

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



MÉMOIRE

De fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de

Master en Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

SCREENING PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE
DES EXTRAITS BRUTS DES FEUILLES DE L'OLIVIER DE LAPERRINE
(*OLEA EUROPAEA* SUBSP. *LAPERRINEI* *BATT. ET TRAB.*)
SUR NEUF SOUCHES BACTERIENNES

Par : M^r BENRAMDANE Elias

M^{lle} DJOUAB Laetitia

Devant le jury

Président du jury	M ^r HOUALI K.	Professeur UMMTO
Promotrice	M ^{me} LAHCENE S.	Maitre assistante A UMMTO
Examineurs	M ^{me} HELLAL Z.	Maitre assistante A UMMTO
	M ^r SEBBANE H.	Maitre assistant A UMMTO

Année universitaire 2015/2016

REMERCIEMENTS

Nous témoignons notre profonde gratitude au professeur HOUALI K. de l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail en nous faisant l'honneur de présider le jury d'examen, nous le remercions de nous avoir accordé sa confiance et d'avoir mis à notre disposition tous les moyens dans le but de nous faciliter le travail afin de le terminer dans de bonnes conditions.

Nous tenons à témoigner notre sincère et profonde reconnaissance à notre promotrice M^{me} LAHCENE S., de nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux, les nombreuses heures investies dans la correction du présent travail, merci pour toutes les remarques constructives apportées.

Nous remercions M^{me} LAHCENE S. d'avoir mis à notre disposition les photos illustrant le chapitre I.

Nous présentons nos vifs remerciements à Mme HELLAL Z. et Mr SEBBANE H. de nous faire l'honneur et le plaisir d'avoir accepté de prendre de leur précieux temps pour l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance.

Nos remerciements vont également à Mr TITOUCHE Y. et Mr SEBBANE H. de nous avoir fourni les souches microbiennes.

Au cours de ces derniers mois, nous avons eu l'honneur d'être aidé par de nombreux enseignants : Mme GUECHAOUI-MESTAR N., Mr MOUALEK I., Mme ALI AHMED S., Mr MEDJKOUN N., Mme ISSAOUN D., Mr YEZID H., Mr AMROUCHE T., nous les remercions pour leurs conseils et leur gentillesse au quotidien.

Nous remercions les ingénieurs de laboratoire M^{lle} GUENDOUIZI S. et M^{me} BOUANEM M. pour leur aide précieuse.

Enfin, on ne saurait oublier nos familles et nos amis pour leur soutien continu et inconditionnel, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude.

SOMMAIRE

Introduction	1
--------------------	---

PREMIERE PARTIE REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :Généralités sur l'olivier de Laperrine.....	3
1.1.Caractéristiques générales sur l'olivier de Laperrine	3
1.1.1. Systématique et répartition	4
1.1.2. Caractères botaniques	5
1.1.2.1. Appareil végétatif.....	5
1.1.2.2. Appareil reproducteur	6
1.1.3. Caractères génétiques	7
Chapitre II: Les métabolites secondaires et leurs activités biologiques.....	9
2.1. Les polyphénols.....	9
2.1.1. Les terpènes.....	9
2.1.1.1. Les monoterpènes :	9
2.1.1.2. Les sesquiterpènes :.....	9
2.1.2. Les composés phénoliques	10
2.1.2.1. Les acides phénoliques :	11
2.1.2.2. Les flavonoïdes	11
2.1.2.3. Les tanins	11
2.1.2.4. Les lignanes et lignines	11
2.1.3. Les alcaloïdes	12
2.2. Composition chimique de la feuille d'olivier.....	12
2.3. Activités biologiques des composés de feuilles d'olivier.....	12

DEUXIEME PARTIE EXPERIMENTATION

Chapitre III: Matériel et méthodes	15
3.1.Matériel.....	15
3.1.1. Matériel végétal	15

3.1.2. Matériel microbien	15
3.2.Méthodes	15
3.2.1. Méthodes d'extraction	15
3.2.1.1. Extraction aqueuse	15
3.2.1.2. Extraction ethanolique	16
3.2.2. Tests phytochimiques	17
3.2.2.1. Révélation des saponines	17
3.2.2.2. Révélation des tanins.....	17
3.2.2.3. Révélation des anthocyanes	17
3.2.2.4. Révélation des composes réducteurs.....	17
3.2.2.5. Révélation des flavonoïdes	18
3.2.2.6. Révélation des phénols.....	18
3.2.2.7. Révélation des terpénoïdes.....	18
3.2.3. Détermination de l'activité antibactérienne.....	18
3.2.3.1. Coloration de Gram.....	18
3.2.3.2. Préparation de l'inoculum	19
3.2.3.3. Préparation des échantillons.....	19
3.2.3.4. Lecture.....	20
3.2.3.5. Détermination de la CMI	20
3.2.3.5.1. Préparation de l'inoculum bactérien et sa distribution.....	20
3.2.3.5.2. Lecture.....	21
3.2.4. Test statistique	21
Chapitre IV: Résultats et discussion.....	22
4.1. Screening phytochimique.....	22
4.2. Détermination de l'activité antibactérienne.....	24
4.2.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes.....	24
4.2.2. Antibiogrammes.....	26
4.2.3. Test de diffusion sur milieu solide.....	28
4.2.4. Concentration minimale inhibitrice.....	33
Conclusion.....	39
Bibliographie	40
Annexes	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les caractères morphologiques de l'appareil végétatif et reproducteur de l'olivier de Laperrine.....	7
Tableau II : Activités biologiques supplémentaires de l'olivier.....	14
Tableau III: Caractéristiques des bactéries.....	15
Tableau IV : Indications des résultats du test en fonction de l'épaisseur de la mousse.....	17
Tableau V: Préparation de la gamme de concentrations des extraits à tester.....	20
Tableau VI: Résultats qualitatifs du screening phytochimique.....	22
Tableau VII: Résultats des antibiogrammes.....	27
Tableau VIII: Degrés de sensibilité des souches bactériennes testées.....	32
Tableau IX : Résultats de la CMI pour l'extrait aqueux (EA) et ethanolique (EE).....	36

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution naturelle du complexe <i>Olea europaea</i> dans le monde.....	3
Figure 2 : Olivier de Laperrine (Tamanrasset).....	4
Figure 3 : Distribution de l'olivier de Laperrine dans le Sahara.....	5
Figure 4 : Représentation de l'olivier de Laperrine ; A : Taillis ; B : Futaie.....	5
Figure 5 : Feuilles de l'olivier de Laperrine.....	6
Figure 6 : Représentation des fleurs de l'olivier de Laperrine ; I : Inflorescence ; F : Fleur.....	6
Figure 7 : Représentation du fruit de l'olivier de Laperrine ; A : A l'état immature ; B : A l'état mature.....	7
Figure 8 : Exemples de monoterpènes.....	9
Figure 9: Exemples de sesquiterpènes.....	10
Figure 10 : Schéma illustrant les différentes étapes de l'extraction aqueuse et de l'extraction éthanolique.....	16
Figure 11: Résultats du screening phytochimique ; A : Saponines ; B : Flavonoïdes ; C : Tanins ; D : Composés réducteurs ; E : Phénols ; F : Terpénoïdes ; G : Anthocyanes.....	23
Figure 12: Illustration des 3 bactéries Gram+ ; A : <i>B. cereus</i> ; B : <i>S. aureus FRI S6</i> ; C : <i>S. aureus LGA 251</i> , observées au microscope photonique (G×100).....	24
Figure 13: Illustration des 6 bactéries Gram- ; A : <i>P. aeruginosa</i> ; B : <i>E. coli</i> ; C : <i>K. pneumoniae 700600</i> ; D : <i>K. pneumoniae 4352</i> ; E : <i>K. pneumoniae 1766</i> ; F : <i>K. pneumoniae 825</i> , observées au microscope photonique (G×100).....	25
Figure 14 : Histogrammes représentant les diamètres d'inhibition en fonction des concentrations ; A : Extrait aqueux ; B : Extrait éthanolique ; C1 : 0,4 g/ml ; C2 : 0,6 g/ml ; C3 : 0,8 g/ml.....	28
Figure 15 : Résultats du test antibactérien vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus FRI S6</i> , <i>Staphylococcus aureus LGA251</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; Extrait aqueux (EA) et éthanolique (EE) ; C1 : 0,4 g/ml ; C2 : 0,6 g/ml ; C3 : 0,8 g/ml.....	30
Figure 16 : Evolution des diamètres d'inhibition en fonction de la concentration pour ; A : <i>S. aureus FRI S6</i> ; B : <i>S. aureus LGA 251</i> ; C : <i>P. aeruginosa</i> ; EA : Extrait aqueux ; EE : Extrait éthanolique.....	34
Figure 17 : Résultats de la CMI pour ; A : <i>S. aureus FRI S6</i> ; B : <i>S. aureus LGA 251</i> ; C : <i>P. aeruginosa</i> ; EA : Extrait aqueux ; EE : Extrait éthanolique ; de 1 à 13 : Différentes dilutions utilisées ; T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif.....	37

INTRODUCTION

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale.

Ces dix dernières années, le recours à la médecine traditionnelle s'est répandue partout dans le monde et a gagné une popularité importante. Non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans les systèmes de santé (OMS, 2003).

Le manque de médicaments essentiels, l'insuffisance des soins de santé, le coût élevé des médicaments et les habitudes socioculturelles des populations expliquent le recours aux pratiques traditionnelles à base de plantes médicinales (Sanogo, 2006).

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (Maurice, 1997).

Face à l'insatisfaction constatée des remèdes modernes, les pistes phytothérapeutiques traditionnelles semblent renforcer un potentiel intéressant, dont le processus de mise en valeur, de la plante au phyto-médicament, à travers des procédés scientifiques adéquats, pourrait offrir une alternative crédible, en faveur des communautés (Koane et al., 2012).

Aussi, les plantes médicinales contiennent des molécules qui représentent des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, cosmétique, en dermopharmacie, et agroalimentaire. Parmi ces composés, les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés dans le domaine thérapeutique (Anderson et Markham, 2006).

Ce présent travail consiste à évaluer l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*), une plante endémique du Sahara central. En effet, cette sous espèce de l'olivier est largement utilisée par les touaregs à des fins thérapeutiques.

Les objectifs de la présente étude sont :

- Préparation des extraits aqueux et éthanolique des feuilles d'*Olea europaea* subsp. *laperrinei*.
- Révélation qualitative de différents composés que contiennent ces extraits ; saponines, phénols, tanins, composés réducteurs, anthocyanes, terpénoïdes et flavonoïdes.
- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits d'*Olea europaea* subsp. *laperrinei* vis-à-vis de neuf souches bactériennes.

La première partie de ce travail est une synthèse bibliographique qui est articulée autour du chapitre I qui donne les caractères généraux de l'olivier de laperrine et d'un chapitre II qui décrit les métabolites secondaires et leurs activités biologiques.

Un troisième chapitre consiste à présenter le matériel et les méthodes utilisées au cours de la réalisation de ce travail.

Enfin, les résultats obtenus et leurs discussions sont présentés dans le chapitre IV, suivi d'une conclusion générale.

PREMIERE PARTIE
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
GENERALITES SUR L'OLIVIER DE
LAPERRINE

1.1. CARACTERISTIQUES GENERALES SUR L'OLIVIER DE LAPERRINE

L'olivier de Laperrine ou *Olea europaea* subsp. *laperrinei* est une Oleaceae endémique et relique des régions montagneuses du sahara central.

Il représente l'une des six sous-espèces du complexe taxonomique *O. europaea* (Fig. 1) défini par Green (2002) comme suit :

- *Olea europaea* subsp. *europaea*, caractéristique du bassin méditerranéen, dont la variété cultivée (var. *europaea*) est l'olivier et dont les variétés sauvages (var. *sylvestris*) sont désignées sous le nom d'oléastre ;
- *Olea europaea* subsp. *cuspidata*, la sous espèce la plus répandue dans le monde, présente dans toute l'Afrique et dans de nombreuses régions sèches d'Asie, de l'Arabie saoudite jusqu'en Chine (Wall et Don) cif. (1942) ;
- *Olea europaea* subsp. *cerasiformis*, endémique de Madère
- *Olea europaea* subsp. *guanchica*, endémique des îles canaries ;
- *Olea europaea* subsp. *laperrinei*, présente dans les montagnes sahariennes (Batt. et Trab.) cif. (1942) ;
- *Olea europaea* subsp. *marrocana*, représentée par une population isolée du haut Atlas marocain (Greuter et Burdet) Vargas et al. (2001).

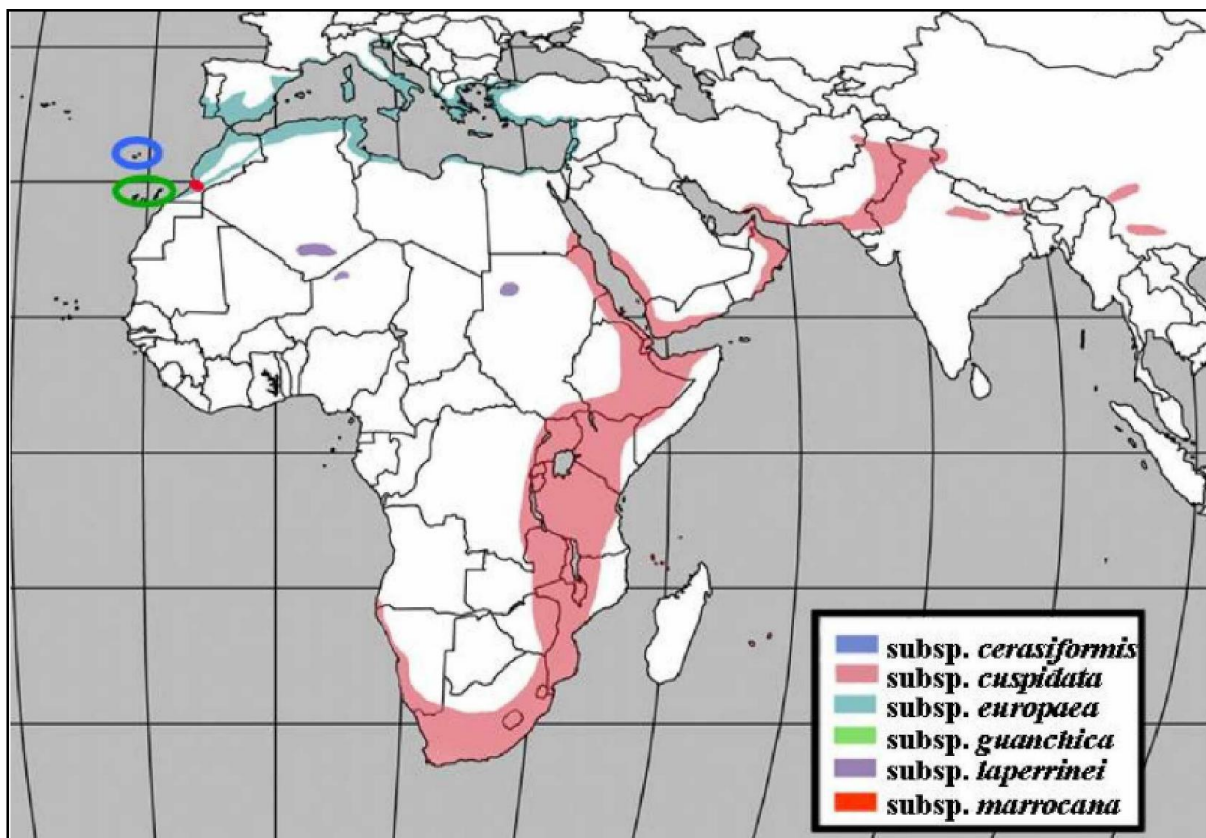


Figure 1 : Distribution naturelle du complexe *Olea europaea* dans le monde (Rubio de Casas et al., 2006)

1.1.1. SYSTEMATIQUE ET REPARTITION

L'olivier de Laperrine, l'Aleo des touaregs, est classé selon Siti et Kotez (2008), de la manière suivante :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotyledones

Sous-classe : Steridees

Ordre : Scrofilariales

Famille : Oleaceae

Genre : *Olea*

Espèce : *O. europaea*

Sous-espèce : *laperrinei*

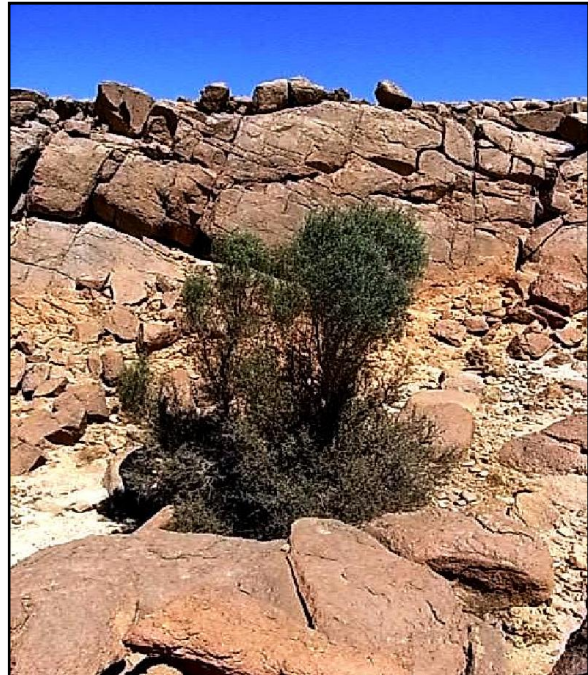


Figure 2 : Olivier de Laperrine (Tamanrasset)

Olea europaea subsp. *laperrinei* (Batt.et Trab.) Cifferi (Fig. 2).

L'olivier de Laperrine est une Oleaceae naturelle présente dans les régions montagneuses en haute altitude (1400 et 2800 m) du Sahara central où les précipitations annuelles sont de 50 à 100 mm (Maire, 1933 ; Benichou, 1962). Il se rencontre souvent au niveau des falaises et des oueds (Quezel, 1997 ; Anthelme et *al.*, 2008)

Selon Benichou (1962), il est rencontré dans trois régions différentes (Fig.3):

- Le Sahara central (Algérie) ; dans toutes les régions montagneuses situées au dessus de 1500m. Il est relativement fréquent dans le massif de l'Ahaggar ; abondant dans les sommets de Tafdest, rare au Tassili des Ajjer et très rare dans le Mouyedir ;
- Le massif d'Aïr au Niger ;
- Le djebel Mara au Soudan.

