREIRA C.F.R., VALANTAO P., ANDRADE P.B., SEABRA R., ESTEVINHO .L. & BENITO .A. (2006). Table olive from Portugal: Phenolic compounds antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **54**, 8425-8431.

PEREIRA M., TRIPATHY S., INDAMDAR V., RAMESH K., BHAVSAR M., DATE A., IYYER R., ACCHAMMACHARY A., MEHENDALE S., RISBUD A. (2005). Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in seropositive and seronegative HIV-TB patients in Pune, India. *Indian J. Med. Res*, **121**(4), 235-239.

PEREIRA A.P., FERREIRA I., MARCELINO F., VALENTAO P., ANDRADE P.B., SEABRA R., ESTEVINHO L., BENTO A., PERIERA J.A. (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. *Cobrançosa*) Leaves. *Molécules*, **12**, 1153-1162.

POURRUT B. (2008). Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité. *Ecotoxicologie. France*.

PORTES E. (2008). Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de doctorat Université Bordeaux I. p 44-46

PRABHAKAR, J., SENTHILKUMAR, M., PRIYA, M. S., MAHALAKSHMI, K., SEHGAL, P. K., ET SUKUMARAN, V. G. (2010). Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: An *in vitro* study. *Journal of Endodontics*, **36** (1): 83–86.

PRASAIN J.K., WANG C.C., BARNES S. (2004). Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, **37**(9), 1324-1350.

PRIEGO-CAPOTE F., RUIZ-JIMENEZ J. & LUQUE DE CASTRO M.D. (2004). Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis diode array detection Application to the characterisation of alperujo after ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatogr. A*, **1045**, 239-246.

PROCIDA G. & CECCON L. (2006). Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill waste waters. *Anal. Chim. Acta*, **561**, 103-106.

PROESTOS C. & SERELL D., KOMAITIS M., (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, **95**, 44-52.

PROESTOS, C., BOZIARIS I.S., NYCHAS G-J.E. et KOMAITIS M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of Food Chemistry their antioxidant capacity and antimicrobial activity, **95**, 664- 671.

PUNYASIRI PA., ABEYSINGHE SB., KUMAR V. (2005). Performed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infections. *J Chem Agri*, **31**(6), 1315-1324.

QUAVE, C. L., PLANO, L. R. W., PANTUSO, T., ET BENNETT, B. C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 118 (3): 418–428.

RAMOS-CORMENZANA A., JIREZ-JIMENEZ B. & GARCIA-PAREJA M.P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration et Biodegradation*, 38, 283-290.

RAMTIN M., ALIREZA M., KHOSHIKHOLGH-PAHLAVIANI M., ISSADZADEH K., ASSMAR M., ZARRABI S. 2013. In- vitro Antimicrobial Activity of *Iris pseudacorus* and *Urtica dioica*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*.

RANALLI A., LUCERA L. & CONTENTO S. (2003). Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp.7636-7641.

RANNALI A. (1991). The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Oliv*, 37, 30-39.

RAUWALD H.W., BREHM O., ODENTHAL K.P. (1994). Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*. *Phytother Res*, 8, 35-40.

RAVIKUMAR S., NAZAR S., NURALSHIEFA A., ABIDEEN S. (2005). Antibacterial activity of traditional therapeutic coastal medicinal plants against some pathogens. *J Environ Biol*, 26, 383-386.

RAYAN D. & ROBARDS K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31R-44R.

RICHTER G. (1993). Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. *Ed Presse polytechnique et universitaire romande*, 317-339.

RIJNAARTS, H.H.M., NORDE, W., BOUWER, E.J., LYKLEMA, J., ZEHNDER, A.J.B.; 1993; Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl Environ Microbiol*. 59: 3255-3265

RIOS J.L. and RECIO M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84.

RODRIGUEZ-BERNALDO., DE QUIRS A., LAGE-YUSTY M.A., LOPEZ HERNANDEZ J. (2009). HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research*

International, **42**, 1018-1022.

ROGINSKY V. & LISSI E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem*, **92**, 235254.

ROIG A., CAYUELA M.Y. & SANCHEZ- MONEDERO M.A. (2006). An overview on olive mill wastes and there valorization methods. *Was. Manag*, **26**, 960-969.

ROLLAND Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux.OCL, volume. 11, 6, 419-424.

