

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou**

**Faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques**



**Mémoire de fin de cycle**

**En vue de l'obtention du diplôme de master en Sciences Biologiques** Domaine:

**Microbiologie-Biochimie**

**Spécialité: Microbiologie Appliquée**

## **Thème**

**Analyse quantitative et évaluation des activités antioxydantes d'extrait de  
graines et Evaluation des activités antibacterienne et antibiofilms des  
extraits bruts de feuilles l'olivier de Laperrine *Olea europaea*  
subsp. *laperrinei* (Batt. et Trab.) Cifferi sur deux souches bactériennes**

**Présenté par**

**BERKAL Djouher  
GUENDOUL Tefiles Nadia  
ROUANE Amghar Katia**

**Devant le jury**

**Président du jury : M<sup>me</sup> AICHE IRATNI G.**

**Promotrice : M<sup>me</sup> LAHCENE S.**

**Co- Promoteur : M<sup>r</sup> MSELA A.**

**Examinatrices : M<sup>me</sup> MEGUENNI N.**

**M<sup>me</sup> GUECHAOUI MESTAR N.**

**Maitre de conférences UMMTO**

**Année universitaire 2021 - 2022**



## Remerciements

*Au terme de ce travail, nous tenons à témoigner notre profonde gratitude au professeur Houali K. de l'UMMTO pour nous avoir ouvert les portes de son laboratoire de recherche LABAB et d'avoir mis à notre disposition tous les moyens qui ont grandement contribué à la réalisation de notre expérimentation dans de bonnes conditions. Merci Pr Houali pour nous avoir soutenus, encouragés et tant appris.*

*Nous remercions le docteur Aiche-Iratni G., maitre de conférences à l'UMMTO, de nous faire l'honneur de présider le jury qui va examiner ce travail.*

*Nous remercions doublement le docteur Megueni N., maitre de conférences à l'UMMTO de nous avoir fait bénéficier de ses précieux conseils et d'avoir pris sur son temps pour nous aider dans notre travail. Nous lui exprimons toute notre gratitude pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous tenons à remercier le docteur Mestar-Guechaoui N. maitre de conférences à l'UMMTO et à lui exprimer notre gratitude pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous remercions notre promotrice, le docteur Lahcene S. maitre de conférence à l'UMMTO pour le temps qu'elle a consacré à nous apporter les outils méthodologiques qui ont été indispensables à la conduite de notre expérimentation. Nous lui sommes grandement reconnaissantes pour toutes ses explications, sa disponibilité et ses précieux conseils et orientations. Son exigence nous a grandement stimulés.*

*Nous remercions notre co-promoteur, le docteur Msela A., maitre de conférences à l'UMMTO pour son orientation, ses directives et ses conseils qui nous ont aidés à faire aboutir ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent au docteur Sebbane H., au docteur Bariz K., au docteur Titouche Y. et au docteur Dermeche S. pour leur précieuse aide. Chacun de nos échanges nous a aidés à faire avancer notre travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de notre gratitude.*

*Nous remercions chaleureusement Mme Amar Khodja N., pour avoir eu la patience et la gentillesse de répondre à nos innombrables requêtes.*

# *Dédicaces*

*A travers ce modeste travail, je tiens à rendre un grand hommage à mon père  
paix à son âme, pour qui je dédie toutes les réussites de ma vie, tout le  
mérite lui revient, pour son soutien indéfectible, je ne le remercierais jamais  
assez pour m'avoir appris à relever la tête quoi qu'il arrive et qui a fait des  
études une priorité dans notre famille.*

*A ma mère, pour sa patience, son soutien et son amour pour moi ; ô combien  
je la comprends maintenant que je suis maman.*

*A MEHANNA, mon mari, mon âme-sœur, pour ses encouragements son  
aide si précieuse dans toutes les épreuves de ma vie je te remercie pour  
m'avoir permis de revenir sur le chemin des études.*

*A celles qui ont redonné un sens à ma vie, mon cœur ne bat que pour vous  
aimer plus fort, à mes filles ELENA et ANAIS que dieu vous garde pour  
nous.*

*A ma deuxième mère ; ma grande sœur Fatima, pour ton aide et pour  
l'amour que tu portes envers mes filles.*

*A mes sœurs, lila, kahina et linda, mon petit frère Aghiles sans oublier mes  
petites nièces SOFIA, SARAH, NADINE.*

*A toute ma famille, belle-famille, amies, collègues et toutes les personnes qui  
ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.*

*Tefiles Nadia*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A ma cher mère pour son amour, ses encouragement et ses sacrifices.*

*A mon père, pour son soutien ,son affection et la confiance qu'il m'a accordé*

*A mes chers frères, ma sœur, ma grand-mère, pour leur appui et leur encouragement durent tout au long de mon parcours éducatifs*

*A mon cher mari que je trouve toujours à mes cotés*

*A la mémoire de mes beaux parents qui sont partie trop tôt, que dieu leur accorde le paradis*

*A tous mes amis et tous ceux qui m'aiment*

*Que ce travaille soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible, merci d'être toujours là pour moi.*