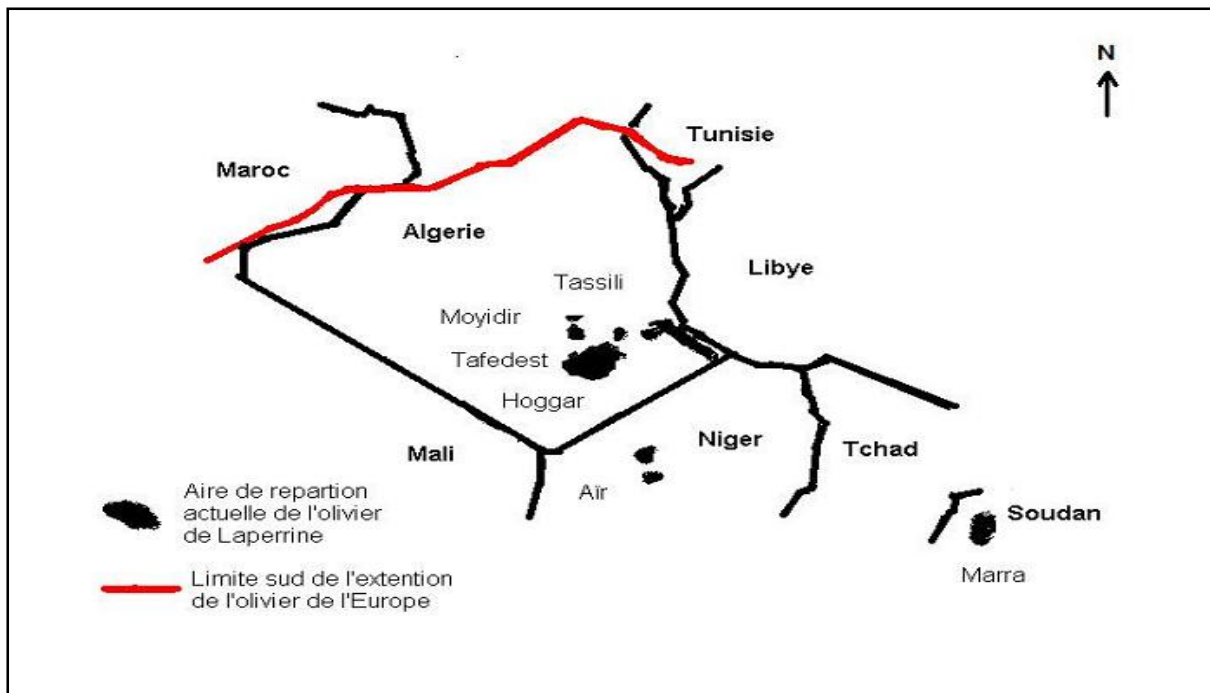


Figure 3 : Distribution de l'olivier de Laperrine dans le Sahara (Quezel, 1962)

1.1.2. CARACTERES BOTANIKUES

1.1.2.1. APPAREIL VEGETATIF

D'après Battendier et Trabut (1911), l'olivier de Laperrine est un arbre représenté en général par des individus dont la taille moyenne varie de 1,5 à 4 m de haut et dont le tronc présente un diamètre de 0,4 à 0,5 m environ (Benichou, 1962).

Cet arbre se trouve le plus souvent à l'état de taillis (Fig.4A), mais peut cependant s'observer à l'état de futaie (Fig.4B) dans certaines stations (Maire, 1933).

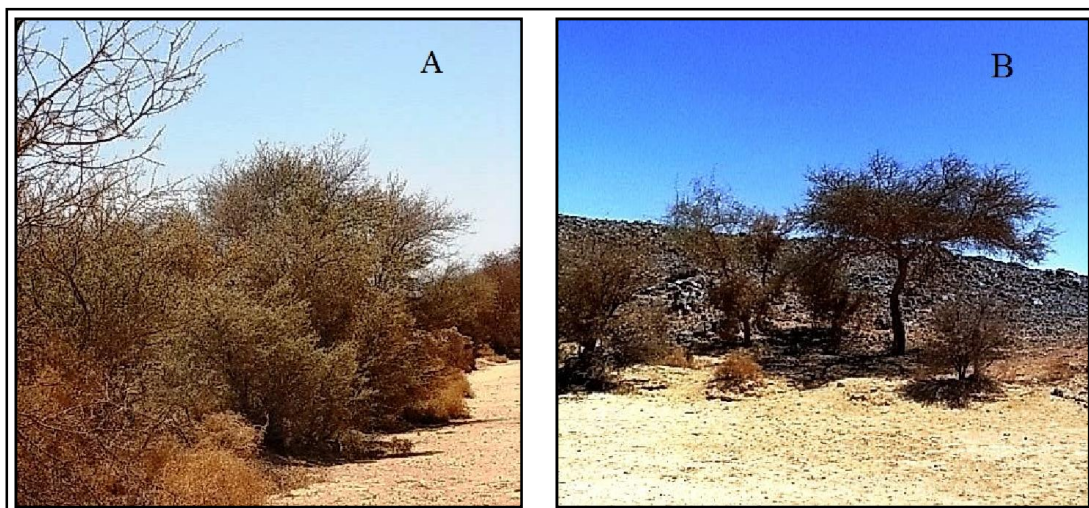


Figure 4 : Représentation de l'olivier de Laperrine (Tamanrasset) ; A : Taillis ; B : Futaie

Les feuilles sont coriaces, entières et opposées. De forme lancéolée-linéaire à linéaire, de 4 à 6 cm de long sur 0,5 à 0,7 cm de large. Elles sont vertes sur la face adaxiale et argentées sur la face abaxiale (Fig.5).

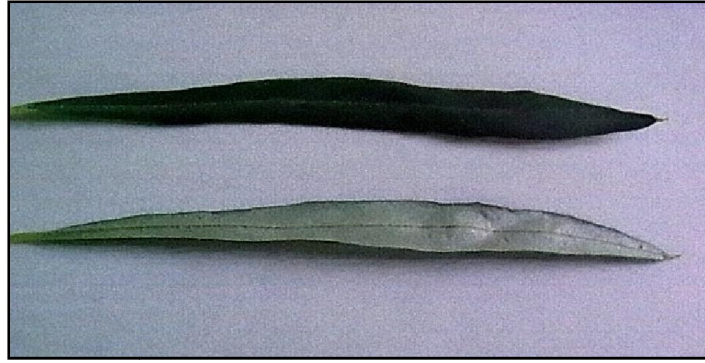


Figure 5 : Feuilles de l'olivier de Laperrine (Tamanrasset)

Le système racinaire de l'olivier s'adapte à la profondeur du sol suivant sa texture.

En effet, selon Loussert et Brousse (1978), le développement des racines est en fonction des caractéristiques physico-chimiques du sol.

1.1.2.2. APPAREIL REPRODUCTEUR

L'inflorescence de l'olivier du sud est caractérisée par une grappe, flexible comportant un axe principale pouvant comporter de 2 à 4 ramifications secondaires. Les fleurs sont de couleur blanchâtre, leur nombre est très variable de 10 à plus de 40 fleurs par grappe (Fig.6).



Figure 6 : Représentation des fleurs de l'olivier de Laperrine (Tamanrasset) ; I : Inflorescence ; F : Fleur

Le fruit est une drupe, de forme ovoïde globuleuse et de couleur marron à noire.

A maturité, l'épicarpe passe de la couleur vert tendre (Fig.7A) à la couleur noirâtre (Fig.7B). L'endocarpe est constitué par un noyau très dur.

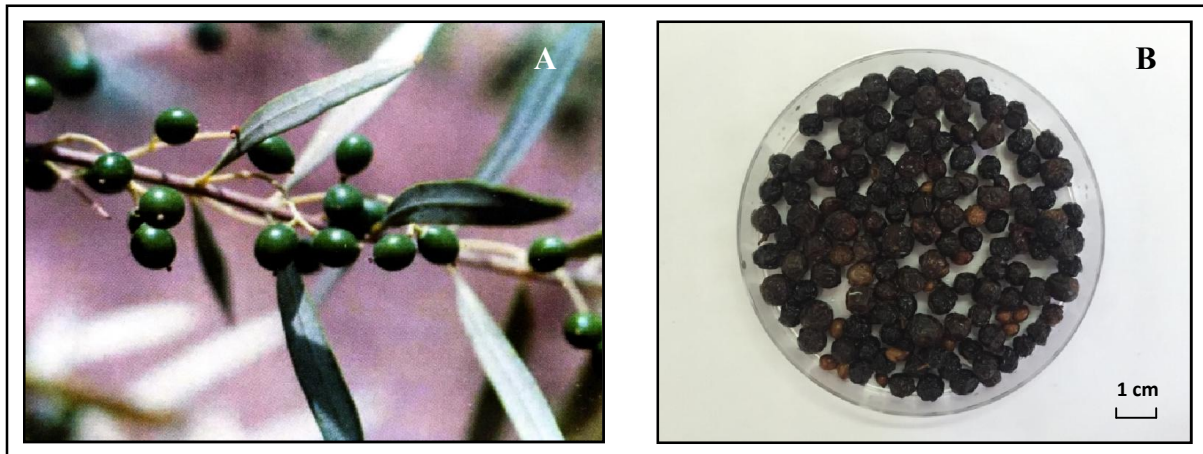


Figure 7 : Représentation du fruit de l'olivier de Laperrine ; A : A l'état immature (Sahki *et al.*, 2004) ; B : A l'état mature

Baali-Cherif (2007), résume les caractères morphologiques de l'appareil végétatif et reproducteur de l'olivier du sud dans le tableau I suivant :

Tableau I : Les caractères morphologiques de l'appareil végétatif et reproducteur de l'olivier de Laperrine

	Rameaux	Feuilles									
		Caractères généraux	Forme	Couleur		Nervure centrale	Taille en (cm)				
				Face adaxiale	Face abaxiale		Longueur	Largeur	Largeur Pétiole		
Caractères morphologiques végétatifs	Grêles flexibles, peu fournis-en-feuilles	Entières terminées en mucron ou obtuse sans stipules, glabres, persistantes en disposition opposées dans le rameau.	Etroite et linéaire	Verte	Argentée	Plate	4 - 6	0,5 - 0,7	0,2 - 0,3		
Caractères morphologiques et reproducteurs	Inflorescence (grappe)			Fleurs				Fruit			
	Longueur (cm)	Nombre de grappes par Rameau	Nombre de fleurs par grappe	Couleur	Diamètre corolle (mm)	Longueur pédoncule (mm)	Epaisseur (mm)		Forme	Poids sec (g)	Dimension Lx (mm)
							pulpe	endocarpe			
	2 - 4	6 - 10	8 - 6	Blanche	4 - 5	1 - 1,17	0,6 - 1	0,15 - 0,30	Ovoïde globuleuse	0,006 - 0,008	4-6

1.1.3. CARACTERES GENETIQUES

Des études menées par Baali-cherif et *al.* (2007) sur différents aspects biologiques (biogéographie, caractères botaniques, histo-anatomiques, écologiques et caractérisation moléculaire), montrent que l'olivier du sud et l'olivier du nord Algérien sont phénotypiquement et génétiquement différenciés, bien qu'ils soient sexuellement comparables.

Des analyses phytogéographiques ont montré que les peuplements d'*Olea europaea* subsp. *laperrinei* présentent des affinités avec les oliviers des régions méditerranéennes et sub-sahariennes, mais la différenciation génétique élevée entre populations indique que les flux de gènes entre massifs sont faibles, voir inexistants, depuis une longue période. Ceci est dû au fait que l'olivier de Laperrine soit confiné dans les régions montagneuses du Sahara et donc isolé des autres taxons du complexe *Olea europaea* (Besnard et *al.*, 2012). Cependant, et selon le même auteur, des croisements entre *Olea europaea* subsp. *laperrinei* et *Olea europaea* sont rapportés.

Dans l'étude de génétique des populations effectuée sur les massifs du sud de l'Algérie et du nord du Niger (Besnard et *al.*, 2007), il est apparu que les populations du Hoggar présentent une très forte diversité génétique comparées aux populations du Tassili et du Niger (Tamgak et Bagzane).

Une forte différenciation génétique entre les arbres de ces différents massifs montagneux a été également mise en évidence. Les barrières désertiques ont donc joué un grand rôle dans la dissémination des gènes entre ces montagnes. D'après cette étude, le massif du Hoggar pourrait être la région d'origine de l'olivier de Laperrine (Besnard et *al.*, 2007).

En outre, une polyploïdie a été observée dans deux sous-espèces menacées de l'olivier : *maroccana* et *cerasiformis* (Besnard, 2009). L'origine de ce phénomène reste encore mal documentée.

Dans une étude de Besnard et Baali-cherif (2009), 106 génotypes d'une population relique de l'olivier de Laperrine du Hoggar ont été étudiés à l'aide de huit microsatellites nucléaires.

Des profils de type diploïde et triploïde ont été mis en évidence. Une analyse de cytométrie en flux a confirmé que les individus avec trois allèles à plusieurs types de ploïdie peuvent coexister dans une même population d'olivier.

Les génotypes triploïdes, vraisemblablement en moyenne plus vigoureux que les diploïdes, seraient positivement sélectionnés en l'absence de régénération par voie sexuée sur de très longues périodes, expliquant leur relative haute fréquence dans la population étudiée (Besnard et Baali-cherif, 2009).

CHAPITRE II

**LES METABOLITES SECONDAIRES ET
LEURS ACTIVITES BIOLOGIQUES**

INTRODUCTION

Historiquement, les composés produits par les plantes ont été séparés en métabolites primaires et secondaires. Par définition, les métabolites primaires sont des molécules présentes dans toutes les cellules végétales et nécessaires à la vie de la plante. Les sucres simples, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques sont des exemples de métabolites primaires. D'autre part, les métabolites secondaires ont une répartition limitée dans la plante.

Les métabolites secondaires ne se trouvent que dans des tissus ou organes particuliers ou à des stades précis de développement (Hopkins, 2003). Ils sont synthétisés en réponse aux contraintes de l'environnement et permettent à la plante de se défendre contre les pathogènes, les prédateurs...etc. (Morot, 2009).

Les métabolites secondaires se divisent en trois classes majeurs ; les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes.

2.1. LES POLYPHENOLS

2.1.1. LES TERPENES

Les composés terpéniques ou terpénoïdes ou encore isoprénoïdes, sont des composés issus de la condensation d'unités de base de 5 carbones de type isoprène.

Les terpénoïdes sont stockés dans les vacuoles au niveau de l'écorce, des épines, des racines et des feuilles.

2.1.1.1. LES MONOTERPENES

Les monoterpènes (Fig.8) sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée selon Padua et *al.* (1999) dans les huiles essentielles (90%). Ils comportent selon le mode de couplage « tête-queue » deux unités isoprène (C_5H_8). Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques.

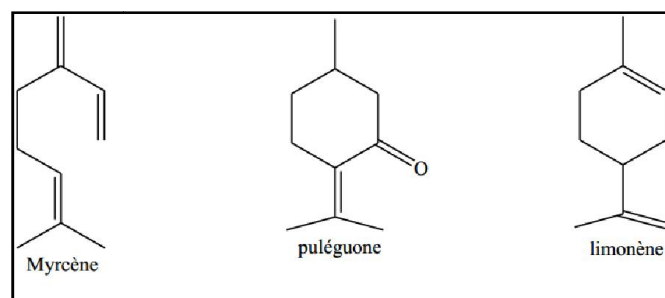


Figure 8: Exemples de monoterpènes (Collin et Crouzet, 2011)

2.1.1.2. LES SESQUITERPENES

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ résultant de l'assemblage de trois unités isoprènes (Fig. 9).

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales ; ce sont les catégories acycliques, monocycliques, bicycliques,

tricycliques et polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature.

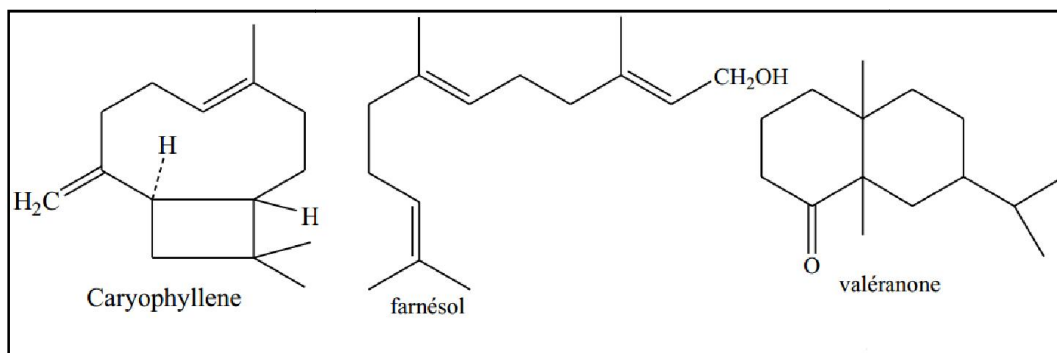


Figure 9: Exemples de sesquiterpènes (Collin et Crouzet, 2011)

2.1.2. LES COMPOSES PHENOLIQUES

Les composés phénoliques sont représentés par toute substance chimique possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (Hopkins, 2003).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (Yusuf, 2006).

Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B, depuis les simples acides phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes que sont par exemple les flavonoïdes, les coumarines, les lignines et les tanins (Morot, 2009), reliés par un hétérocycle de type pyrane.

Ces composés diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature de la liaison hétérosidique.

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (Macherix et Fleuriet, 2005).

Selon Bruneton (1999), cette vaste famille regroupe des composés non azotés présentant des cycles aromatiques, le plus souvent solubles dans l'eau et présents sous forme de glucoconjugués. Ils sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie des shikimates et celle de l'acétate (Annexe 1).

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulier.

La famille de phénols comprend de petits composés biologiquement actifs comme l'acide salicylique et certains isoflavones, ainsi que des composés antinutritionnels comme les

tanins et la lignine, un polymère de haut poids moléculaire formé à partir d'unités dérivées de l'acide cinnamique.

Les composés phénoliques sont classés en fonction du nombre d'atomes de carbone du squelette de base. Ces structures peuvent être sous forme libre ou liée à un ester ou sous forme d'hétérosides (Bruneton, 1999). Ainsi on distingue :

2.1.2.1. LES ACIDES PHENOLIQUES

Ils se divisent en deux catégories ; les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique.

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque. Ils sont particulièrement bien représentés chez les gymnospermes et les angiospermes et ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal (Ribereau-Gayon, 1968).

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante, ils sont très largement répandus chez les végétaux.

2.1.2.2. LES FLAVONOÏDES

L'ensemble des flavonoïdes de structure générale C15, comprend plusieurs milliers de molécules. Ces dernières sont groupées selon Bruneton (1993), d'après le degré d'oxydation du noyau pyranique central, en une dizaine de classes, qu'on peut répartir en trois familles, ce sont :

- les flavonoïdes au sens strict qui correspondent aux pigments végétaux jaune orange, renfermant les flavones, flavonols, flavonones, dihydroflavonols et les flavonoïdes jaunes (chalcones et aurones).
- Les isoflavonoïdes dont la distribution est limitée aux fabaceae.
- Les anthocyanes sont des molécules capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange.

2.1.2.3. LES TANINS

Ils se retrouvent dans toutes les parties des végétaux (écorce, feuilles, racines, fruit...) et ils jouent un rôle défensif contre certains parasites (nématodes). En industrie ils sont utilisés dans le tannage du cuir.

2.1.2.4. LES LIGNANES ET LIGNINES

Les lignanes proviennent de la condensation de deux molécules phénoliques de type monolignol comme l'alcool coniférylique. Ils sont généralement impliqués dans la défense des plantes contre les agressions extérieures.

Les lignines résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois molécules de base dénommées monolignols et qui sont des alcools ρ -coumaryliques, coniféryliques et sinapyliques (Macherix et Fleuriet, 2005).

2.1.3. LES ALCALOÏDES

Ce sont des composés azotés faiblement basiques qui précipitent avec des réactifs iodométalliques et qui sont biologiquement actifs.

Ce sont des molécules d'origine naturelle que l'on trouve principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains micro-organismes. Il existe plus de 6000 alcaloïdes répertoriés, ce chiffre est en constante augmentation (Judol et *al.*, 2002).

La quinine et la cocaïne sont des exemples d'alcaloïdes, on retrouve également des molécules anticancéreuses comme la vincristine et le toxol, des molécules utilisées comme poison (strychnine) et des stimulants (caféine).

2.2. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FEUILLE D'OLIVIER

Les feuilles fraîches d'olivier sont caractérisées par une matière sèche moyenne de 50%.

Leur composition chimique varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations (Nefzaoui, 1995 *in* Aouidi, 2012).

Les feuilles sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tels que les tannins) et principalement par des polysaccharides (tels que la cellulose, l'hémicellulose).

Leur teneur en protéine est faible et la composition en acides aminées est particulièrement diversifiée. Concernant leur composition en minéraux, le fer est le plus abondant dans les feuilles avec une concentration de 273 g/kg de matière sèche.

2.3. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES COMPOSES DE FEUILLES D'OLIVIER

L'olivier possède des facultés thérapeutiques exceptionnelles, de nombreuses activités ont été attribuées à la plupart de ses composants phénoliques qui permettent la guérison et la prévention contre certaines maladies. Ils agissent comme des agents antioxydants, anti-inflammatoires, antiviraux et anti-cancérogènes (Visioli et *al.*, 2002).