ROSS R. (1999). Atherosclerosis, an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, **340** (2), 115-126.

RYAN D., ROBARDS K. & LAVEE S. (1999). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 265–274.

SABBAH I., MARSOUK T. & BASHEERS. (2004). The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. *Process. Biochem*, **39**, 1947- 1941.

SAITTA M., LO CURTO S., SALVO F., DI BELLA G. & DUGO G. (2002). Gas fchromatographic tandem mass spectrometric identication of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analyt Chim Acta*, **466**, 335-344.

SAKANAKA S, JUNEJA L.R. & TANIGUCHI M. (2000). Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *J Biosci Bioeng*, **90**(1), 81-85.

SAKOUHI F., HARRABI S., ABSALON C., SBEI K., BOUKHCHINA S., KALLEL H. (2008). α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives: Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*, **108**, 833-839.

SARKER S D, LATIF Z & GRAY A I. (2005). Natural Product Isolation. In: Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), 1- 23.

SANDHAR H.K., KUMAR B., PRASHER S., TIWARI P, SALHAN M. & SHARMA P (2011). A Review of, Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1**, 25-41.

SANGUN M, AYDIN E, TIMUR M, KARADENIZ H, CALISKAN M, OZKAN A - Comparison of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves and fruits from different regions of Hatay, Turkey - *Journal of Environmental Biology*. Vol. 28(4). pp.731-733, Turkey.**2007**.

SANTOYO S, LORIA R, JAIME L, IBANEZ E- Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization- Eur Food Res Technol.Vol.222.pp.565-571.**2006**.

SARNI-MANCHADO PASCALE. & CHEYNIER VERONIQUE. (2006). Les Polyphénols en Agroalimentaire. Technique et Documentation. *Lavoisier. Paris*. 398p.

SREY, S., JAHID, I. K. , SANG-DO HA.,2013.Biofilm Formation in food industries: A food safety concern .Food Control 31 :72e585 benyahia tlemcen écologie du biofilm

SAVARESE TM., STROHSNITTER WC., LOW HP., LIU Q., BAIK I., OKULICZ W., CHELMOW DP., LAGIOU P., QUESENBERRY PJ., NOLLER KL., HSIEH CC. (2007). Correlation of umbilical cord blood hormones and growth factors with stem cell potential: implications for the prenatal origin of breast cancer hypothesis. *Breast Cancer Res* 9: R29.

SAVOURNIN C., BAGHDIKIAN B., ELIAS R., DARGOUTH-KESRAOUI F., BOUKEF K. et BALANSARD G., J. AGRIC. (2001). *Food Chem*, **49**, p 618.

SAYADI S., ALLOUCHE N., JAOUA M.et ALOUI F. (2000). Determinal effects of high molecular-mass polyphénols on olive mill wastewater biotreatment. *Process. Biochem*, **35**, 725-735.

SCALBERT A., WILLIAMSON G. (2000).Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, **130**, 2073-2085.

SCALBERT A., MANACH C., MORAND C., REMESY C., JIMENEZ L. (2005). Dietary Polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**, 287-306.

SEIDEL V. (2005). Initial and Bulk Extraction In: Sarker S D. Latif Z and Gray A I. *Natural Products isolation. Humana Press* (Totowa), 27-37.

SENANI N. (2010). Etude du pouvoir antifongique (inhibition de croissance et de production d'aflatoxines) des composés et extraits polyphenoliques issus des olives et sous produits de l'olivier (feuilles et margines) variété *chamlal* sur deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Mémoire de Magister (Biochimie Appliquée et biotechnologies). *Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou*. pp 66.

SERAPHIM P., MARIA G.P., STYLIANOS F., MICHAEL K., GEORGE A. (2008). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, **99**, 2419-2428.

SERVILI M. & MONTEDORO G. (2002). Contribution of phenolic compounds in virgin Olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 602-613.

SERVILI MAURIZIO., SELVAGGINI ROBERTO., ESPOSTO SONIA., TATICCHI AGNESE., MONTEDORO GIANFRANCESCO., MOROZZI GUIDO. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Review. Journal of Chromatography, (A)*, **1054**, 113–127.

SERVILI M., ESPOSTO R. S., FABIANI S., URBANI A., TATICCHI F., MARIUCCI R., SELVAGGINI., MONTEDORO G. F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Review. Inflammopharmacology*, **17**, 76–84.