Toutes les parties de l'arbre servent à guérir : le fruit, la feuille, la fleur, l'écorce et l'huile d'olive. Cependant, seuls les extraits de feuilles d'olivier et l'huile d'olive extra vierge (acidité <1%) sont considérés comme une source importante de ces composants (Visioli et Galli, 2002).

Les polyphénols de l'olivier ont une énorme capacité à piéger les radicaux libres et montrent un comportement synergique lorsqu'ils sont combinés, ce qui se déroule naturellement dans les feuilles d'olivier et donc dans leurs extraits (Polzonetti et *al.*, 2004).

Parmi ces polyphénols, l'hydroxytyrosol et tyrosol qui contribuent au goût amer, astringence et à la résistance à l'oxydation (Visioli et Galli, 2002).

Les feuilles d'olivier ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels dans les pays européens et méditerranéens. Elles ont été utilisées dans l'alimentation humaine sous forme d'extrait, de poudre et de tisane (Karayaka, 2009).

Les feuilles d'*Olea europaea* sont utilisées pour faire des lotions pour les yeux des humains et des animaux dans de nombreuses régions d'Afrique (Boukhebti et *al.*, 2015).

Elles contiennent plusieurs composés bioactifs (Wainstein et *al.*, 2013) dont les quantités varient en fonction de plusieurs facteurs : la physiologie végétale, les conditions environnementales, principalement les éléments disponibles dans le sol et l'âge de la feuille (Perrinjaquet-Mocchetti et *al.*, 2008).

Dans la médecine traditionnelle, l'olivier est utilisé comme un diurétique, hypotenseur, émoullient, fébrifuge et tonique (Boukhebti et *al.*, 2015).

Par leurs pouvoirs antimicrobiens et antiviraux (Lee et *al.*, 2010 ; Micol et *al.*, 2005), les feuilles traitent les affections causées par ou associés à un virus, un rétrovirus, une bactérie ou un protozoaire.

Parmi ces pathologies traitées, nous citons: la grippe, le rhume, les infections dûes aux candidas, la méningite, l'encéphalite, le VIH, la fatigue chronique, l'hépatite B, la pneumonie, la tuberculose, la malaria, la diarrhée sévère, les infections des voies urinaires, les infections bactériennes, les infections des voies intestinales et respiratoires chez l'homme (Bisignano et *al.*, 1999), les troubles inflammatoires, l'hypertension et le diabète, le cholestérol, les douleurs dentaires et les ulcères gastriques.

Comme antioxydant (Lee et Lee, 2010 ; Bao et *al.*, 2007), l'extrait de feuilles d'olivier protège les vaisseaux sanguins et améliore la circulation sanguine. Il a été montré qu'il peut être efficace dans la protection du cœur lors d'une occlusion coronaire. Les feuilles et l'huile d'olive diminuent l'incidence des maladies du cœur (Cook et Samman, 1996).

Il est efficace contre l'hypertension (Susalit et *al.*, 2011). Il a été démontré que les feuilles possèdent des propriétés anti-cancérogènes (Bouallagui et *al.*, 2011). Outre, leur richesse en flavonoïdes on leur attribue la propriété radio-protective (Castillo et *al.*, 2010).

Par leurs effets sur certains enzymes métaboliques, les feuilles possèdent des propriétés anti-lipidémique et sont aussi indiquées pour le traitement des diabètes.

Les feuilles d'olivier possèdent une forte capacité à piéger les radicaux libres par rapport aux différentes parties de l'arbre, elles présentent aussi une concentration importante en composants à haute valeur (Savournin et *al.*, 2001).

L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète rencontrées au cours de la grossesse ou en cas d'obésité (Ghedira, 2008).

De plus, les acides gras mono-insaturés disponibles dans les feuilles, tels que l'acide oléique, diminuent les lipides du plasma dont les LDL et VLDL et préviennent des maladies cardio-vasculaires (Huang et *al.*, 2011). L'extrait de feuilles d'olivier peut contenir des traces d'éléments vitaux tels que le sélénium, le fer, le zinc, la vitamine C, la β -carotène et une grande partie d'acides aminés (Polzonetti et *al.*, 2004).

Les feuilles contiennent aussi du cinchonidine, un alcaloïde quinoléique aux propriétés antipaludiques.

Les feuilles, l'écorce et les fruits contiennent l'oleuropéine qui possède des activités antioxydantes, hypotensives, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes et antiseptiques (Ghedira, 2008).

D'autres activités notables sont résumées dans le tableau II suivant :

Tableau II : Activités biologiques des feuilles de l'olivier (*Olea europaea L.*)

Activités	Références
Activité anti-fongique	Korukluoglu et <i>al.</i> , 2008
Activité gastro-protective	Dekanski et <i>al.</i> , 2009
Activité anti-athérogène (prévention contre l'athérosclérose)	Somova et <i>al.</i> , 2003
Activité hypo-lipidimique	Jemai et <i>al.</i> , 2008
Activité anti-allergique	Masataka et <i>al.</i> , 2007 (brevet)
Activité analgésique (activité anti-nociceptive)	Esmaeili-Mahani et <i>al.</i> , 2010
Activité neuro-protective	Mohagheghi et <i>al.</i> , 2011
Activité anti-cardiovasculaire	Singh et <i>al.</i> , 2008 ; Fonolla et <i>al.</i> , 2010 ; Scheffler et <i>al.</i> , 2008
Activité vaso-active (contre les maladies cardiovasculaire)	Rauwald et <i>al.</i> , 1994
Activité vasodilatateur	Zaruelo et <i>al.</i> , 1991
Activité anti-leucémique (effet anti-prolifératif des cellules leucémiques humaines)	Abaza et <i>al.</i> , 2007
Action antvieillissement	Akemi et <i>al.</i> , 2001 (brevet) ; Tadashi, 2006 (brevet) ; Thomas et <i>al.</i> , 2006

DEUXIEME PARTIE
EXPERIMENTATION

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

3.1. MATERIEL

3.1.1. MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal utilisé au cours de l'expérimentation est représenté par des feuilles prélevées sur des pieds mère adultes de la station de Tamanrasset en été 2015. Les feuilles récoltées sont séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité. Elles sont par la suite coupées finement et broyées au moulin électromécanique ; la poudre qui en résulte sert de support à nos extractions.

3.1.2. MATERIEL MICROBIEN

Le test antimicrobien est effectué sur neuf souches bactériennes ; ce sont ; *Staphylococcus aureus* FRI S6, *Staphylococcus aureus* LGA251 mec C, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700600, *Klebsiella pneumoniae* ATCC4352, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1766, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 825, dont les caractéristiques sont représentées par le tableau III.

Tableau III: Caractéristiques des bactéries

	Numéro de référence	Origine	Gram
B1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	ATCC, collection USA	+
B2	<i>Staphylococcus aureus</i> FRI S6	Collection FRI USA	+
B3	<i>Staphylococcus aureus</i> LGA 251 mec C	-----	+
B4	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ATCC, collection USA	-
B5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ATCC, collection USA	-
B6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700600	ATCC, collection USA	-
B7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	ATCC, collection USA	-
B8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 1766	CHU Nedir Mohammed Tizi-Ouzou	-
B9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 825	CHU Nedir Mohammed Tizi-Ouzou	-

3.2. METHODES

Les procédés d'extraction des composés phénoliques à partir du matériel végétal représentent une étape préalable à toute analyse phytochimique. Leur grande diversité structurale implique une grande variabilité des propriétés physicochimiques et par conséquent différentes techniques d'extraction et d'isolement des polyphénols (Vercautern, 1996).

Dans le cadre de ce travail, deux procédés d'extraction sont testés ; ce sont l'extraction aqueuse et l'extraction éthanolique.

3.2.1. METHODES D'EXTRACTION

Nous avons adopté les protocoles d'extraction mis au point au laboratoire d'analyses biochimiques (LABAB) du professeur Houali K.

3.2.1.1. EXTRACTION AQUEUSE

Cette extraction consiste à dissoudre 20 grammes de poudre végétale dans 200 ml d'eau distillée. La phase aqueuse du macérât est par la suite filtrée et congelée avant d'être lyophilisée. Le lyophilisat est conservé à 4°C en vue de son utilisation.

3.2.1.2. EXTRACTION ETHANOLIQUE

Nous procédons de la même manière que pour l'extraction aqueuse, en effet, 20 grammes de poudre végétale sont mis à macérer dans 200 ml d'éthanol. Le filtrat ethanolique obtenu est mis à évaporer à l'obscurité et à l'abri de l'humidité. Le résidu sec résultant est repris dans de l'eau distillée, congelé avant d'être lyophilisé.

Les différentes étapes de ces extractions sont résumées dans la figure 10.

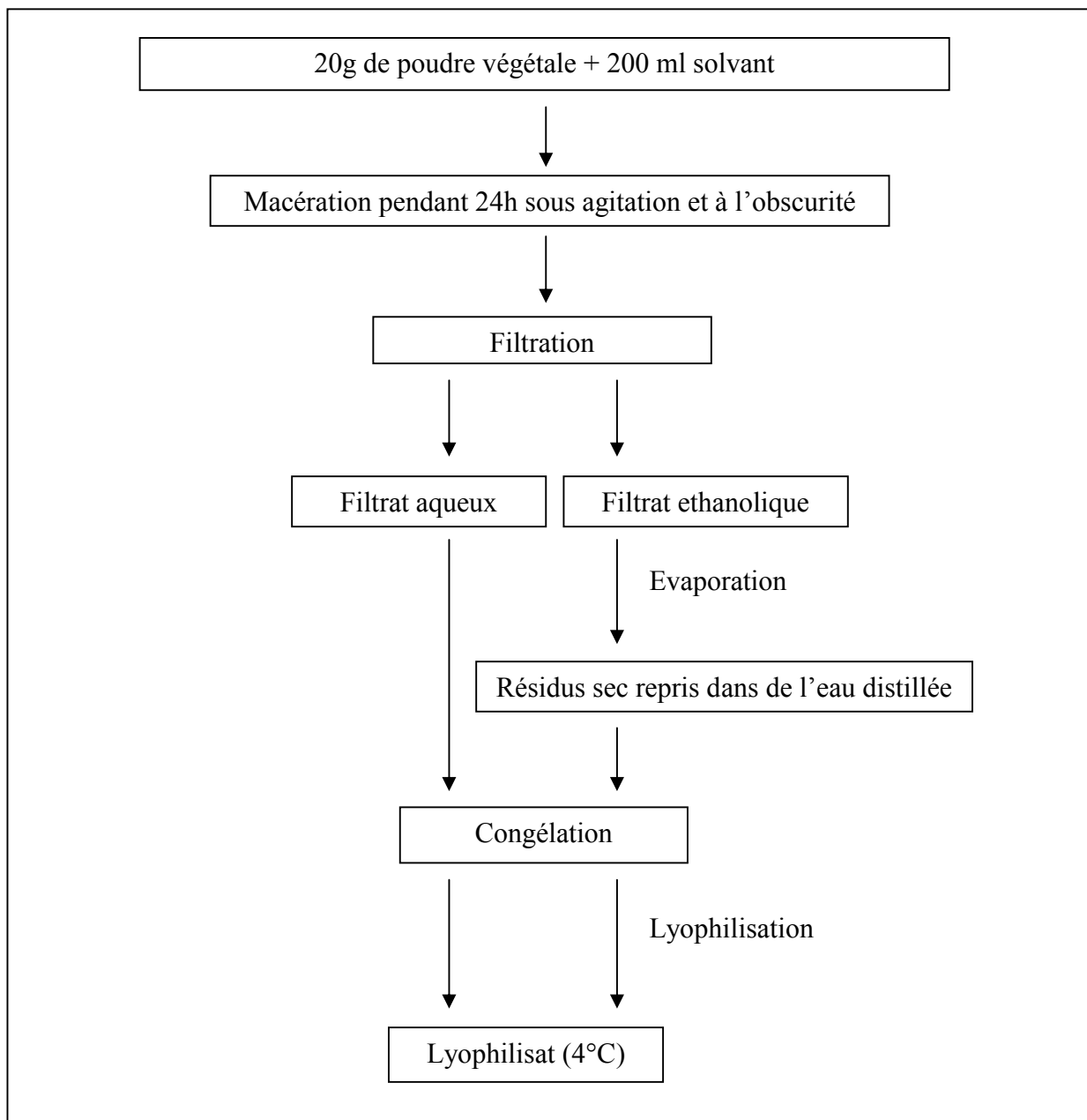


Figure 10 : Schéma illustrant les différentes étapes de l'extraction aqueuse et de l'extraction ethanolique

3.2.2. TESTS PHYTOCHIMIQUES PRELIMINAIRES

Ces tests consistent à détecter les composés chimiques présents dans les extraits aqueux et ethanologique obtenus à partir de la poudre des feuilles de l'olivier de Laperrine.

Ils sont basés sur la formation de complexes insolubles (réaction de précipitation) ou sur la formation de complexes colorés (réaction de coloration).

Le screening phytochimique est réalisé sur les extraits bruts, ayant une concentration de 0,4 g/ml, obtenus après l'étape de lyophilisation (Annexe 2).

3.2.2.1. REVELATION DES SAPONINES

Les saponines sont révélés par un indice de mousse (Bruneton, 1999). Leur détection est réalisée en ajoutant à 2 ml d'extrait, 1 ml d'eau distillée. Après une forte agitation, le mélange est mis à décanter pendant 20 minutes et la teneur en saponines est évaluée par la mesure de la couche de mousse persistante en centimètres.

Tableau IV : Indications des résultats du test en fonction de l'épaisseur de la mousse

	Epaisseur	Résultats
Tests	Pas de mousse	Test négatif-
	Mousse 1cm	Test faiblement positif+
	Mousse 1-2 cm	Test positif++
	Mousse 2 cm	Test très positif+++

3.2.2.2. REVELATION DES TANINS

On ajoute une à deux gouttes de chlorure ferrique $FeCl_3$ (2%) à un tube contenant 1 ml d'extrait et 1 ml d'eau distillée. L'apparition d'une coloration vert foncé ou bleu vert indique la présence des tanins (Trease et Evans, 1987).

3.2.2.3. REVELATION DES ANTHOCYANES

Les anthocyanes sont détectés en ajoutant à 2 ml d'extrait, 2 ml d'acide chloridrique (2N) et quelques gouttes d'ammoniaque. Une coloration rouge ou rose qui vire au bleu violacé après addition de l'ammoniaque indique la présence des anthocyanes.

Un deuxième procédé phytochimique est testé, il consiste en un mélange de 1 ml d'extrait, 1 ml d'acide sulfurique à 10% et 1 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH). Une coloration bleue confirme la présence des anthocyanes dans les extraits testés.

3.2.2.4. REVELATION DES COMPOSES REDUCTEURS

On traite 1 ml d'extrait avec 1 ml d'eau distillée et 20 gouttes de liqueur de Fehling (Annexe3). Le mélange est incubé à 80°C. Un test positif est révélé par l'apparition d'un précipité rouge brique (Trease et Evans, 1987).

3.2.2.5. REVELATION DES FLAVONOÏDES

Le protocole mis au point par Bruneton (1993), consiste à ajouter à 5 ml d'extrait 1 ml d'acide chloridrique concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. L'apparition au bout de 3 mn d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

Pour nos extraits nous avons confirmé la présence des flavonoïdes par un deuxième test phytochimique au niveau duquel on mélange 5 ml d'extrait solubilisé dans de l'éthanol à 5 ml de solvant éthanolique et 5 ml de KOH (50%). L'apparition d'une coloration jaune correspond à un test positif.

3.2.2.6. REVELATION DES PHENOLS

Le test consiste à ajouter à 2 ml d'extrait, une goutte d'une solution éthanolique de chlorure ferrique (2%). La présence des phénols est mise en évidence par une coloration bleue noirâtre ou vert foncé.

3.2.2.7. REVELATION DES TERPENOÏDES

Les terpénoïdes sont mis en évidence par une coloration brune rougeâtre qui apparaît à la suite du mélange de 1 ml d'extrait à 1 ml d'anhydride acétique et 2 ml d'acide sulfurique concentré.

3.2.3. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

L'objectif de cette étude est de déterminer la capacité des différents extraits à inhiber la croissance des souches bactériennes par la méthode de diffusion sur milieu solide (méthode des disques).

Des disques de papier Whatman n°1 de 6 mm de diamètre sont déposés sur milieu solideensemencé à partir des souches à tester. La diffusion des extraits dans la gélose va permettre l'inhibition de la croissance des germes dans le cas d'une éventuelle activité antibactérienne ; cette dernière se traduit après incubation par une auréole claire autour des disques appelée halo ou zone d'inhibition.

La méthode suivie est validée par le laboratoire pédagogique de microbiologie à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

3.2.3.1. COLORATION DE GRAM

Cette coloration permet de différencier entre les deux types de bactéries (Gram+ et Gram-), selon la capacité des différentes structures de la paroi bactérienne à retenir le colorant violet de Gentiane. D'après Bergey et *al.* (1994), elle est réalisée selon les étapes suivantes :

La Préparation des frottis se fait comme suit :

- Déposer sur une lame une goutte d'eau physiologique stérile;
- Prélever, dans la zone stérile, une fraction de culture et l'incorporer à la goutte d'eau pour obtenir une suspension homogène;
- Sécher et fixer les bactéries à la chaleur au dessus de la flamme du bec bunsen;

Alors que la coloration se fait selon les étapes suivantes :

- Recouvrir la lame avec le violet de Gentiane, laisser agir une minute;
- Ajouter une solution de lugol et laisser agir 45 secondes (étape réalisée en deux fois);
- Décolorer la lame à l'éthanol (70°) pendant 30 secondes à température ambiante puis rincer à l'eau distillée;
- Recouvrir avec la fuschine ou la safranine et laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée;
- Sécher la lame et observer à l'huile d'immersion, au grossissement $\times 100$.

Une coloration rose indique des bactéries Gram-, tandis qu'une coloration violette indique des bactéries Gram+.

3.2.3.2. PREPARATION DE L'INOCULUM

3.2.3.2.1. PREPARATION DE LA PRE-CULTURE

Les tests antibactériens sont réalisés à partir de cultures jeunes (18h), en phase de croissance exponentielle. La revivification des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne sur un milieu liquide représenté par le BHIB (Annexe 3).

Après une incubation de 24h à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de pétri contenant le milieu MH puis incubées à 37°C.

3.2.3.2.2. PREPARATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE

La préparation des suspensions bactériennes est effectuée selon le protocole suivi par Djenane et *al.* (2012).

A partir de cultures jeunes sur gélose, on prélève quelques colonies bien isolées dans l'eau physiologique stérile. Après homogénéisation du mélange, la standardisation de la suspension à 10^8 UFC/ml, correspondant à une DO comprise entre 0.08 et 0.1 est réalisée à la longueur d'ondes de 620 nm. L'ensemencement est fait par écouvillonnage sur milieu Mueller-Hinton (MH).

3.2.3.3. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Nous avons dans un premier temps testé l'effet antibactérien des extraits aqueux et ethanologique sur les différentes souches en faisant varier leur concentration. Ainsi, les concentrations sur lesquelles ont porté nos essais sont représentées par les valeurs de 0,4 g/ml, 0,6 g/ml et 0,8 g/ml et le test est réalisé par le dépôt des disques sur la gélose MH (Annexe 3).

Ainsi, on dépose 20 μ l des différents échantillons sur chaque disque, le trimethoprime-sulfamethoxazole (SXT 25) est utilisé comme témoin positif pour les souches *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* FRI S6, *Staphylococcus aureus* LGA 251 mec Cet la néomycine (N30) pour les souches *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et les quatre *Klebsiella pneumoniae*, l'eau distillée stérile représente le témoin négatif concernant l'extrait aqueux et ethanologique.

Par la suite, un antibiogramme est réalisé pour chaque espèce bactérienne testée, il consiste à déterminer la résistance des souches bactériennes aux différents antibiotiques. Ainsi, on dépose les disques d'antibiotiques sur la gélose MH préalablement ensemencée.

Trois répétitions sont réalisées pour chaque test.

3.2.3.4. LECTURE

La lecture consiste en une mesure en millimètres de la zone d'inhibition entourant le disque déposé sur la gélose, elle est réalisée au bout de 24 heures d'incubation à 37°C. Les valeurs sont exprimées en millimètres.

3.2.3.5. DETERMINATION DE LA CMI

La méthode de dilution en milieu liquide, décrite dans le recueil de standardisation de l'antibiogramme, a été utilisée par la suite pour déterminer la concentration minimale inhibitrice, la CMI.

Cette dernière correspond à la plus faible concentration de nos extraits pour laquelle les microorganismes testés ne montrent aucune croissance visible à l'œil nu. Pour ce faire, nous avons suivi le protocole suivant :

Une gamme de concentration allant de 0,39 mg/ml à 400 mg/ml de progression géométrique de raison de deux est réalisée.

Le solvant de dilution utilisé est représenté par l'eau distillée stérile. La préparation de la gamme de dilution est illustrée par le tableau V.

Tableau V: Préparation de la gamme de concentrations des extraits à tester

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	T
Volume de l'échantillon (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
Volume d'H ₂ O (µl)	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Concentration de l'extrait (mg/ml)	400	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0,78	0

Il faut noter que dans le cas de *S. aureus* LGA 251, la gamme de concentrations est comprise entre 0,39 mg/ml et 400 mg/ml et dans celui de *Pseudomonas aeruginosa*, le nombre de dilutions testées sont de treize, avec une gamme de concentrations allant de 0,09 mg/ml à 400 mg/ml.

3.2.3.5.1. PREPARATION DE L'INOCULUM BACTERIEN ET SA DISTRIBUTION

A partir de la souche pure, on réalise une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile et d'une densité de 0.5 Mc Farland qui correspond à une concentration d'environ 10⁸ UFC/ml.

Un ensemencement sur milieu solide MH est réalisé par la suite. Des spots d'environ 20 μ l de chaque dilution sont déposés sur les disques en papier Whatman et les boîtes de pétri sont mises à incuber à 37°C pendant 24h.

3.2.3.5.2. LECTURE

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait où aucune croissance bactérienne n'est observée.

3.2.4. TEST STATISTIQUE

L'analyse de la variance réalisée montre que la distribution des résidus ne suit pas une loi normale. Par conséquent l'analyse statistique de nos résultats est effectuée avec un test non paramétrique, c'est celui de Kruskal-Wallis sur R i386 3.0.2 et le seuil de significativité est fixé à 5%.

Nous avons analysé en premier lieu les résultats du test préliminaire des trois concentrations et ce pour avoir une p-value indiquant une différence soit significative ($p < 0,05$), hautement significative ($p < 0,01$) ou très hautement significative ($p < 0,001$).

Le même test est appliqué aux résultats des CMI, celui-ci nous donne également des p-value en faveur d'une différence, soit significative avec $p < 0,05$, hautement significative où $p < 0,01$ ou très hautement significative avec $p < 0,001$, ainsi que les groupes homogènes, ces derniers regroupent les souches bactériennes qui ont donné les mêmes résultats ou des résultats proches.

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. SCREENING PHYTOCHIMIQUE

Les tests phytochimiques sont effectués dans le but de mettre en évidence la présence de composés chimiques pouvant être responsables de l'activité antibactérienne étudiée.

Les résultats de la caractérisation phytochimique sont repris dans le tableau VI.

Tableau VI: Résultats qualitatifs du screening phytochimique

Composés recherchés	Extraits	
	Ethanolique	Aqueux
Saponines	+	+
Tanins	+	+
Composés réducteurs	+	+
Flavonoïdes	+	+
Phénols	+	+
Anthocyanes	-	-
Terpénoïdes	+	+

Le screening phytochimique a révélé la présence de la majorité des composés recherchés. En effet, nous remarquons que les saponines sont moyennement présents dans l'extrait aqueux et présents dans l'extrait ethanolique (Fig.11 A).

Nous avons relevé la présence des flavonoïdes (Fig.11 B1 et Fig.11 B2), des tanins (Fig.11 C), des composés réducteurs (Fig.11 D), des phénols (Fig.11 E) ainsi que des terpénoïdes (Fig.11 F).

Pour les anthocyanes, les deux tests phytochimiques réalisés ont donné des résultats négatifs (Fig.11 G).

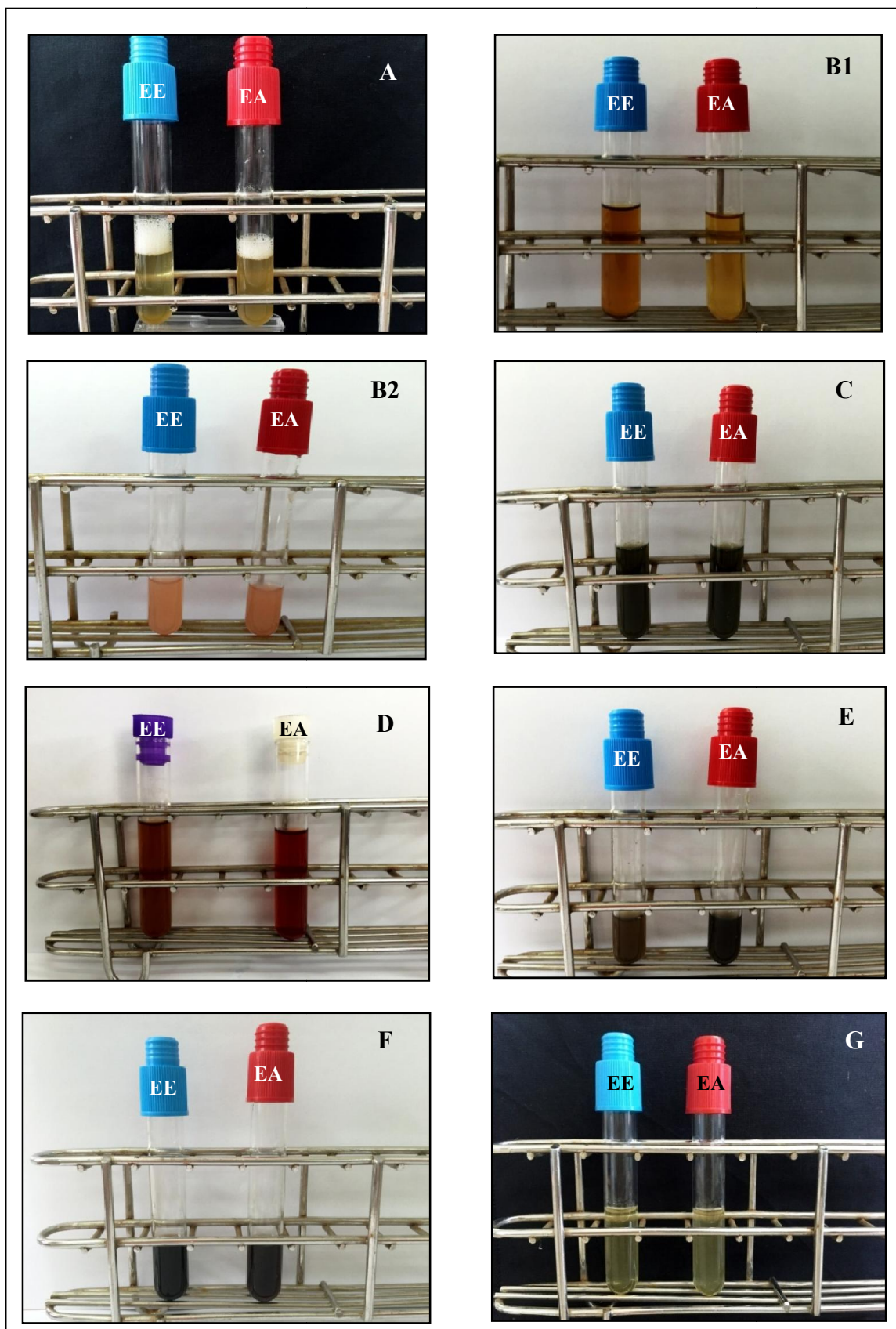


Figure 11: Résultats du screening phytochimique ; A : Saponines ; B : Flavonoïdes ; C : Tanins ; D : Composés réducteurs ; E : Phénols ; F : Terpénoïdes ; G : Anthocyanes

4.2. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

L'activité de nos échantillons vis-à-vis des neuf souches bactériennes, à savoir *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* FRI S6, *Staphylococcus aureus* LGA251, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* 700600, *Klebsiella pneumoniae* 4352, *Klebsiella pneumoniae* 1766 et *Klebsiella pneumoniae* 825, est estimée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques.

4.2.1. VERIFICATION DE LA PURETE DES SOUCHES BACTERIENNES

Afin de vérifier la pureté des souches bactériennes utilisées au cours de notre test, une coloration Gram est systématiquement réalisée avant chaque mise en culture.

La caractérisation du Gram est réalisée par la détermination du mode de regroupement et de la couleur des bactéries testées.

Ainsi, la figure 12, représente les bactéries Gram+ ; ce sont *Bacillus cereus* (Fig.12A), *Staphylococcus aureus* FRI S6 (Fig.12B) et *Staphylococcus aureus* LGA 251 (Fig.12 C).

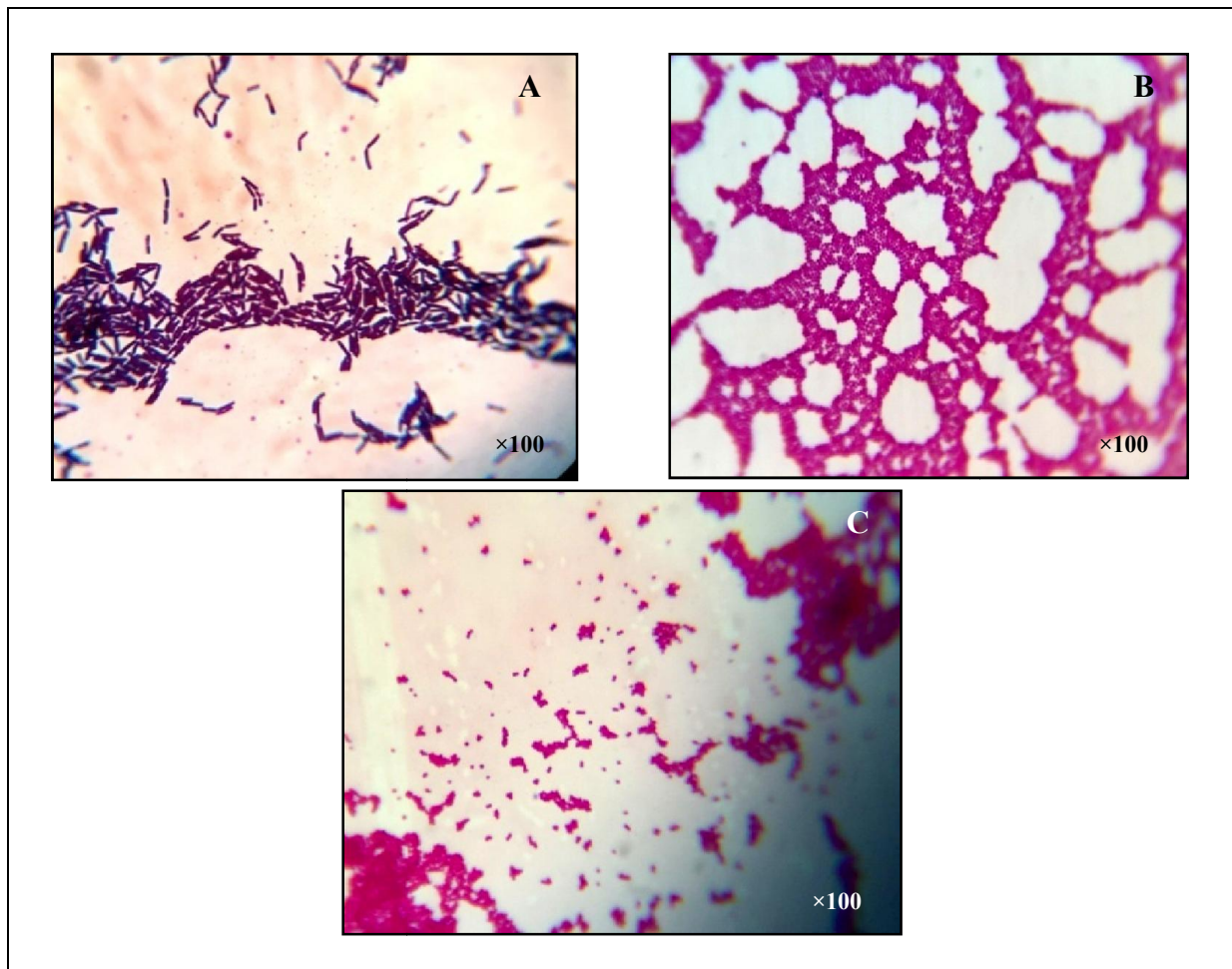


Figure 12 : Illustration des 3 bactéries Gram+ : A : *B. cereus* ; B : *S. aureus* FRI S6 ; C : *S. aureus* LGA 251, observées au microscope photonique (Gx100)

La figure 13 représente l'ensemble des bactéries Gram- , soit le deuxième groupe de bactéries sur lequel nous avons testé nos extraits. Ce sont *Pseudomonas aeruginosa* (Fig.13 A) ; *Escherichia coli* 25922 (Fig.13 B) ; *Klebsiella pneumoniae* 700600 (Fig.13 C) ; *Klebsiella pneumoniae* 4352 (Fig.13 D) ; *Klebsiella pneumoniae* 1766 (Fig.13 E) ; *Klebsiella pneumoniae* 825 (Fig.13 F).

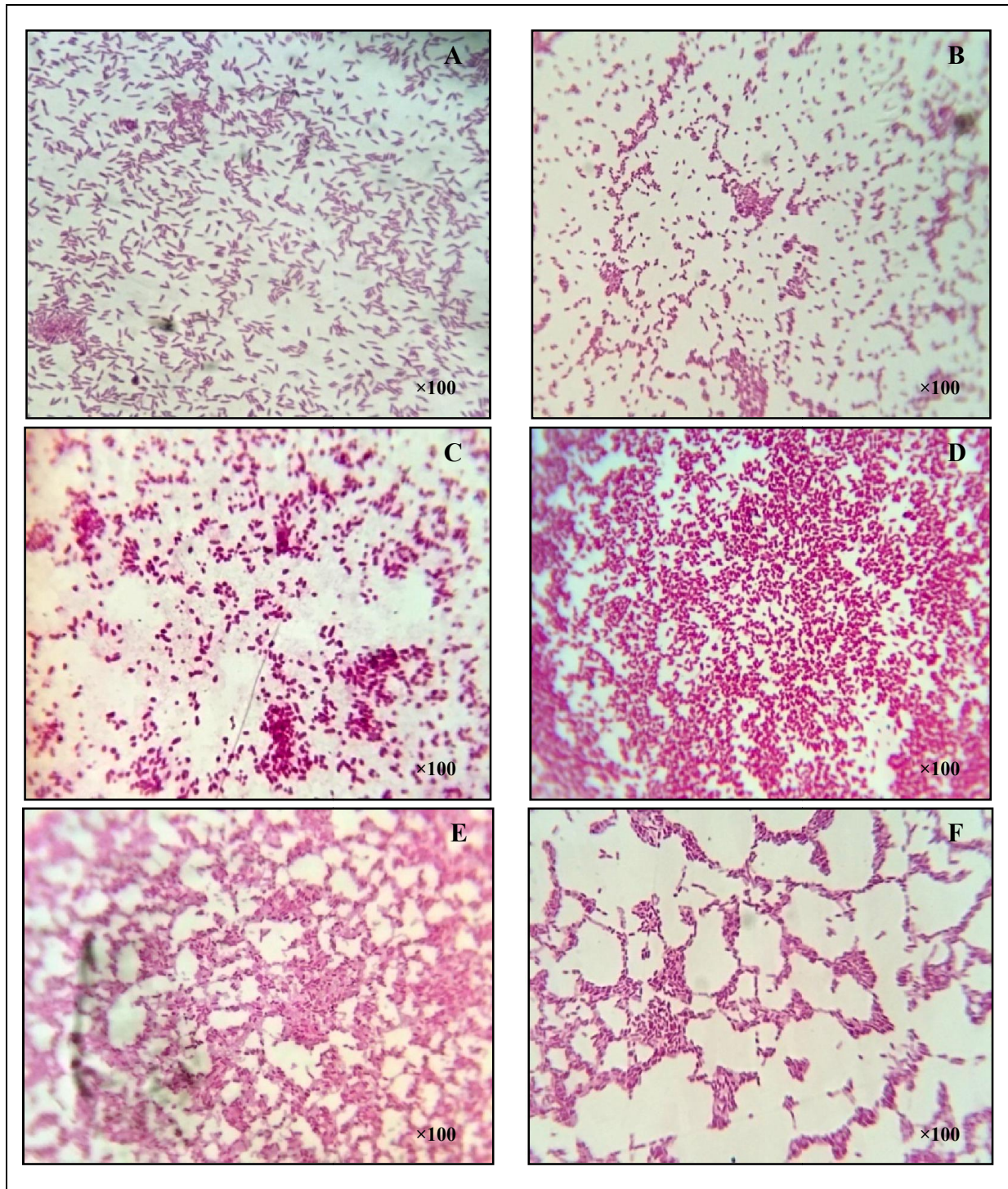


Figure 13: Illustration des 6 bactéries Gram- : A: *P. aeruginosa* ; B: *E. coli* ;C: *K. pneumoniae* 700600 ; D: *K. pneumoniae* 4352 ;E: *K. pneumoniae* 1766 ; F: *K. pneumoniae* 825, observées au microscope photonique (G×100)

4.2.2. ANTIBIOGRAMMES

La réalisation des antibiogrammes nous a permis de mettre en évidence l'effet des antibiotiques sur les souches bactériennes testées. Les résultats des différents antibiogrammes sont illustrés par le tableau VII et Annexe 4.

Les résultats ci dessous montrent que parmi les bactéries Gram-, c'est *K. pneumoniae* qui présente une multirésistance aux antibiotiques. Nous notons que certains antibiotiques présentent des zones d'inhibition plus petites par rapport à celles obtenues avec l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique.

Ainsi, *B. cereus*, *S. aureus* LGA 251 et *S. aureus* FRI S6 sont sensibles aux mêmes antibiotiques qui sont : la ticarcilline (TC75), bacitracine (BA10), ampicilline (AMP10), amoxicilline (AML30), cloxacilline (CX5), triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT25), kanamycine (K30), neomycine (N30), ticarcilline acide clavulanique (TTC85), érythromycine (E15), novobiocine (NO30) et la vancomycine (VA30).

P. aeruginosa est sensible à la ticarcilline (TC75), cloxacilline (CX5), kanamycine (K30), neomycine (N30), ticarcilline acide clavulanique (TTC85), novobiocine (NO30) et à la vancomycine (VA30).

E.coli 25922 est sensible à la ticarcilline (TC75), ampicilline (AMP10), amoxicilline (AML30), triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT25), kanamycine (K30), neomycine (N30), ticarcilline acide clavulanique (TTC85), érythromycine (E15), novobiocine (NO30) et la vancomycine (VA30).

Les différentes souches de *K. pneumoniae* sont sensibles aux mêmes antibiotiques qui sont : kanamycine (K30), neomycine (N30), ticarcilline acide clavulanique (TTC85), érythromycine (E15) et la novobiocine (NO30), mis à part *K.pneumoniae*700600 qui n'est pas sensible à l'érythromycine (E15) mais plutôt à la vancomycine (VA30).