SHAN B., CAI Y.Z., BROOKS J.D. & CORKE H. (2007). The in vitro antibacterial activity of diet aryspice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **117**, 112-119.

SHIMIZU H. (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, *Stroke*, **35** (9), 2072-2077.

SIFOUNE N. (2008). Traitement des effluents des huileries d'olive par oxydation au H₂O₂. Thèse de magister en Génie de l'Environnement Faculté des Sciences de l'Ingénieur. Université M'Hamed bougera- Boumerdes, Algérie.

SILBERBERG M., MORAND C., MATHEVON T., BESSON C., MANACH C., SCALBERT A. & REMESY C. (2006). The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur J Nutr*, **45**, 8896

SILVA BY SANDRA., LUCÍLIA GOMES., FAUSTO LEITÃO., MARIA BRONZE., ANA V COELHO. & LUÍS VILAS BOAS. (2010). Sercoiridoïds in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Food Science. Technology*, **61** (2), 157-164.

SIMIC M., KUNDAKOVIC T., KOVACEVIC N. (2003) Preliminary assay on the antioxidant activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*. **74**: 613-616.

SINGH, P.K., SCHAEFER, A.L., PARSEK, M.R., MONINGER, T.O., WELSH, M.J., GREENBERG, E.P.; 2000; Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. **407**: 762-764

SIVAKUMARAN S., MOLAN A.L., MEAGHER L.P., KOLB B. (2004). Variation in antimicrobial action of pranthocymidins from *Dorycrium rectum* against rumen bacteria. *Phys Chem*, 5(3), 106-111.

SMITH., DUNEZ., LELLIOT., PHILLIPS.& ARCHER. (1988). European Handbook of Plant Disease. Blackwell Scientific Publications.

SOLER-RIVAS C., GARCIA-ROSADO A., POLONIA I., JUNCA-BLANCH G., MARIN F.R. & WICHES H.J. (2006). Microbiological effects of olive mill waste addition to substrates for *Pleurotus pulmonarius* cultivation. *Int. Biodeter. Biodegr*, 57, 3744.

SOUSA A., FERREIRA I.C. F. R., CALHELHA R., ANDRADE P.B., VALENTAO P., SEABRA R., ESTEVINHO L., BENTO A. & PEREIRA J.A. (2006). Phenolics and able olives ‘alcaparra’. Antimicrobial activity of traditional stoned Bioorg. *Med. Chem*, 14, 8533-8538.

SPENCER J.P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of Flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 244–260

SPICHIGER R.E et al. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs. Edition Presses polytechniques et universitaires romandes. 2eme édition, pp 418.

STAMATAKIS G. (2010). Energy and geo-environmental application for Olive Mill Wastes. *A revi*, 45, 269-282.

STOVER C.K., PHAM X.Q., ERWIN A.L., MIZOGUCHI S.D., WARRENER P., HICKEY M.J., BRINKMAN F.S., HUFNAGLE W.O., KOWALIK D.J., LAGROU M., GARBER R.L., GOLTRY L., TOLENTINO E., WESTBROCK-WADMAN S., YUAN Y., BRODY L.L., COULTER S.N., FOLGER K.R., Kas A., Larbij K., LIM R., SMITH K., SPENCER D., WONG G.K., WU Z., PAULSEN I.T., REIZER J., SAIER M.H., HANCOCK R.E., LORY S., OLSON M.V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406, pp 959-964.

SUDJANA AN., D’ORAZIO C., RYAN V., RASOOL N.Ng J., ISLAM N., RILEY TV. & HAMMER KA. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *I. J. Antimicrob. Agents*, 33, 461- 463.

SUDJANA, A. N., CARSON, C. F., CARSON, K. C., RILEY, T. V., ET HAMMER, K. A. (2012). *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. *Medical Mycology*, 50 (8): 863– 870.

SUSALIT E., IDIAGUSB N., EFFENDIA I., TJANDRAWINATAC R.R., PERRINJAQUET MOCCETTID T., VERBRUGGEN M. (2010). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*.

SU X., DUAN J., JIAN Y., SHI J. & KAKUDA Y. (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 348-353.

SAYYAH M., VALIZADEH J., KAMALINEJAD M. (2002) Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole. *Phytomedicine*. **9** : 212-216.

SZENT-GYÖRGYI A. The identification of vitamin C. *Science*. (1938).**87**, 214-215.

SZEWZYK, U., SZEWZYK, R.W. MANZ, W., SCHLEIFER, K.H.; 2000; Microbiological safty of drinking water. *Annual Rev Microbiol*. **54**: 81-127

TANCHEV S., JONCHEVA N., GENOV N., CODOUNIS M. (1980). Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna*, **4**, 5-13.

TAO L. & LAMBERT J.D. (2014). Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer. *Polyphenols in Human Health & Disease*, **2**, 1191-1198.

TAWAHA K., ALALI F.Q., GHARAIBEH M., MOHAMMAD M., EL- ELIMAT T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem*, (in press).

THUILLE N., FILLE M., NAGL M. (2003). Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health*, **206**, 217-221.

TIAN F., LI B., JI B., YANG J., ZHANG, G., CHEN Y. & LUO Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinen sis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, **113**, 173-179.

TOMLIN KL, MALOTT RJ ET AL. (2005) Quorum-sensing mutation affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* bioflims. *Applied and Envirenmental Microbiology*, 5208-5218.

TOMATI U, GALLI E. (1992). In *Humus*, its structure and role in agriculture and environment, *Kuban J. Ed. Elsevier, London*, 117-126.

TOMÁS I, HENDERSON B, DIZ P, DONOS N. 2010. In vivo oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.) ©FORMATEX.

TORRES DE PINEDO A., PEN ALVER P., MORALES J.C. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant: structure-activity relationship. *Food Chemistry*, **103**, 55-61.

TSAO R. and DENG Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B*, **812**, 85-99.

TSUCHIYA H. & IINUMA M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial *sophoraflavanone G* isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, **7**, 161- 5.

UCCELLA, N., (2001). Olive biophenols : biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends Food Science and Technology*. **11**, 315-327.

ULANOWSKA K. (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbial*, **184** (5), 271-8.

ÜNAL K.M. (1994). Polyphénols, o-diphénols et acides phénoliques totaux dans les grignons d'olive et la margines. *OLIVAE*, **15**, 34-35.

USAQUEN-CASTRO X., MARTINEZ-RUBIO M., AYA-BAQUERO H & GONZALEZ-MARTINEZ G. (2006). Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Red-grape (*Vitis vinifera*) Residues. *IUFoST*, 1315- 1324.

VAN LOOSDRECHT, M.C., NORDE, W., ZEHNDER, A.J.B.; 1990; Physical chemical description of bacterial adhesion. *J Biomaterials Appl.* **5**: 91-106

VAN HOUTT R, MICHIELS CW. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156:5-6, pp 626-633.

VASILEIOS ZIOGAS., GEORGIA TANOU B., ATHANASSIOS MOLASSIOTIS A., GRIGORIOS DIAMANTIDIS B., MILTIADIS VASILAKAKIS. (2010). Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry*, **120**, 1097–1103.

VERCAUTEREN J., CHEZE C., TRIAUD J. (1998). Polyphénols. 18th international conference on polyphenols, N°87. Ed. IRNA

VIGNEAU C., (1985). *Plantes médicinales : Thérapeutique- Toxicité*, Ed. Masson, p. 17-19 & p. 222-224

VILLEMUR P & DOSBA F. (1997). Oléiculture : évolution variétale et acquisition de la maîtrise des pratiques culturales : Huile d'olive. OCL, **4** (5), 351-355.

VILLUPANOOR A.P, BHAGEERATHY C, JOHN Z - chemistry of spices - CAB International , India . **2008**

VISIOLI F. & GALLI C. (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, **42** (3), 209–221.

VISIOLI F., CARUSO D., GRANDE S., BOSISIO R., VILLA M., GALLI G., SIRTORI C. & GALLI C. (2004). Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidémie patients. *Eur. J. Clin. Nutr*, **6**, 1-7.

VISIOLI F., ROMANI A., MULINACCI N., ZARINI S., CONTE D., VINCIERI F. et GALLI C. (1999). Antioxidants and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3397-3401.

VISIOLIF. BELLOMOG. GALLIC. (1998) a. Free radical-scavenging properties of olive oilpolyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **247**, 60-64.

VISIOLIF. BELLOSTAS. GALLI C. (1998). Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sciences*, **62**, 541–546.