Tableau VII: Résultats des antibiogrammes

	Antibiotiques												
	TC75	BA10	AMP10	OX1	AML30	CX5	SXT25	K30	N30	TTC85	E15	NO30	VA30
<i>B. cereus</i>	16	18	14	-	18	11	24	24	20	15	26	27	20
<i>S. aureus LGA 251</i>	27	20	27	20	25	27	30.5	25	23	31	25	36	19
<i>S. aureus FRI S6</i>	40	20	40	26	+++	28	26	25	26	48	30	25	20
<i>P. aeruginosa</i>	25	-	-	-	-	7.5	-	8.25	15.75	27.5	-	10.5	7.5
<i>E. coli</i>	27	-	17	-	17.5	-	22	24	21.5	27.5	8.5	14.25	8
<i>K. pneumoniae 7000600</i>	-	-	-	-	-	-	×	13	16	16.8	-	6.3	7
<i>K. pneumoniae 4352</i>	-	-	-	-	-	-	×	21	17.5	12	10	10	-
<i>K. pneumoniae 1766</i>	-	-	-	-	-	-	×	18	18	14.5	12	9	-
<i>K. pneumoniae 825</i>	-	-	-	-	-	-	×	19	20	19	10	8	-

(-) résistante ; (+++) très grande zone ; (×) non testé, les différentes valeurs représentent les diamètres d'inhibition (mm)

4.2.3. TEST DE DIFFUSION SUR MILIEU SOLIDE

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des extraits aqueux et éthanolique des feuilles de l'olivier du sud par la méthode des disques.

L'activité antibactérienne de nos échantillons vis-à-vis des neuf souches bactériennes testées, est estimée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques.

Afin de mettre en évidence l'effet bactéricide des extraits aqueux et éthanolique, un test préliminaire est réalisé. Il consiste à faire varier la concentration de ces extraits qui correspondent à la gamme 0,4 g/ml, 0,6 g/ml et 0,8 g/ml appliquées aux différentes souches bactériennes.

La figure 14 montre que les trois concentrations possèdent une activité bien définie sur la croissance des souches bactériennes testées.

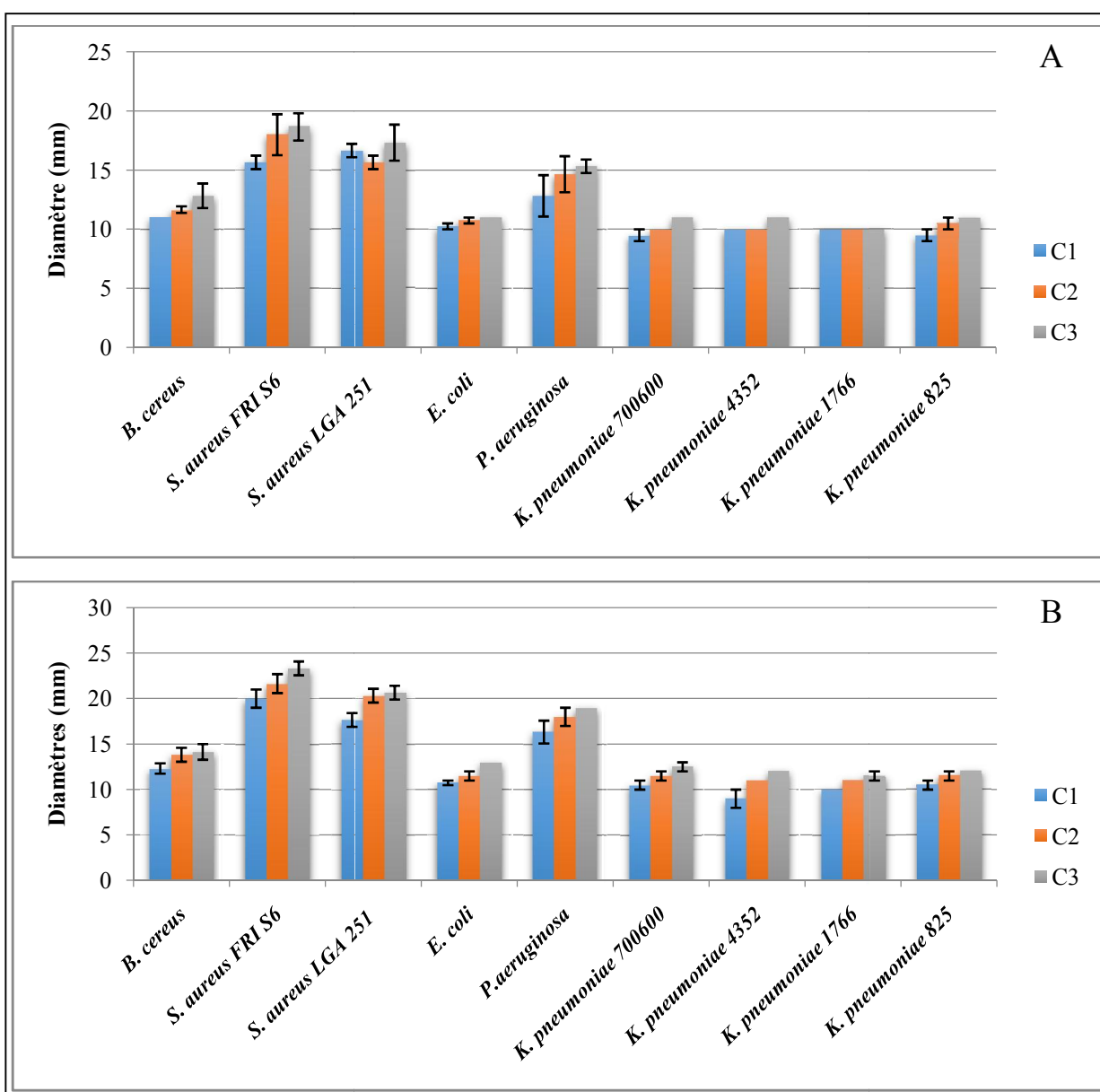


Figure 14 : Histogrammes représentant les diamètres d'inhibition en fonction des concentrations ; A : Extrait aqueux ; B : Extrait éthanolique ; C1 : 0,4 g/ml ; C2 : 0,6 g/ml ; C3 : 0,8 g/ml

Nous avons comparé l'activité antibactérienne des extraits aqueux et ethanolique à différentes concentrations.

Nous notons que l'évolution des diamètres d'inhibition en fonction de la concentration varie en moyenne entre 1 et 3 mm selon la souche bactérienne. Les résultats obtenus montrent que les deux extraits testés présentent une activité inhibitrice vis à vis des souches bactériennes utilisées.

La figure 14 indique que le diamètre de la zone d'inhibition augmente en fonction de la concentration des deux extraits.

Le test de Kruskal-Wallis montre que c'est la concentration 0,8 g/ml qui donne les zones d'inhibition les plus intéressantes (Annexe 5.1.1.).

L'analyse de la variance a montré que *S. aureus FRI S6*, *S. aureus LGA 251* et *P. aeruginosa* font partie du même groupe, celui qui représente les valeurs des diamètres les plus élevées (Annexe 5.1.2.), aussi bien pour l'extrait aqueux que pour l'extrait ethanolique.

C'est-à-dire que dans le cas des bactéries Gram+ testées, il n'y a pas de différence significative entre *S. aureus FRI S6* et *S. aureus LGA 251*, alors qu'il y a une différence entre chacune de ces dernières par rapport à *B. cereus*.

Dans le groupe des Gram-, il y a une différence hautement significative entre *P. aeruginosa* et les autres souches, à savoir *K. pneumoniae* et *E. coli*.

Ainsi, les diamètres mesurés pour *S. aureus FRI S6* (Fig.15 A), sont de $18,66 \pm 1,15$ mm pour l'extrait aqueux et $23,33 \pm 0,76$ mm pour l'extrait ethanolique, tandis que pour *S. aureus LGA 251* (Fig.15 B), ils sont de $17,33 \pm 1,52$ mm pour l'extrait aqueux et $20,66 \pm 0,76$ mm pour l'extrait ethanolique.

Dans le cas de *P. aeruginosa* (Fig.15 C), on obtient les valeurs de $15,33 \pm 0,57$ mm pour l'extrait aqueux et $19,00 \pm 0,00$ mm pour l'extrait ethanolique.

Ces résultats corroborent avec ceux de Djenane et al. (2012) qui portent sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux des feuilles de l'olivier du nord (*Olea europaea L.*), ce dernier donne un diamètre de $16,33 \pm 1,80$ mm pour *S. aureus*, ainsi que les travaux effectués par Labane et Tadala (2015) sur l'extrait ethanolique de l'olivier sauvage (*O. e. subsp. sylvestris*) avec un diamètre de $20,00 \pm 0,57$ mm.

Sudjana et al. (2009) ont testé l'extrait aqueux de feuilles d'olivier contre 122 espèces microbiennes. Ils ont constaté que cet extrait exerce un effet antimicrobien restreint, car, parmi l'ensemble des microorganismes testés, uniquement *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* et *S. aureus* ont manifesté une sensibilité envers cet extrait.

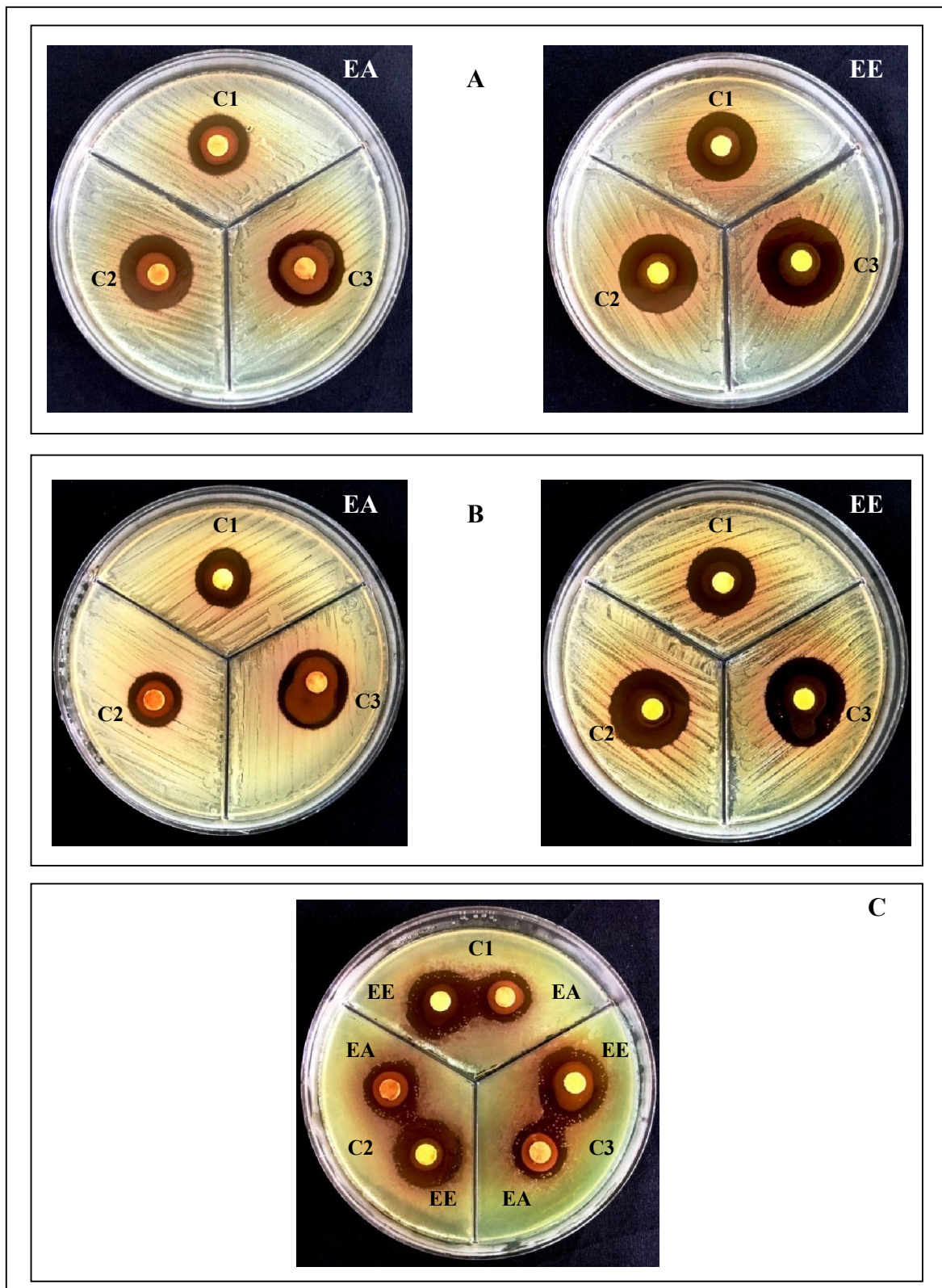


Figure 15 : Résultats du test antibactérien ; EA: Extrait aqueux ; EE : Extrait éthanolique; A : *S. aureus* FRI S6 ; B : *S. aureus* LGA 251 ; C : *P. aeruginosa* ; C1 : 0,4g/ml ; C2 : 0,6 g/ml ; C3 : 0,8 g/ml

Le test de Kruskal-Wallis montre qu'il y a une différence significative entre l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique (Annexe 5.1.3.). Ainsi, l'extrait éthanolique donne de plus grandes zones d'inhibition par rapport à l'extrait aqueux.

Cela serait dû à la nature des molécules obtenues par l'extraction éthanolique. Il faut cependant noter qu'une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chacun de nos extraits nous permettrait d'identifier les composés présentant une activité antibactérienne.

Selon Brainte et *al.* (2000), les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes du fait qu'ils possèdent des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un grand nombre de microorganismes.

D'après Medina et *al.* (2006), parmi les composés majeurs antibactériens que contiennent les polyphénols ce sont l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol qui présentent un spectre d'action élargi.

La mesure des diamètres d'inhibition en fonction de la nature de l'extrait testé (Fig. 14) montre que ce sont les bactéries appartenant au groupe des Gram+ qui sont les plus sensibles à l'extrait aqueux et à l'extrait éthanolique que les bactéries Gram-.

Cette observation est confirmée par les travaux de (Basli et *al.*, 2012) sur l'activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. et de (Rastogi et *al.*, 1988) sur les mécanismes de pathogénicité chez les mycobactéries.

Ces mêmes auteurs attribuent cet effet à une différence de la structure entre les bactéries Gram+ et les bactéries Gram-. En effet, ces dernières possèdent une membrane externe imperméable aux composés lipophiles, l'absence de cette barrière chez les Gram+ fait que le contact des constituants hydrophobes des extraits avec la membrane cellulaire bactérienne est facilité, plusieurs auteurs ont rapporté les effets de ces composés sur les bactéries, on peut citer :

- Dégradation de la paroi cellulaire (Helander et *al.*, 1998);
- Altération de la membrane cytoplasmique (Sikkema et *al.*, 1994 ; Oosterhaven et *al.*, 1995 ; Ultee et *al.*, 2002) ;
- Détérioration des protéines membranaires (Juven et *al.*, 1994 ; Ultee et *al.*, 1999) ;
- Fuite du contenu de la cellule (Oosterhaven et *al.*, 1995 ; Helander et *al.*, 1998 ; Lambert et *al.*, 2001) ;
- Coagulation du cytoplasme (Gustafson et *al.*, 1998) ;
- Epuisement de la force proton motrice (Ultee et *al.*, 1999) ;
- Altération des systèmes enzymatiques bactériens (Wendakoonet Sakaguchi, 1995).

Le temps de diffusion de l'extrait avant incubation et la teneur en agar sont deux paramètres influençant les diamètres des zones d'inhibition résultants (Bourdon et Marchal, 1973).

Un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition supérieure ou égale à 10 mm (Biyiti et *al.*, 2004).

Dans le souci d'apprécier la sensibilité des neuf souches bactériennes vis-à-vis de nos extraits, nous avons adopté la méthode de Ponse (2003). En effet, selon cet auteur la sensibilité des bactéries aux extraits végétaux est définie comme suit :

- Diamètre inférieur à 8 mm : bactérie non sensible (-) ;
- Diamètre compris entre 8 mm et 14 mm : bactérie sensible (+) ;
- Diamètre compris entre 15 mm et 19 mm : bactérie très sensible (++) ;
- Diamètre supérieur à 20 mm : bactérie extrêmement sensible (+++).

Le tableau VIII représente le degré de sensibilité des différentes souches bactériennes testées.

Tableau VIII : Degrés de sensibilité des souches bactériennes testées

		Degrés de sensibilité	
		Extrait aqueux	Extrait ethanologique
Souches bactériennes	<i>B. cereus ATCC 14579</i>	+	+
	<i>S. aureus FRI S6</i>	++	+++
	<i>S. aureus LGA 251</i>	++	+++
	<i>E. coli ATCC 25922</i>	+	+
	<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	++	++
	<i>K. pneumoniae 700600</i>	+	+
	<i>K. pneumoniae 4352</i>	+	+
	<i>K. pneumoniae 1766</i>	+	+
<i>K. pneumoniae 825</i>	+	+	

Les résultats représentés par le tableau VIII nous permettent de classer les différentes souches bactériennes testées au cours de notre expérimentation en fonction de leur degré de sensibilité vis-à-vis de l'extrait aqueux et de l'extrait ethanologique.

En effet, *S. aureus FRI S6*, *S. aureus LGA 251* et *P. aeruginosa* sont toutes trois très sensibles à l'extrait aqueux avec un diamètre d'inhibition respectif de $18,66 \pm 1,15$ mm, $17,33 \pm 1,52$ mm et $15,33 \pm 0,57$ mm.

Pour les autres souches bactériennes *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae 700600*, *K. pneumoniae 4352*, *K. pneumoniae 1766* et *K. pneumoniae 825*, elles sont toutes sensibles à l'extrait aqueux avec une zone d'inhibition variant de $10,00 \pm 0,00$ mm à $12,83 \pm 1,04$ mm.

Ainsi, il semblerait que l'extrait aqueux a le même effet sur les bactéries Gram+ et les bactéries Gram-.

Dans le cas de l'extrait ethanologique, ce dernier semble plus efficace contre les bactéries Gram+, puisque *S. aureus FRI S6* et *S. aureus LGA 251* y sont hautement sensibles avec un diamètre d'inhibition respectif de $23,33 \pm 0,76$ mm et $20,66 \pm 0,76$ mm.

Quant à *B. cereus*, elle est sensible à l'extrait ethanologique avec un diamètre d'inhibition mesurant $14,15 \pm 0,86$ mm.

Pour les bactéries Gram-, *P. aeruginosa* est très sensible à l'extrait éthanolique, alors que *E. coli*, *K. pneumoniae* 700600, *K. pneumoniae* 4352, *K. pneumoniae* 1766 et *K. pneumoniae* 825 sont sensibles à l'extrait éthanolique.

4.2.4. CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine a montré que *S. aureus* FRI S6 et *S. aureus* LGA251 présentent toutes deux une différence hautement significative par rapport à *B. cereus* dans le groupe des bactéries Gram+ testées et c'est *P. aeruginosa* qui présente une différence hautement significative par rapport à *E.coli* et *K. pneumoniae* dans le groupe des bactéries Gram- (Annexe5.2.1).

Nous avons ainsi choisi pour la détermination de la CMI de représenter celles obtenues avec *S. aureus* FRI S6, *S. aureus* LGA251 et *P. aeruginosa*.

L'évolution des diamètres d'inhibition en fonction de la concentration montre une progression exponentielle (Fig. 16).

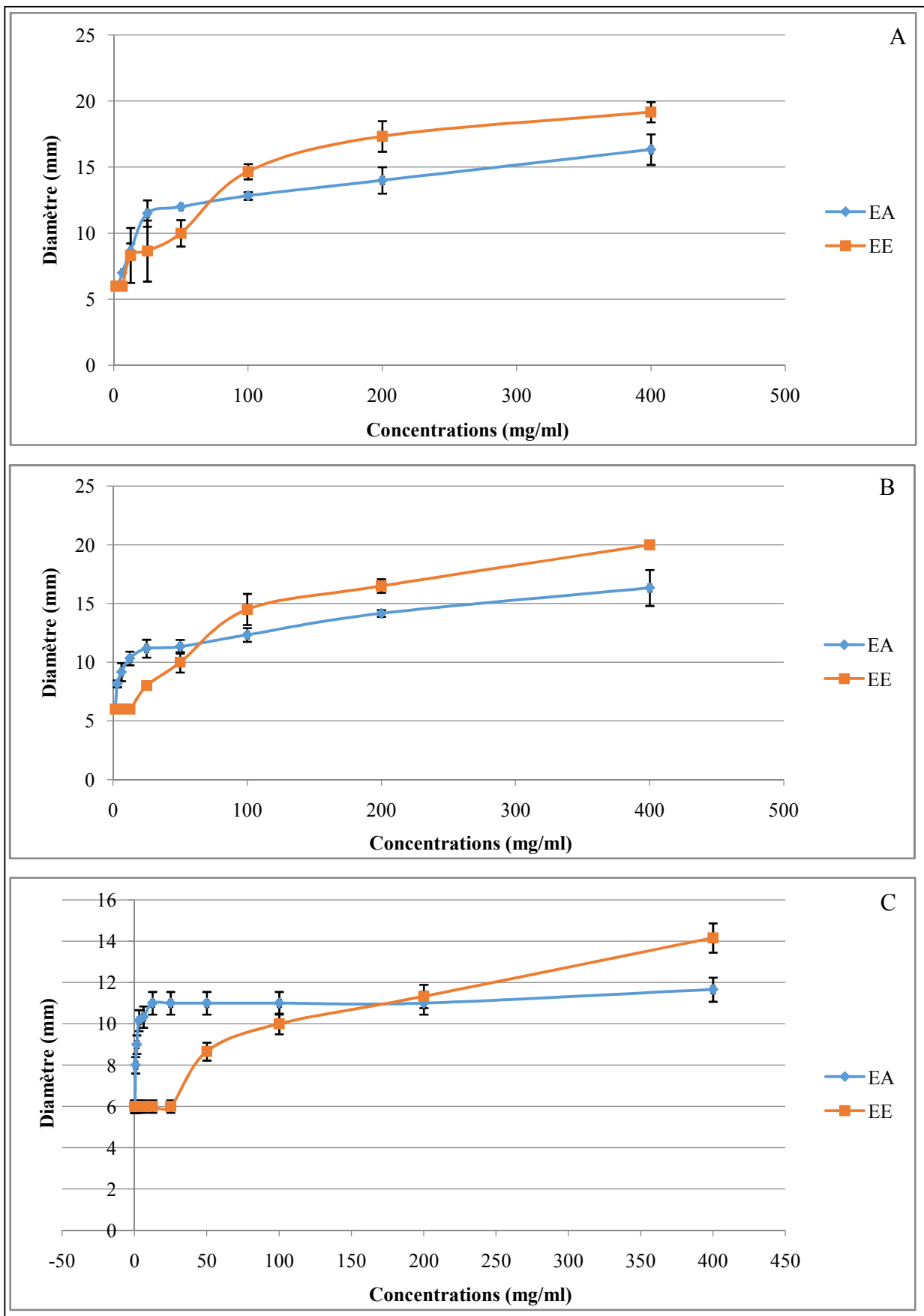


Figure 16 : Evolution des diamètres d'inhibition en fonction de la concentration pour ; A : *S. aureus FRI S6* ; B : *S. aureus LGA 251* ; C : *P. aeruginosa* ; EA : Extrait aqueux ; EE : Extrait éthanolique

La figure 16 représente la cinétique des diamètres d'inhibition de *S. aureus FRI S6*, de *S. aureus LGA251* et de *P. aeruginosa* en fonction de la nature de l'extrait testé.

Dans le cas de *S. aureus FRI S6*, représenté par la figure 16A, nous notons qu'aux concentrations comprises entre 0,39 mg/ml et 3,12 mg/ml de l'extrait aqueux, aucune zone d'inhibition n'est notée.

C'est à partir de 6,25 mg/ml qu'une évolution graduelle des diamètres d'inhibition est observée. On constate en effet, que plus la concentration augmente plus les zones d'inhibition sont grandes.

Pour l'extrait ethanologique, les concentrations comprises entre 0,39 mg/ml et 6,25 mg/ml ne présentent aucune activité inhibitrice vis-à-vis de *S. aureus FRI S6*, alors qu'à partir de 12,5 mg/ml, une augmentation graduelle des diamètres d'inhibition est enregistrée. La valeur $19,10 \pm 0,73$ mm représente la plus grande zone d'inhibition obtenue à 400 mg/ml.

Pour *S. aureus LGA251* (Fig.16B), l'extrait aqueux ne donne aucune zone d'inhibition aux concentrations allant de 0,39 mg/ml à 1,56 mg/ml.

La zone d'inhibition augmente sensiblement à partir de 3,12 mg/ml pour atteindre une valeur maximale de $16,30 \pm 1,52$ mm à la concentration de 400 mg/ml.

Pour l'extrait ethanologique, les concentrations variant de 0,39 mg/ml à 12,5 mg/ml n'ont aucun effet sur les bactéries puisque aucune zone d'inhibition n'est observée, alors que les concentrations allant de 25 mg/ml à 400 mg/ml montrent une évolution progressive du diamètre d'inhibition. En effet, nous mesurons les valeurs respectives de $08,00 \pm 0,00$ mm et $20,00 \pm 0,00$ mm de diamètre.

Dans le cas de *P. aeruginosa* (Fig.16C), c'est à partir de la concentration 0,78 mg/ml de l'extrait aqueux qu'une zone d'inhibition est notée avec la valeur de $08,00 \pm 0,00$ mm de diamètre.

Dans l'intervalle de concentration allant de 12,5 mg/ml à 200 mg/ml, les valeurs des diamètres d'inhibition restent constantes à savoir $11,00 \pm 0,00$ mm puis augmentent sensiblement à 400 mg/ml et atteignent une valeur de $11,60 \pm 0,57$ mm.

Pour l'extrait ethanologique aucune zone d'inhibition n'est mesurée de 0,39 mg/ml à 25 mg/ml. Ce n'est qu'à partir de 50mg/ml qu'une évolution des diamètres d'inhibition est mesurée. En effet, les valeurs enregistrées vont de $08,60 \pm 1,52$ mm à $14,10 \pm 1,04$ mm.

Les résultats de la CMI des extraits aqueux et ethanolique sont portés sur le tableau suivant :

Tableau IX : Résultats de la CMI pour l'extrait aqueux (EA) et ethanolique (EE)

	Dilutions	Concentrations (mg/ml)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Souches bactériennes	Extrait	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09
<i>S. aureus FRI S6</i>	EA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+		
	EE	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
<i>S. aureus LGA 251</i>	EA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
	EE	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
<i>P. aeruginosa</i>	EA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	EE	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) zone non inhibée; (-) zone inhibée

Après incubation, des colonies bactériennes sont apparues dans les zonesensemencées qui correspondent pour l'extrait aqueux aux concentrations 3,12 mg/ml pour *S. aureus FRI S6* (Tableau IX) (Fig.17A), 0,78 mg/ml pour *S. aureus LGA251* (Tableau IX) (Fig.17B)et 0.39 mg/ml pour *P. aeruginosa* (Tableau IX) (Fig.17C), et pour l'extrait ethanolique nous enregistrons la valeur de 6,25 mg/ml pour *S. aureus FRI S6*, 12,5 mg/ml pour *S. aureus LGA251* et 25 mg/ml pour *P. aeruginosa*.

La croissance bactérienne dans ces zones est dûe au fait que l'extrait testé est trop dilué. A partir de ces valeurs respectives, aucune croissance bactérienne n'est notée.

Cette absence de croissance s'explique par l'action inhibitrice de nos extraits vis-à-vis de *S. aureus FRI S6*, de *S. aureus LGA 251* et de *P. aeruginosa*.

Suite à ces observations, nous pouvons dire que la CMI de l'extrait aqueux est de 6,25 mg/ml pour *S. aureus FRI S6*, 1,56 mg/ml pour *S. aureus LGA 251* et de 0,78 mg/ml pour *P. aeruginosa*, alors que pour l'extrait ethanolique la CMI obtenue est de 12,5 mg/ml pour *S. aureus FRI S6*, 25 mg/ml pour *S. aureus LGA 251* et de 50 mg/ml pour *P. aeruginosa*.

La détermination des CMI des extraits de feuilles d'*Olea europaea* subsp. *laperrinei* a montré, selon l'analyse statistique, qu'il existe une différence très hautement significative entre les différents extraits testés. L'extrait ethanolique est celui qui a donné les diamètres d'inhibition les plus élevés (Annexe 5.2.2.).

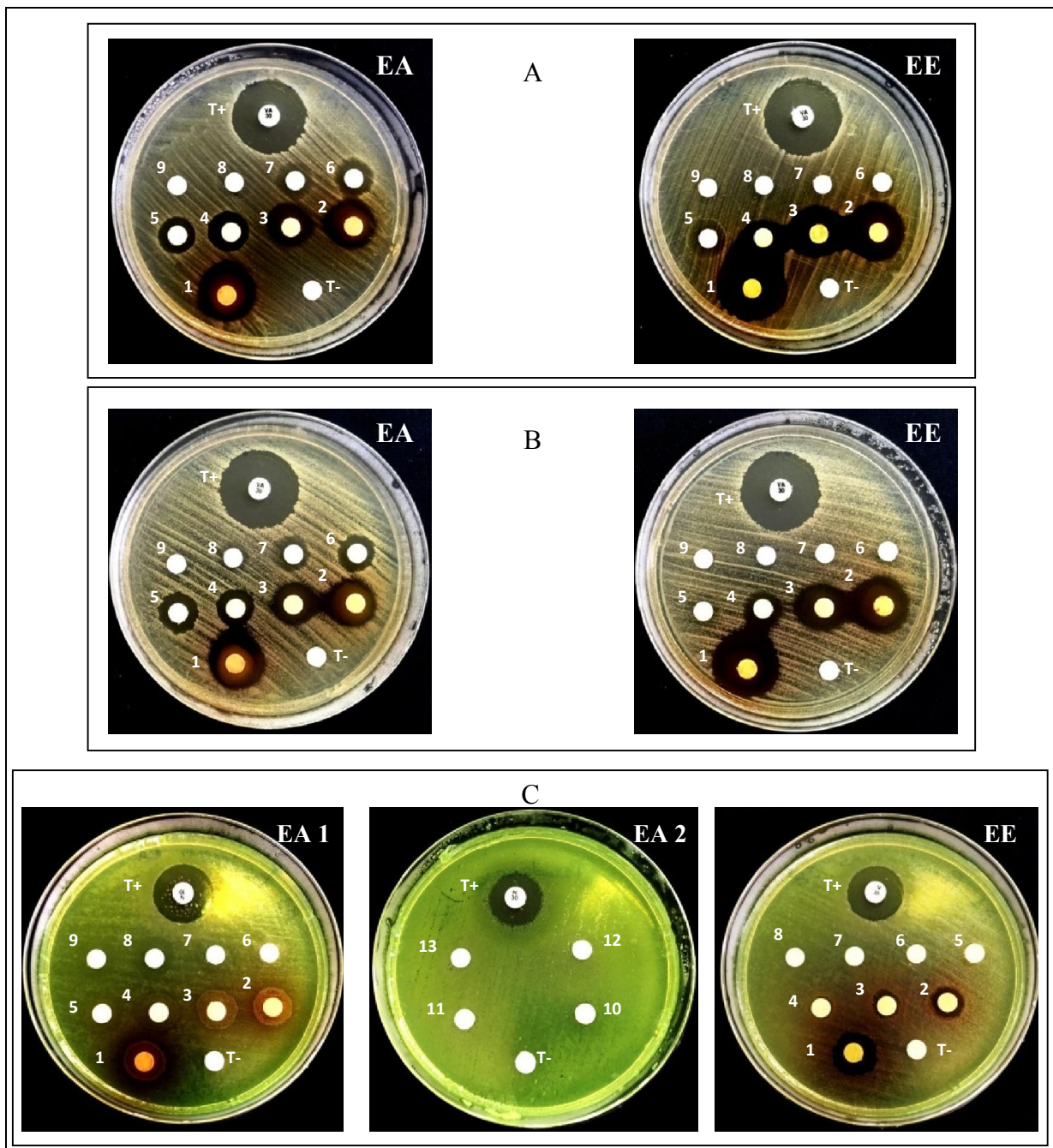


Figure 17 : Résultats de la CMI pour ; A : *S. aureus* FRI S6 ; B : *S. aureus* LGA 251 ; C : *P. aeruginosa* ; EA : Extrait aqueux ; EE : Extrait éthanolique ; de 1 à 13 : Différentes dilutions utilisées ; T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif

Nous constatons une corrélation négative entre les CMI et les diamètres d'inhibition mesurés. En effet, les plus grandes zones d'inhibition obtenues avec les deux extraits testés ne correspondent pas aux plus faibles CMI enregistrées.

Cette observation ne va pas dans le sens de Lakhdar (2015) qui a testé l'activité antibactérienne des huiles essentielles de plusieurs espèces marocaines dont *Mentha pulegium*, *Citrus aurantium*, *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus*, *Origanum compactum* et *Cymbopogon martinii* vis-à-vis de deux souches d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

D'après les travaux de Bisignano *et al.* (1999) qui ont porté sur l'activité antibactérienne de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol dont les CMI étaient de l'ordre du $\mu\text{g/ml}$, on en déduit que le passage de l'état brut à l'état purifié augmente l'activité antibactérienne et par conséquent diminue les valeurs des CMI.

CONCLUSION

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation phytochimique et aux effets antibactériens des extraits bruts de l'olivier de Laperrine.

Le screening phytochimique réalisé sur l'extrait aqueux et l'extrait ethanolique a révélé la présence des saponines, des tanins, des composés réducteurs, des flavonoïdes, des phénols et des terpénoïdes.

Cependant les anthocyanes n'ont été révélés dans aucun de nos extraits.

L'évolution qualitative de l'effet antibactérien montre que l'extrait aqueux et l'extrait ethanolique sont actifs sur les souches bactériennes testées. Les meilleurs résultats sont cependant observés dans le cas de *S. aureus FRI S6*, *S. aureus LGA 251* et *P. aeruginosa*.

Ainsi l'activité bactéricide de nos extraits est notée aussi bien chez les bactéries Gram+ que chez les bactéries Gram-. Il faut néanmoins préciser que les diamètres des zones d'inhibition les plus intéressants supérieurs à 10mm sont mesurés avec l'extrait ethanolique.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est aussi de l'ordre de 3,12 mg/ml pour l'extrait aqueux et 6,25 mg/ml pour l'extrait ethanolique dans le cas de *S. aureus FRI S6*, elle correspond à 0,78 mg/ml pour l'extrait aqueux et 12,5 mg/ml pour l'extrait ethanolique dans le cas de *S. aureus LGA 251* et enfin nous mesurons 0,39 mg/ml pour l'extrait aqueux et 25 mg/ml pour l'extrait ethanolique dans le cas de *P. aeruginosa*.

Il serait intéressant pour compléter cette étude de :

- Réaliser une HPLC pour l'extrait aqueux et l'extrait ethanolique afin de déterminer les molécules bioactives présentes ;
- D'élargir l'étude de l'activité antibactérienne à d'autres souches bactériennes, champignons et parasites ;
- Etudier d'autres activités biologiques telles que l'activité antioxydante, antivirale, antidiabétique...etc., *in vitro* ou *in vivo*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abaza L., Talorete T.P., Yamada P., Kurita Y., Zarrouk M. and Isoda H. (2007). Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 71(5), pp: 1306-1312.
- Akemi M., Masamichi I., Masanori O. and Noriaki O. (2001). Cosmetic for protecting and improving aged skin having AGEs degrading activity/Cosmetic having AGEs degrading activity and effective in protecting and improving aged skin. Patent written in Japanese. JP 99-300806 19991022, 5 p.
- Anderson, O.M. and Markham, K.R. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, Edited by Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press ; 01-32-397-425.
- Anthelme F., Abdoukader A and Besnard G. (2008). Distribution, shape and clonal growth of the rare endemic tree *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (oleaceae) in the Saharan mountains of Niger. *Plant Ecol.* DOI 10. 1007/s 11258-007-9386-6.
- Baali-cherif D. (2007). Etude des populations d'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*) du Sahara central Algérien (Hoggare et Tassili) ; Aspects biologiques et caractérisation moléculaire. Thèse de doctorat. USTHB. Alger ; 121 p.
- Baali-cherif D., Bouguedoura N., Besnard G. et Bouhired L. (2007). Etude des populations de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *laperrinei* Batt. & Trab.) du Sahara central Algérien (Hoggare et Tassili): aspects biologiques et caractérisation moléculaire. *Annales de l'Institut National Agronomique-El-Harrach*; Vol.28 N° 1 et 2 ; pp : 39-65.
- Bao J., Zhang D.W., Zhang J.Z.H., Lee Huang P., Lin Huang P. and Lee-Huang S. (2007). Computational study of bindings of olive leaf extract (OLE) to HIV-1 fusion protein gp41. *FEBS Letters*, 581 (14), pp : 2737-2742.
- Basli A., Chibane M., Madani K. et Oukil N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf., *Phytothérapie*; 10: pp : 2–9.
- Battandier J.A. et Trabut L. (1911). Contribution à la flore du pays des touaregs. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, pp: 623-629.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J. and Alcaraz M. (2002). Radioprotective Effects In Vivo of Phenolics Extracted from *Olea europaea* L. Leaves Against X-Ray-Induced Chromosomal Damage: Comparative Study Versus Several Flavonoids and Sulfur-Containing Compounds. *J Med Food*, 5(3), pp: 125-35.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A. and Del Rio J. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chem.* 68, pp: 457-462.
- Benichou A. (1962). Recherche critique sur l'olivier de Laperrine (histoanatomie). Bulletin n°6 de l'IRS, Université d'Alger.
- Bergey D. H., Holt J. G., Krieg N. R. and Peter H.A. (1994). *Sneath, Bergey's manual of determinative bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins (ISBN 0-683-00603-7).

- Besnard G. (2009). Génétique et évolution des plantes en milieu méditerranéen et tropical. Habilitation à diriger des recherches. Université des sciences et technologies de Lille I. 73 p.
- Besnard G. and Baali-cherif D. (2009). Coexistence of diploids and triploids in a Saharan relict olive: evidence from nuclear microsatellite and flow cytometry analyses. *ScienceDirect C. R. Biologies* 332, pp: 1115-1120.
- Besnard G., Anthelm F. and Baali – cherif D. (2012). The Laperrine's olive tree (*Oleaceae*): a wild genetic resource of the cultivated olive and a model – species for studying the biogeography of the saharan mountains. *Acta Botanica Gallica*, 159: 3, pp: 319-328.
- Besnard G., christen P.A., Baali-cherif D., Bouguedoura N. and Anthelme F. (2007). Spatial genetic structure in the Laperrine's olive (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*), a long-living tree from Saharan mountains. *Heredity*, 99, pp: 649-657.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N. and Saija, A., (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Pharm Pharmacol*, 51(8), pp : 971-974.
- Bossokpi I. et Passi L. (2002). Etude des activités biologiques de fagara zanthoxyloides Lam (*Rutaceae*), thèse de pharmacie, Bamako. p 133.
- Bouallagui Z., Han J., Isoda H. and Sayadi S. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (1), pp: 179-184.
- Boukhebti H., Chaker A. N., Lograda T. and Ramdani M. (2015). chemical and antimicrobial properties of essential oils of *Olea europea L.* *International Journal of Pharmacology & Toxicology / 5(1)*, pp: 42-46.
- Bourdon et Marchal (1973). *Techniques bactériologiques*. Ed Doin, 840 p, Paris.
- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H. and Marzouk B. (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa L.* shoots and roots. *C. R. Biologies ;* pp: 48-55.
- Brahmi F., Mechri B., Dhibi M. and Hammami M. (2013). Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons, *Industrial Crops and Products* 49, pp: 256-264.
- Brainte R., Francesco L.C., Ferdinando F., Maurizio P. and Roberto N. (2000). Hydrolysis of Oleuropein by recombinant β -glycosidases from hyperthermophilic *Archea sulfobolus* immobilised on chitosan matrix. *J. Biotechnol.* Vol. 71, pp: 275-286.
- Briante R., La Cara F., Febbraio F., Patumi M. and Nucci R. (2002). Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts. *Journal of Biotechnology*, 93, pp : 109–119.