WAGNER W.L., HERBST D.R., SOHMER S.H. (1999). Manual of the Flowering Plants of Hawai'i. 2 vols. *Bishop Museum Special Publication 83, University of Hawai'i and Bishop Museum Press*, **4**, 1- 9.

WILLIAMSON G. & MANACH C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. *Review of 93 intervention studies. Am J* **255S**.

WINKELHAUSEN E., POSPIECH R. & LAUFENBERG G. (2005). Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, **24**(1), 41-46.

WU D. & CEDERBAUM A. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research and Health*, **27**, 277-284.

XIUZHEN H., TAO S., HONGXIANG L. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, **8**, 950-988.

YAAKOUBI A., CHAHLAOUI A., RAHMANI M., ELYACHIOUI M., OULHOTE Y. (2009). Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agrosolutions*, **20**, 1.

YALA D., MERAD A.S., MOHAMEDI D. & OUAR KORICH M.N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, n° 91.

YAHYA F, LU T, SANTOS R, FRYER P, BAKALIS S - Supercritical carbon dioxide and solvent extraction of 2-acetyl-1-pyrroline Frompandan leaf: The effect of pre-treatment - The journal of supercritical fluids. **2008**.

YAHIAOUI N.(2012). Etude de l'adsorption des composés phénoliques des margines d'olive sur carbonate de calcium, hydroxyapatite et charbon actif. Mémoire de magister, Univ. Tizi Ouzou (ummto), p 23, 25.

YOU-CHENG HSEU., WEN-HUEI CHANG., CHEE-SHAN CHEN., JIUNN-WANG LIAO CHIN-JUNG HUANG., FUNG-JOU LU., YI-CHEN CHIA., HSENG-KUANG HSU., JIA-JIUAN WU., HSIN-LING YANG. (2008). Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 105–114.

YRJÖNEN T. (2004). Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Thèse de Doctorat. Université d'Helsinki. Finlande.

YU R., MANDLEKAR S., TONY KONG A.N. (2000). "Molecular mechanisms of butylated hydroxylanisoleinduced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c". *Molecular Pharmacology*, **58**, 431- 437. EPHE.

ZBAKH H & EL ABBASSI A. (2012).Potential use of mill wastewater in the preparation of functional beverages. *J.funct.foods*, **4**, 53-65.

ZIOGAS V., TANOU G.B., MOLASSIOTIS A.A., DIAMANTIDIS G.B. & VASILAKAKIS M. (2010).Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food. Chem*, **120**, 1097-1103.

Annexe 1. Composition des solutions et milieux de culture utilisés.

Eau physiologique stérile (composition en g/l)

- Chlorure de sodium (NaCl).....9 g.
- Eau distillée.....1000 ml.
- PH=7
- Stérilisation à 120°C/15 mn.

Composition de la Gélose MH (composition en g/l)

- Extraits de viande.....3 g.
- Amidon.....1,5 g.
- Hydrolysa acide de caséine.....17,5 g.
- Agar.....18 g.
- PH=7,4.

Gélose Nutritive (GN) composition en g/l

- Peptone.....10 g.
- Extrait de viande.....3 g.
- Extrait de levure.....3 g.
- Chlorure de sodium.....5 g.
- Agar.....18 g.
- PH=7,3 ± 0,2
- Stérilisation à 120°C/15 min.

Bouillon cœur cervelle (BHIB) composition en g/l

- protéose-peptone 10 g.
- infusion de cervelle de veau12.5 g.
- infusion de cœur de bœuf5 g.
- glucose2 g.
- chlorure de sodium5 g.
- hydrogénophosphate de sodium2.5 g.
- PH=7.4
- Stérilisation à 120°C/15 min.