- Bruneton J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie, plantes médicinales, Tec et Doc Lavoisier, Paris, pp : 278-279.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2em Ed, Editions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier, Paris, 1120 p.
- Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Del Carlo M. and Gallina-Toschi T. (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J Agric, Food Chem* ; 53:8918-25.
- Castillo J., Alcaraz M. and Benavente-García O. (2010). Antioxidant and Radioprotective Effects of Olive Leaf Extract. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, pp: 951-958.
- Collin S. et Crouzet J. (2011) : Polyphénols et procédés, Ed.TEC & DOC. Lavoisier. Paris, pp: 10-25.
- Cook N.C. and Samman S. (1996). Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem*, 7, pp: 66-76.
- Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microb. Rev.* Vol. 12, pp: 564-582.
- Dekanski D., Janicijevic-Hudomal S., Tadic V., Markovic G., Arsic I. and Mitrovic D. M. (2009). Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *Journal of the Serbian chemical society*, 74 (4), pp : 367-377.
- Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L. et Roncales P. (2012). Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature & Technologie*. n° 07, pp: 53-61.
- Erdohan Z. and Turhan K. (2011). Olive leaf extract and usage for development of antimicrobial food packaging, *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, Microbiology Book Series, vol. 3, pp: 1094-1101.
- Esmaili-Mahani S., Rezaeezadeh-Roukerd M., Esmailpour K., Abbasnejad M., Rasouljan B., Sheibani V., Kaeidi A. and Hajializadeh Z. (2010). Olive (*Olea europaea L.*) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 132, pp : 200-205.
- Fonollá J., Díaz-Ropero P., De la Fuente D.E. and Quintela J.C. (2010). MS358 one-month consumption of an olive leaf extract enhances cardiovascular status in hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis Supplements*, 11(2), 182 p.
- Fragopoulou E., Nomikos T., Karantonis H.C., Apostolakis C., Pliakis E. and Samiotaki M. (2007). Biological activity of acetylated phenolic compounds. *J Agric Food Chem.*; 55:80-9.
- Ghedira, K. (2008). L'Olivier. *Phytothérapie*, 6(2), pp: 83-89.
- Green P.S. (2002). A revision of *Olea L.* (Oleaceae). *Kew Bull.* 57, pp:91-140.

- Gustafson J.E., Liew Y.C., Chew S., Markham J.L., Bell H.C., Wyllie S.G. and Warmington J.R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology, 26, pp: 194-198.
- Hartmann T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry Volume 68, Issues 22–24; pp: 2831-2846.
- Hayes J.E., Allen P., Brunton N., O’Grady M.N. and Kerry J.P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: olive leaf extract (*Olea europaea L.*), lutein, sesamol and ellagic acid, Food Chem. 126; pp: 948-955.
- Helander I. M., Alakomi H.-L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I. and Smid E. J.(1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, pp: 3590-3595.
- Hennebelle T, Sahpaz S. and Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothér, 1; pp: 3-6.
- Hopkins W.G. (2003). Physiologie végétale. Ed n° 2 De Boec 12 Université P.
- Huang B., He J., Ban X., Zeng H., Yao X. and Wang Y. (2011). Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. Meat Science, 87, pp: 46-53.
- Jemai H., Bouaziza M., Fki I., El Feki A. and Sayadi S. (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. Chemico-Biological Interactions 176, pp: 88–98.
- Juven B.J., Kanner J., Schved F. and Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Journal of Applied Bacteriology, 76, pp: 626- 631.
- Kara M. et Khelil L. (2008). Etude anatomique - morphologique de l’olivier du Hoggare (*Olea laperrinei*). Mémoire DES (USTHB), 50 p. Alger.
- Karakaya S. (2009). Olive tree (*Olea europaea* leaves, potential beneficial effects on human health. Nutrition Reviews, 67 (11), pp: 632-638.
- Kim J., Marshall MR. and Wei C. (1995).Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. J.Agric. Food Chem. Vol. 43,pp: 2839-2845.
- Koane J.N., Syssa-Magale J.L. et Ouamba J.M. (2012). Études phytochimique et pharmacologique de quelques plantes médicinales Centrafricaines à propriétés antidiabétiques. Diabète ; 127 p.
- Korukluoglu M., Sahan Y. and Yigit, A., (2008). Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. Journal of Food Safety, 28 (1), pp: 76-87.
- Krief S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse de doctorat. Muséum national d’histoire naturelle.

- Labane S. et Tadala F. (2015). Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits bruts des feuilles de l'olivier sauvage (*Olea europaea* subsp. *sylvestris*), mémoire de master, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 33p.
- Lakhdar L. (2015). Évaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* :étude in vitro, thèse de doctorat, Université Mohammed V de Rabat, pp: 77-112.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P. and Nychas G.-J.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, pp: 453-462.
- Lee O.H. and Lee B.Y., (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101(10), pp: 3751-3754.
- Lee-Huang S., Zhang L., Lin Huang P., Chang Y.-T. and Huang P.L. (2003). Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 307; pp: 1029-1037.
- Loussert P. et Brousse H. (1978). Techniques agricoles et production méditerranéenne (Olivier). Ed. Maison Larousse, 500p.
- Macherix J. et Fleuriet A. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne, 20 p.
- Mahmoudi A., Ghorbela H., boualleguia Z., Marrekchib R., Isoda H. and Sayadi S. (2015). Oleuropein and hydroxytyrosol protect from bisphenol A effects in livers and kidneys of lactating mother rats and their pups, *Experimental and Toxicologic Pathology* 67; pp: 413-425.
- Maire R. (1933). Etude de la flore et de la végétation du Sahara central I et II. *Meni, Soc. Hist. Nat. Agr. Nord*, n° 3, mission du Hoggar II, 272p. (Cartes et planches). Alger.
- Masataka K., Nobuhiko K. and Tadakazu H. (2007), Antiallergic agent. Patent written in Japanese. JP2007182403 A 20070719. 8p.
- Maurice N. (1997). L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris, pp: 12-14.
- Mazzotti F., Benabdelkamel H., Di Donna L., Maiuolo L., Napoli A. and Sindona G. (2012). Assay of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil by tandem mass spectrometry and isotope dilution method, *Food Chemistry*. 135, pp: 1006-1010.
- Medina E., de Castro A., Romero C. and Brenes M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 54, pp: 4954-4961.

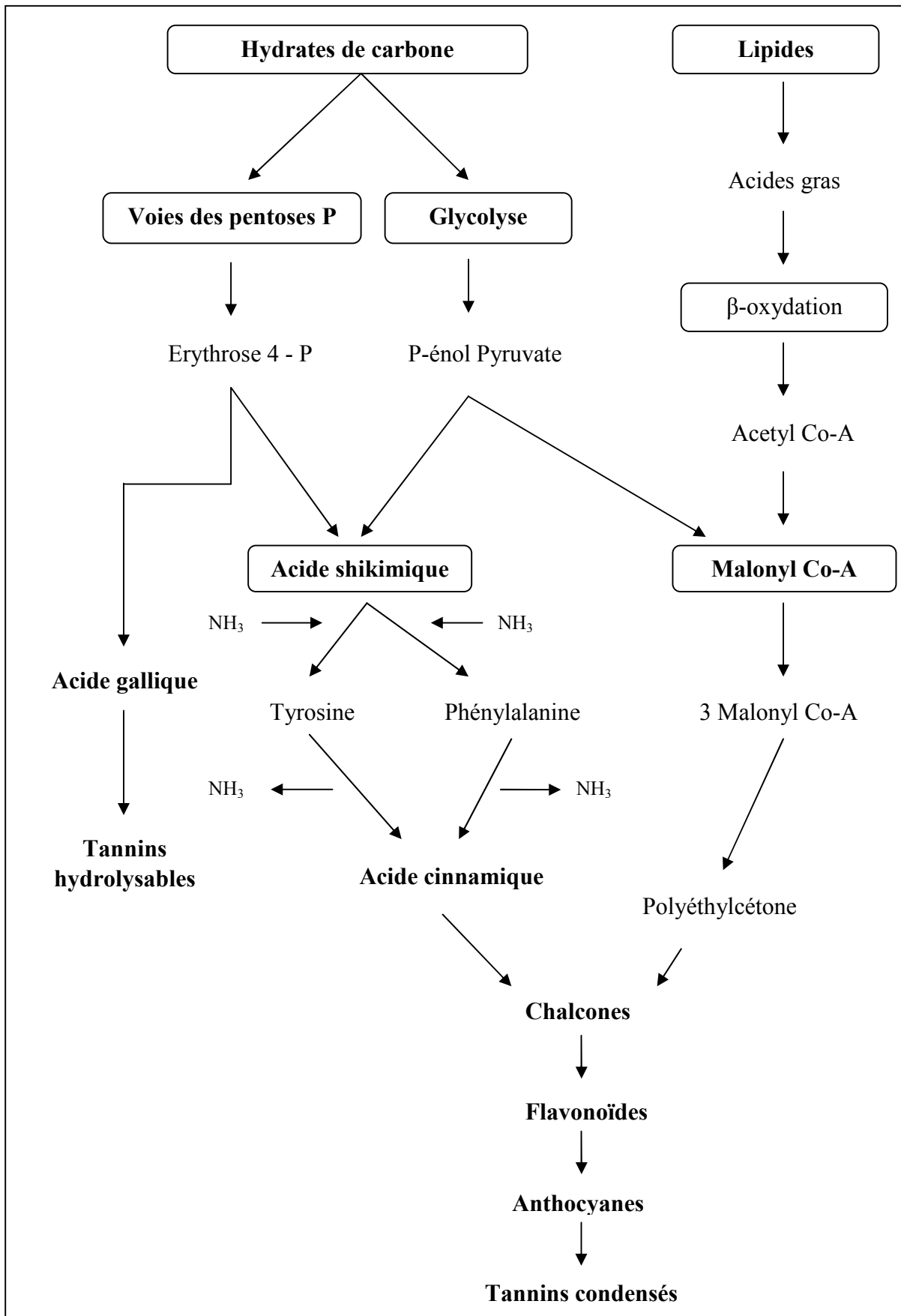
- Micol V., Caturla N., Pérez-Fons L., Más V., Pérez L. and Estepa, A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Res.*, 66(2-3), pp: 129-36.
- Miljkovic D., Dekanski D., Miljkovic E., Momcilovic M. and Mostarica-Stojkovic M. (2009). Dryhypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18(4), pp: 251-258.
- Mkaouar S., Bahloul N., Gelicus A., Allaf K. and Kechaou N. (2015). Instant controlled pressure drop texturing for intensifying ethanol solvent extraction of olive (*Olea europaea*) leaf polyphenols, *Sep. Purif. Technol.* 145, pp: 139-146.
- Mkaouar S., Gelicus A., Bahloul N., Allaf K. and Kechaou N. (2016). Kinetic study of polyphenols extraction from olive (*Olea europaea L.*) leaves using instant controlled pressure drop texturing, *Separation and Purification Technology* 161, pp: 165-171.
- Mohagheghi F., Bigdeli M. R., Rasoulbian B., Hashemi P. and Rashidi M.P. (2011). The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia *Phytomedicine*, 18 (2-3), pp: 170-175.
- Oosterhaven, K., Poolman B. and Smid E.J. (1995). S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products*, 4, pp : 23-31.
- Organisation mondiale de la santé (2003). *Principes méthodologie généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle.*
- Padua L.S., Bunyapraphatsara N. and Lemmens R.H.M.J. (1999). *Plant Resources of South-East Asia*, 12 p.
- Pereira A.P., Ferreira I.C., Marcelino F., Valentão P., Andrade P.B., Seabra R., Estevinho L., Bento A. and Pereira J.A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea L.* Cv. Cobrançosa) leaves, *Molecules* 12, pp: 1153-1162.
- Perrinjaquet-Moccetti T., Busjahn A., Schmidlin C., Schmidt A., Bradl B. and Aydogan C. (2008). Food supplementation with an olive (*Olea europaea L.*) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research*, 22, pp: 1239-1242.
- Polzonetti V., Egidi D. and Vita A. (2004). Involvement of oleuropein in digestive metabolic pathways. *Food Chemistry*. 88, pp: 1-15.
- Priya A. and Aparna S.(2012).Chemical profile studies on the secondary metabolites of medicinally important plant *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb) DC using HPTLC; 1293 p.
- Quezel P. (1962). A propos de l'olivier de Laperrine de l'Adrar Greboun : 329-332. In Berliet P., mission Berliet Ténére – Tchad. AMG. Paris, 377 p.
- Quezel P. (1997). High mountains of the central Sahara: dispersal, speciation, origin and conservation of the flora. In: reviews in ecology: Desert conservation and development, HN Barakat and AK Hegazy (eds), Metropole, Cairo, Egypt, pp: 159-175.

- Rastogi N. and David H.L. (1988). Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. *Biochimie*, 70, pp: 1101-1120.
- Rauwald H.W., Brehm O. and 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*. *Phytotherapy Research*, 8(3), pp: 135-40.
- Ribereau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed Dunod, Paris, 254p.
- Rubio de Casas R., Besnard G., Schoens wetter P., Balaguer L. and Vargas P. (2006). Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *olea europaea* L. *Theor. Appl. Genet.* 113, pp: 575-583.
- Sahki R., Boucheneb N. et Sahki A. (2004). Guide des principaux arbres et arbustes du Sahara central (Ahaggar et Tassili). Institut National de Recherche Forestière. 71 p.
- Sanogo R. (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie, Université de Bamak; 04 p.
- Savournin C., Baghdikian B., Elias R., Dargouth-Kesraoui F., Boukef K., and Balansard G., (2001). Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 49, pp: 618-621.
- Scheffler A., Rauwald H.W., Kampa B., Mann U., Mohr F.W. and Dhein S. (2008), *Olea europaea* leaf extract exerts L-type Ca²⁺ channel antagonistic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2),pp:233-240.
- Sikkema J., De Bont J.A.M. and Poolman B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (11), pp: 8022-8028.
- Singh I., Mok M., Christensen A.M., Turner A.H. and Hawley J.A. (2008). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 18, pp: 127-132.
- Somova L.I., Shode F.O., Ramnanan P. and Nadar A. (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves, *J. Ethnopharmacol.* 84, pp: 299-305.
- Sudjana A.N., D'Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Rileya T.V. and Hammera K.A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, pp: 461-463.
- Susalit E., Agus N., Effendi I., Tjandrawinata R.R., Nofiarny D., Perrinjaquet-Moccetti T. and Verbruggen M. (2011). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage; 1p.
- Tadashi U. (2006). Antiaging food compositions containing collagen, and their manufacture. Patent written in Japanese. Application: JP 2006191845 A 20060727, 7 p.

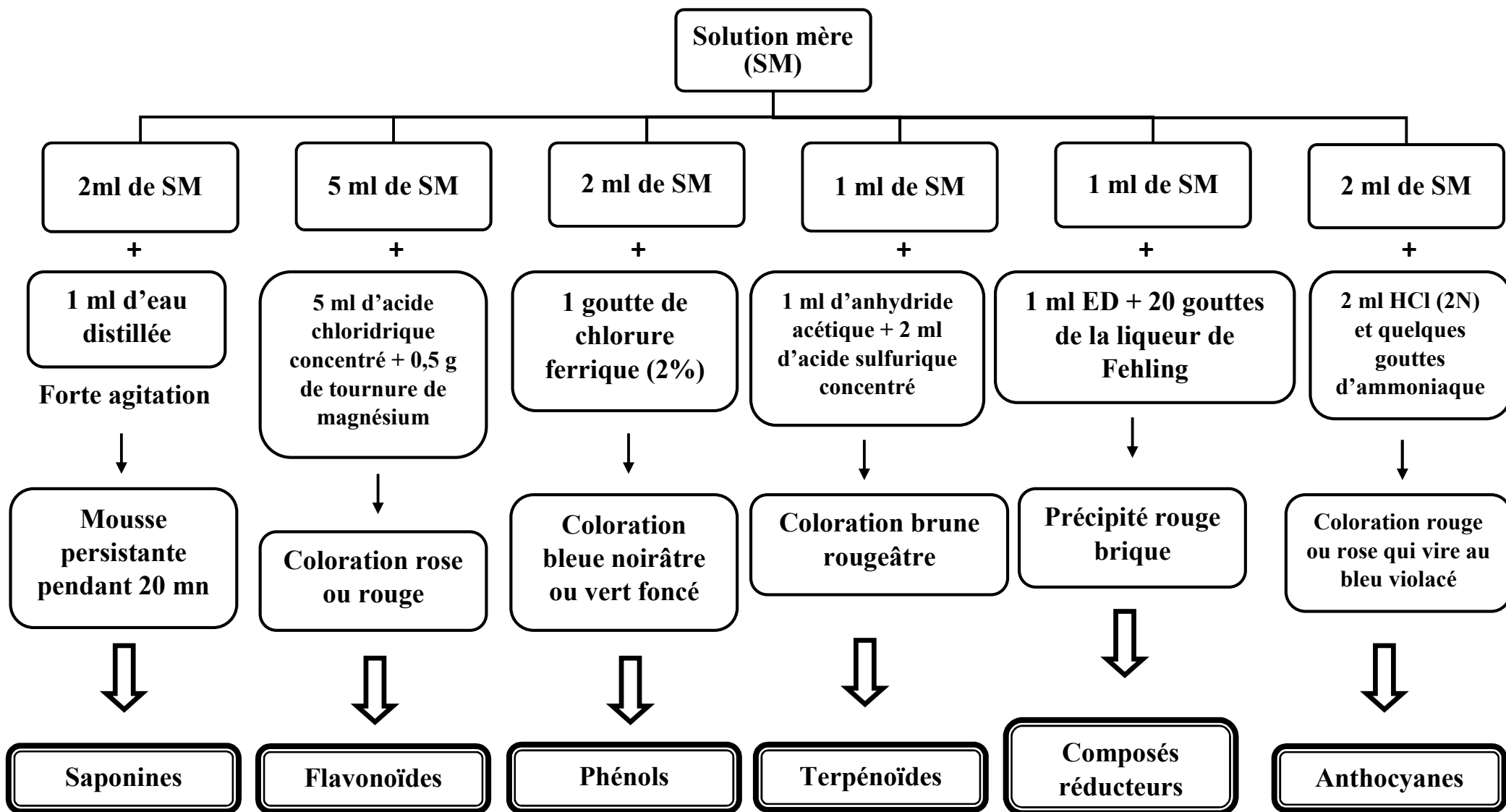
- Takeshi Y., Hiroshi S., Gustavo S., Naohide K. and Shuichi M. (2007). Food containing olive leaf extract and α -lipoic acid and prevention of diseases due to accumulation of advanced glycation end products with the food. Patent written in Japanese. JP 2006-167353 20060616. 7 p.
- Thomas D., Anemone T., Marianne W-L. and Armin W. (2006). Cosmetic and dermatological composition for the treatment of aging or photodamaged skin. Patent written in German. EP 2005-20052 20050915, 40 p.
- Trease E. and Evans W.C (1987). Pharmacognosie, Billiaire Tindall, London. 13th Ed, pp: 61-62.
- Ultee A., Bennink M.H.J. and Moezelaar R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (4), pp: 1561-1568.
- Ultee A., Kets E.P.W. and Smid E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10), pp: 4606- 4610.
- Vercautern J. (1996). Polyphénols 96. INRA, Paris, pp: 31-43.
- Vargas P., Munuz Garmendia F., Hess J. and Kadereit J.W (2001). *Olea europaea* ssp. *guanchica* and ssp. *maroccana* (oleaceae), two new names for olive tree relatives. *Ann. Jard. Bot. Madrid*, 58, pp: 360-361.
- Visioli F. and Galli C. (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 42, pp: 209-210.
- Visioli F., Bellosta S. and Galli C. (1998). Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages, *Life Sci*. 62, pp: 541-546.
- Visioli F., Poli A. and Galli C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*: 22, pp: 65–75.
- Wainstein J., Ganz T., Boaz M., Bar Dayan Y., Dolev E., Kerem Z. and Madar Z. (2013). Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Natural medicine*, pp: 01-477.
- Wendakoon C.N. and Sakaguchi M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Prot*. Vol. 58, pp: 280-283.
- Yusuf Y., 2006. Catechins in foods. *Trends Food Sci. Tech.*, 17, pp: 64-71.
- Zarzuelo A., Duarte J., Jiménez J., Gonzalez M. and Utrilla M.P., (1991). Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Medica*, 57(5), pp: 417-419.