Tampon phosphate (PBS) composition en g/l

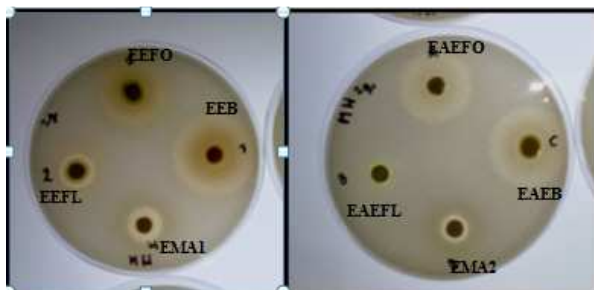
- NaCl8 g.
- KCl.....0.2 g.
- Na₂HPO₄1.44 g.
- KH₂PO₄0.24 g.
- PH=7.5

Cristal Violet composition en g/l

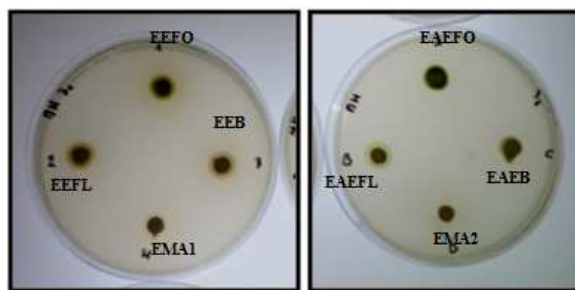
- Poudre de cristal violet.....10 g.

Annexe 2.

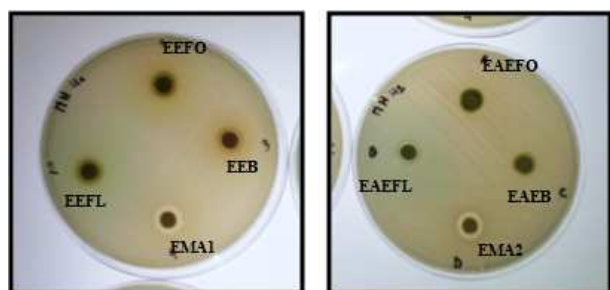
- Photos montrant les zones d'inhibition produites par les extraits de feuille et brindille d'olivier sauvage, feuilles de Laurier et margine.



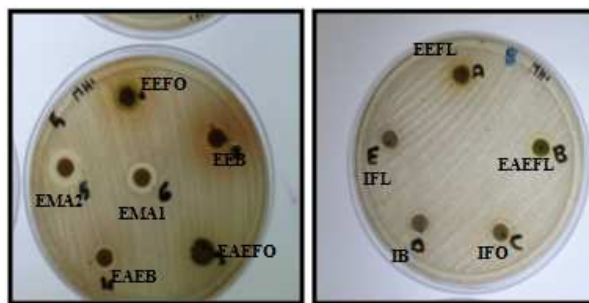
Souche : *B. cereus* ATCC 10876



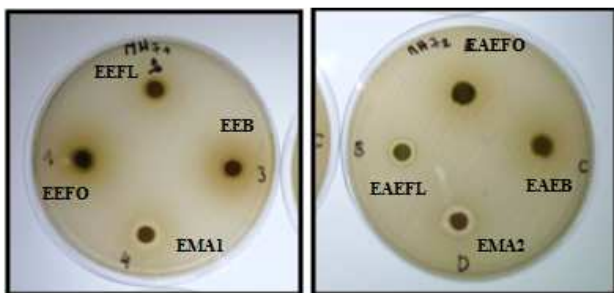
Souche : *E. faecalis* ATCC 0409



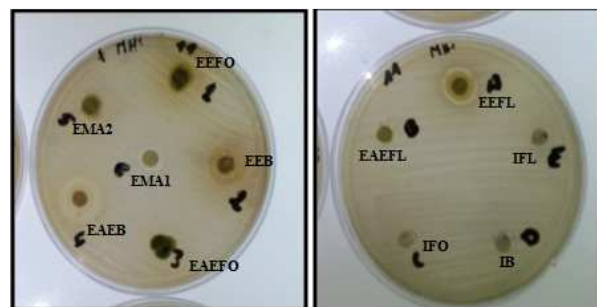
Souche : *P. aeruginosa* ATCC 27853



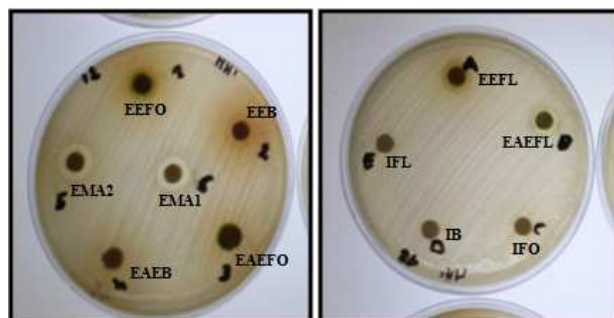
Souche : *P. marginalis* DSM 13124



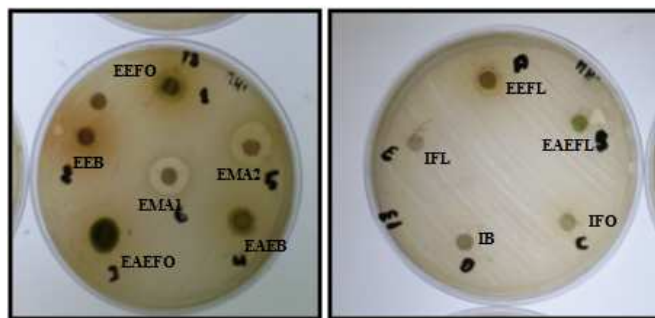
Souche : *K. pneumoniae* ATCC4352



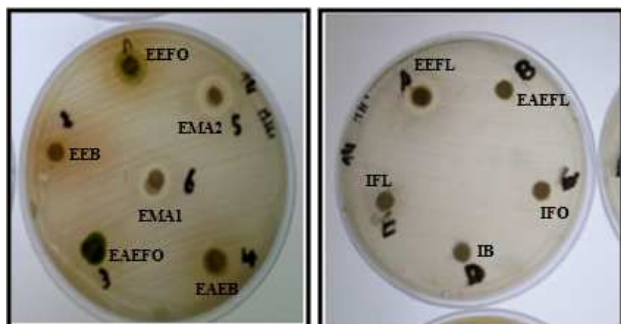
Souche : *S. aureus* ATCC 25923



Souche : *E. coli* ATCC 25322



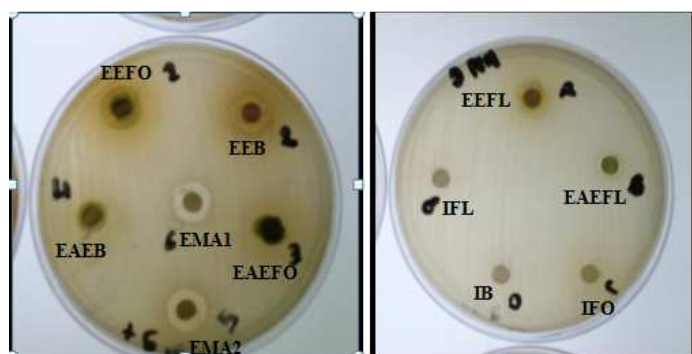
Souche : *B. subtilis* ATCC 6633



Souche : *S. aureus* ATCC 4330

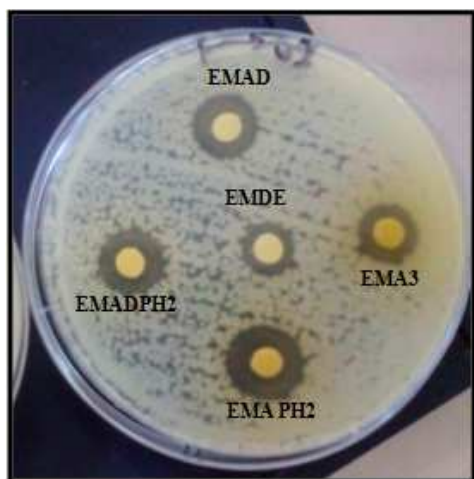


Souche : *K. pneumoniae* ATCC700600

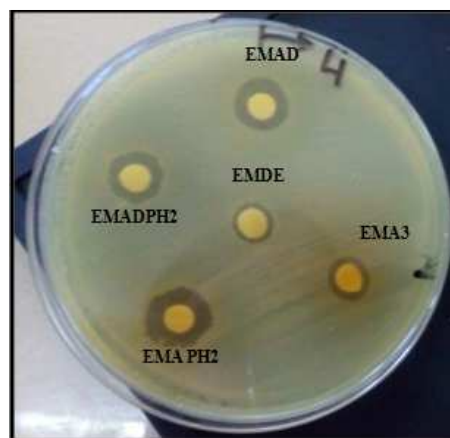


La souche : *B. megaterium* ATCC 9885

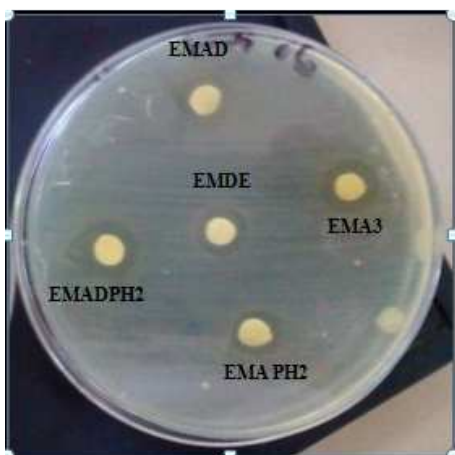
- Photos montrant les zones d'inhibition produites par AT