ANNEXES

ANNEXE 1 : VOIE DES SHIKIMATES ET DE L'ACETATE (COLLIN ET CROUZET, 2011)



ANNEXE 2 : SCREENING PHYTOCHIMIQUE



ANNEXE 3 : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES

1. LIQUEUR DE FEHLING

Deux solutions aqueuses sont préparées et mélangées à part égale, pour former la liqueur de Fehling :

- Solution 1 : Environ 45 g de sulfate de cuivre (CuSO_4)
Ajuster à 1000 ml avec de l'eau distillée (solution saturée).
- Solution 2 : 200 g de sel de Seignette (tartrate de sodium et de potassium, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) et 150 g d'hydroxyde de sodium (NaOH)
Ajuster à 1000 ml avec de l'eau distillée.

2. MILIEU MUELLER-HINTON GELOSE (MH): POUR 1 LITRE

- Infusion de viande bovine 02.0g
- Hydrolysate acide de caséine 17.5g
- Amidon soluble 01.5g
- Agar agar 16.0g
Autoclaver 20 minutes à 120°C

3. BOUILLON CŒUR-CERVELLE (BHIB): POUR 1 LITRE

- Extrait cœur-cerveau 17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine 10,0 g
- Chlorure de sodium 05,0 g
- Phosphate di sodique 02,5 g
- Glucose 0,20 g

ANNEXE 4 : ANTIBIOGRAMMES

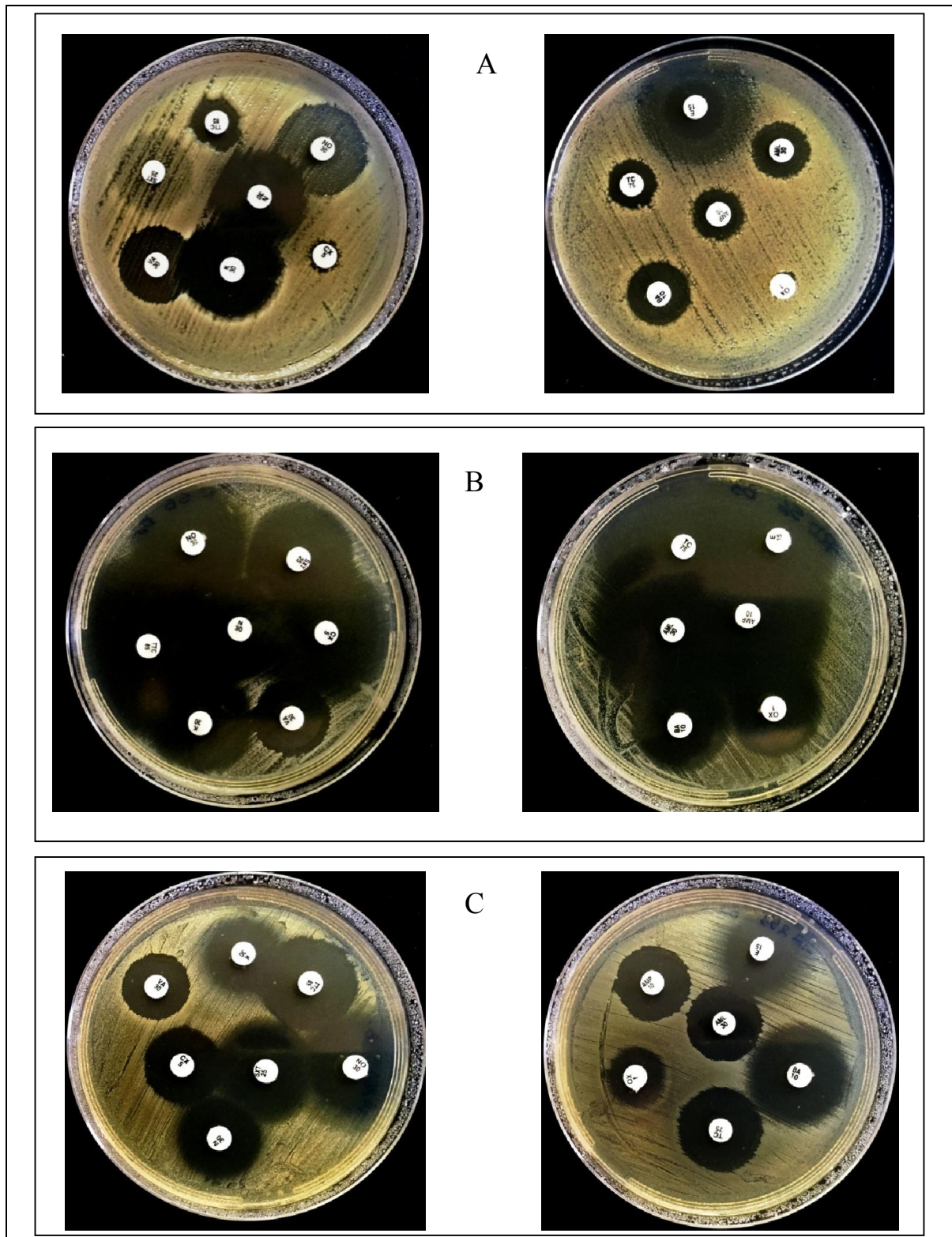


Figure 1 : Résultats de l'antibiogramme pour ; A : *Bacillus cereus* ;B : *Staphylococcus aureus FRI S6* ;C : *Staphylococcus aureus LGA 251*

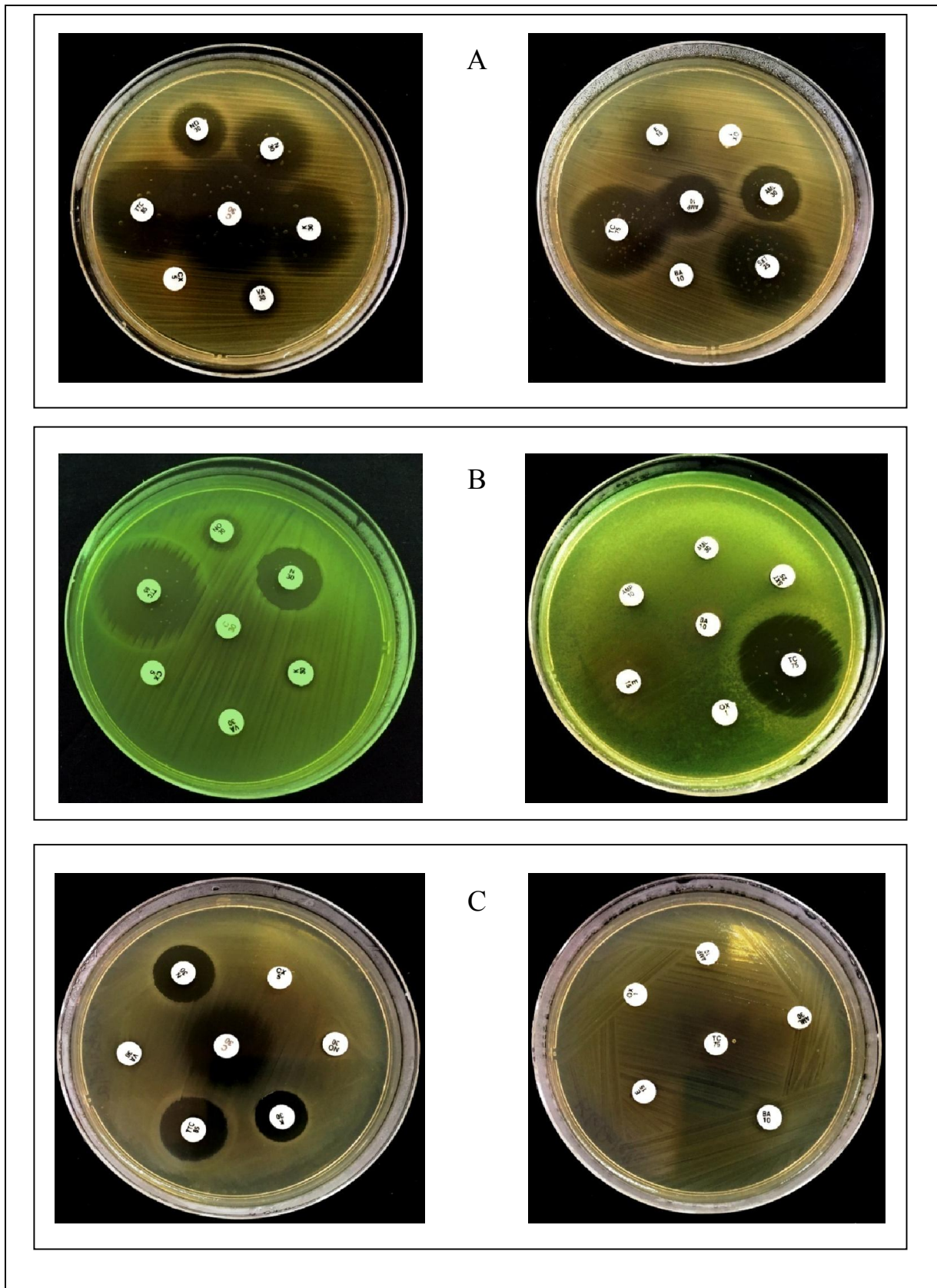


Figure2 : Résultats de l'antibiogramme pour ; A : *Escherichia coli* 25922 ; B : *Pseudomonas aeruginosa*; C : *Klebsiella pneumoniae* 700600

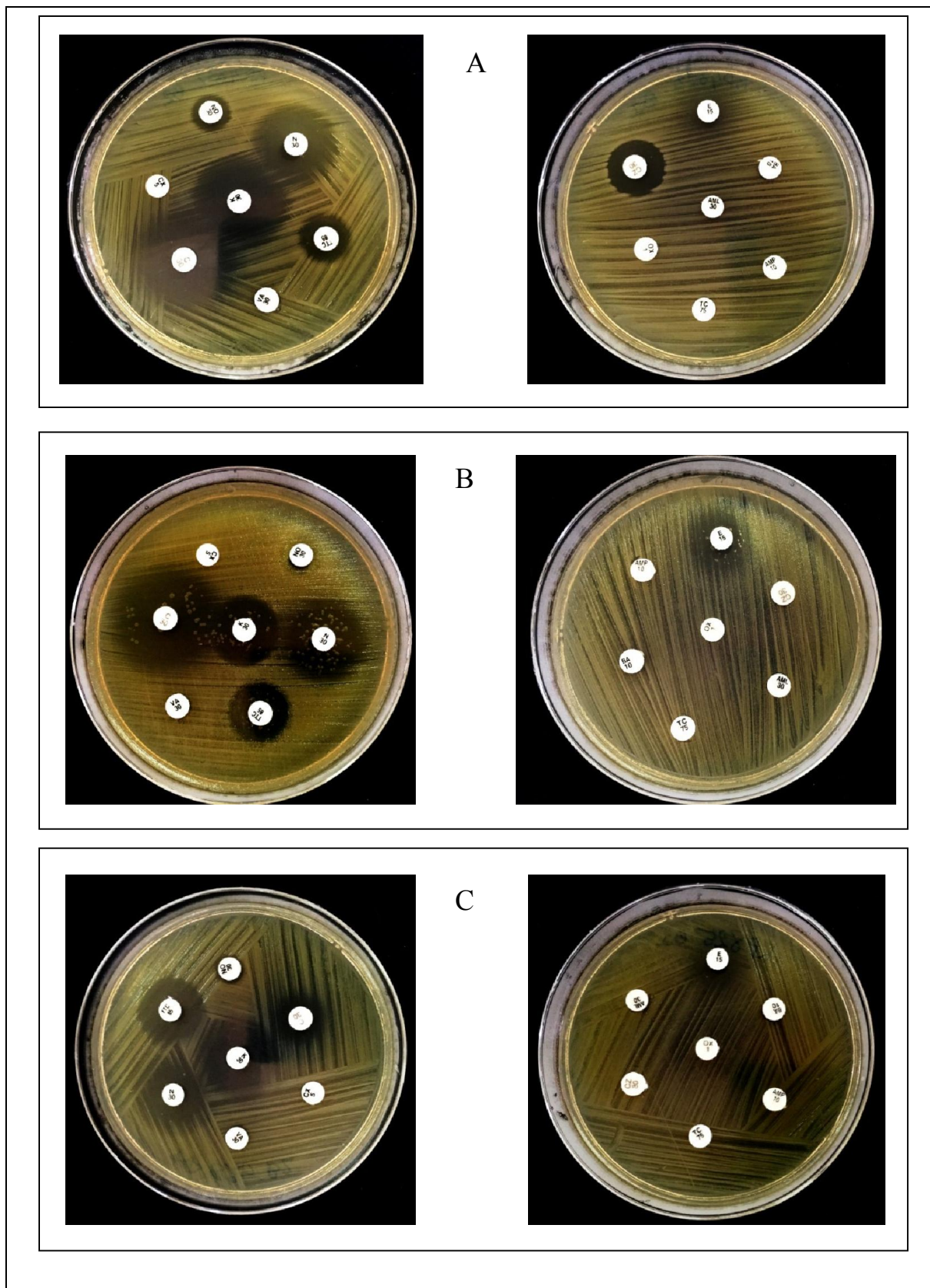


Figure 3 : Résultats de l'antibiogramme pour ; A : *Klebsiella pneumoniae* 4352 ; B : *Klebsiella pneumoniae* 1766; C : *Klebsiella pneumoniae* 825

ANNEXE 5: ANALYSE STATISTIQUE

5.1. ANALYSE DES DIAMETRES D'INHIBITION

5.1.1. COMPARAISON «DIAMÈTRES-CONCENTRATIONS»

- >kruskal.test(Diamètres~Concentrations)

- Kruskal-Wallis rank sum test

Data: Diamètres by Concentrations

Kruskal-Wallis chi-squared = 14.4587, df = 2, p-value = 0.000725

GROUPES HOMOGENES

Groups	Treatments	Mean of the ranks
a	C3	97.7
ab	C2	83.07
b	C1	63.72

5.1.2. COMPARAISON «DIAMÈTRES-SOUCHES»

- >kruskal.test(Diamètres~Souches)

- Kruskal-Wallis rank sum test

Data: Diamètres by Souches

Kruskal-Wallis chi-squared = 121.4482, df = 9, p-value < 2.2e-16

GROUPES HOMOGENES

Groups	Treatments	Mean of the ranks
a	FRI	144.1
a	LGA	137
a	Pseudo	121.2
b	Bacillus	90.67
c	E.coli	60.19
c	KP825	51.81
c	KP700600	49.94
c	KP4352	42.61
c	KP1766	36

5.1.3. COMPARAISON «DIAMÈTRES-EXTRAITS»

- >kruskal.test(Diamètres~Extraits)

- Kruskal-Wallis rank sum test

Data: Diamètres by Extraits

Kruskal-Wallis chi-squared = 14.0939, df = 1, p-value = 0.0001739

GROUPES HOMOGENES

Groups	Treatments	Mean of the ranks
a	EE	95.24
b	EA	67.76

5.2. ANALYSE DE LA CMI

5.2.1. COMPARAISON «CMI-SOUCHES»

- Kruskal-Wallis rank sum test

Data: CMI by souches

Kruskal-Wallis chi-squared = 18.9065, df = 8, p-value = 0.01537

GROUPES HOMOGENES

- Kruskal-Wallis test's

- Ties or no Ties

Groups	Treatments	Mean of the ranks
a	E.coli	49.5
ab	KP4352	34.83
ab	FRI	29.58
ab	LGA	25.75
ab	Pseudo	24.5
ab	KP825	23.33
b	KP700600	21.92
b	Bacillus	20
b	KP1766	18.08

5.2.2. COMPARAISON «CMI-EXTRAITS»

- Kruskal-Wallis rank sum test

Data: CMI by extraits

Kruskal-Wallis chi-squared = 7.2606, df = 1, p-value = 0.007048

GROUPES HOMOGENES

- Kruskal-Wallis test's
- Ties or no Ties

Groups	Treatments	Mean of the ranks
a	EE	33.15
b	EA	21.85

RESUME

Olea europaea subsp. *laperrinei* est une Oleaceae endémique des régions montagneuses du Sahara central, largement utilisée par les touaregs. Les feuilles de cette plante ont été soumises à diverses extractions à savoir : l'extraction aqueuse et ethanologique. Le présent travail a pour but de tester l'efficacité de ces extraits de feuilles de cette sous espèce vis-à-vis de souches bactériennes de référence et multirésistantes.

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les extraits aqueux et ethanologique a montré la présence de saponines, de tanins, de phénols, de composés réducteurs, de terpénoïdes et de flavonoïdes.

Le pouvoir antibactérien a été évalué par la méthode de diffusion sur gélose et confirmé par la méthode de microdilution (CMI) vis-à-vis de neuf souches bactériennes. Les composés de ces extraits se sont révélés actifs vis-à-vis de l'ensemble des bactéries testées. Cependant, une forte activité de l'extrait ethanologique est notée dans le cas de *S. aureus* FRI S6, *S. aureus* LGA 251 et *P. aeruginosa*. L'extrait aqueux présente une bonne activité vis-à-vis de ces mêmes souches bactériennes.

Mots clé: Olivier de Laperrine, métabolites secondaires, screening phytochimique, activité antibactérienne, CMI.

SUMMARY

Olea europaea subsp. *laperrinei* is an endemic Oleaceae of mountainous regions of the central Sahara, widely used by Tuareg. The leaves of this plant have been subjected to various extractions: aqueous extraction and ethanolic extraction. This research was conducted to evaluate the effectiveness extracts leaves towards bacterial strains (reference and multi-resistant).

The qualitative phytochemical test realized on the aqueous and ethanolic extracts showed that there is saponins, tannins, phenols, reducing compounds, terpenoids and flavonoids.

The antimicrobial effect of these compounds has been determined via the diffusion method on agar and was confirmed by the microdilution method (Minimum Inhibitory Concentrations: MICs) against nine bacterial strains. The compounds of these extracts have been highly active against all bacteria tested. However, ethanolic extract has demonstrated a much greater activity against *Staphylococcus aureus* FRI S6, *Staphylococcus aureus* LGA 251 and *Pseudomonas aeruginosa*. The aqueous extract shows a good activity against these same bacterial strains.

Keywords: Laperrine's olive tree, secondary metabolites, phytochemical test, Antimicrobial activity, MICs.