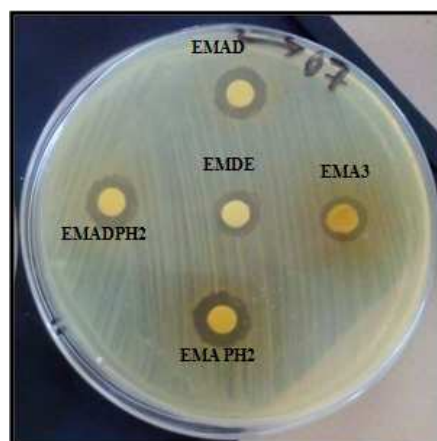
Souche : *B. cereus* ATCC 10876



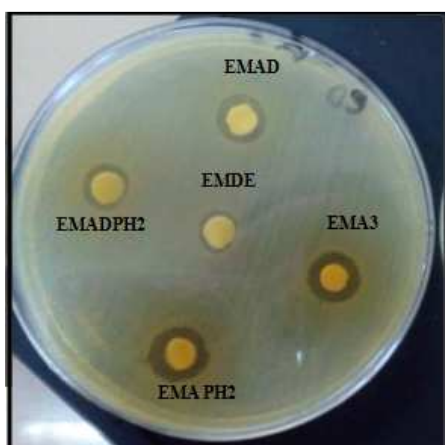
Souche : *P. aeruginosa* ATCC 27853



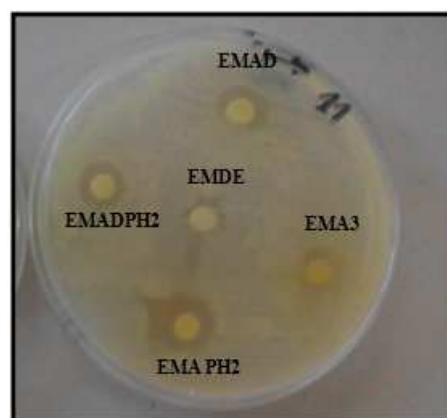
Souche *E. faecalis* ATCC 49452



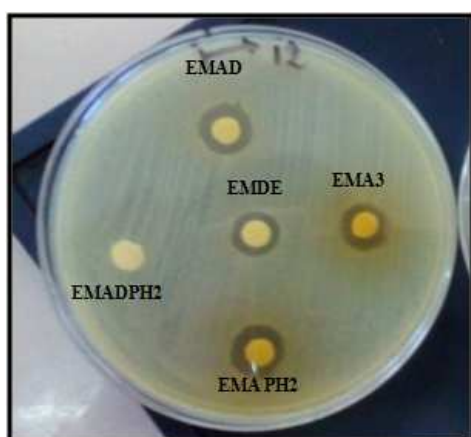
Souche : *K. pneumoniae* ATCC 700600



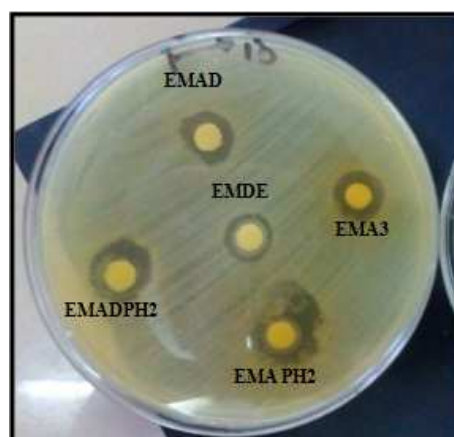
B. megaterium ATCC 9885



Souche : *S. aureus* ATCC 25923



Souche *B. megaterium* ATCC 9885



Souches *B. subtilis* ATCC 6633