*Katia*

# *Dédicaces*

*Je tiens avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail*

*A l'être la plus cher de ma vie, ma mère.*

*A celui qui a fait de moi une femme, mon père.*

*A mes deux chers frères*

*Sans oublier ma cher grande mère, mes amis et tous ce qui m'aiment*

*Sarah*

### Résumé

L'objectif de la présente étude est de déterminer la teneur en composés phénoliques totaux et d'évaluer l'efficacité antioxydante des extraits aqueux de graine d'olive de l'olivier de laperrine ainsi que l'activité antibactérienne et antibiofilms des extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de l'olivier de laperrine. La teneur en polyphénols totaux a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu, les résultats obtenus ont montré que les graines d'olivier présentent une teneur en polyphénols de l'ordre de  $42.38 \pm 6,56$  mg EAG/g RS, la teneur en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode du trichlorure d'Aluminium et on a enregistré une teneur de l'ordre de  $1.00 \pm 0,87$  mgEQ/g RS, enfin, le dosage des tanins totaux a été effectué selon la méthode basée sur la formation du complexe Protéine-Tannin et la valeur enregistrée est de l'ordre de  $3.13 \pm 0,47$  mgEAT/g RS. L'activité antioxydante a été évaluée par le test du phosphomolybdate et a révélé que l'extrait aqueux de la graine d'olivier donne une valeur de  $58.25 \pm 1,75$  mg EAA/g RS. Par ailleurs, la IC50 obtenue au cours du test FRAP correspond à la valeur de  $1021.25 \pm 11,36$  µg/ml. L'activité antimicrobienne des feuilles de l'olivier a été déterminée selon la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis de *Escherichia coli* ATCC 25922 et de *Staphylococcus aureus* LGA 251 sur milieu MH pour l'activité antibactérienne, et sur milieu rouge congo agar pour l'activité antibiofilms vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* LGA 251. Les résultats ont montré que les deux extraits aqueux et éthanolique des feuilles d'olivier inhibent la croissance des colonies bactérienne et du biofilms.

### Abstract

The objective of the present study is to determine the content of total phenolic compounds and to evaluate the antioxidant efficacy of aqueous extracts of olive seed from the laperrine olive tree as well as the antibacterial and antibiofilm activity of aqueous and ethanol from the leaves of the Laperrine olive tree. The content of total polyphenols was determined according to the Folin-Ciocalteu method, the results obtained showed that the olive seeds have a polyphenol content of the order of  $42.38 \pm 6.56$  mg EAG / g RS, the content in flavonoids was determined according to the aluminum trichloride method and a content of the order of  $1.00 \pm 0.87$  mgEQ/g RS was recorded, finally, the dosage of total tannins was carried out according to the method based on the formation of the Protein-Tannin complex and the value recorded is of the order of  $3.13 \pm 0.47$  mgEAT/g RS. The antioxidant activity was evaluated by the phosphomolybdate test and revealed that the aqueous extract of the olive seed gives a value of  $58.25 \pm 1.75$  mg EAA / g RS. Furthermore, the IC50 obtained during the FRAP test corresponds to the value of  $1021.25 \pm 11.36$  µg/ml. The antimicrobial activity of olive leaves was determined using the agar diffusion method against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* LGA 251 on MH medium for antibacterial activity, and on Congo red medium. agar for antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* LGA 251. The results showed that both aqueous and ethanolic extracts of olive leaves inhibit the growth of bacterial colonies and biofilm.

## الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد محتوى المركبات الفينولية الكلية وتقييم فعالية مضادات الأكسدة للمستخلصات المائية لبذور الزيتون من شجرة زيتون لايبيرين وكذلك النشاط المضاد للبكتيريا والمضاد الحيوي للغشاء المائي والإيثانول من أوراق لايبيرين. شجرة زيتون. تم تحديد محتوى البوليفينول الكلي وفقاً لطريقة Folin-Ciocalteu ، وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن بذور الزيتون تحتوي على مادة البوليفينول بترتيب  $6.56 \pm 42.38$  مجم EAG / جم RS ، تم تحديد محتوى الفلافونويد وفقاً للألمنيوم تم تسجيل طريقة ثلاثي كلوريد ومحتوى بترتيب  $0.87 \pm 1.00$  مجم EQ / جم RS ، وأخيراً ، تم تنفيذ جرعة التانين الكلية وفقاً للطريقة المعتمدة على تكوين مركب البروتين - التانين والقيمة المسجلة هي من ترتيب  $0.47 \pm 3.13$  ملغ / غرام RS. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باختبار الفوسفوموليبيدات وكشف أن المستخلص المائي لبذور الزيتون يعطي قيمة  $1.75 \pm 58.25$  مجم EAA / جم RS. علاوة على ذلك ، فإن IC50 الذي تم الحصول عليه أثناء اختبار FRAP يتوافق مع قيمة  $11.36 \pm 1021.25$  ميكروغرام / مل. تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات لأوراق الزيتون باستخدام طريقة انتشار الأجار ضد الإشريكية القولونية ATCC 25922 والمكورات العنقودية الذهبية LGA 251 على وسط MH للنشاط المضاد للبكتيريا ، وعلى وسط أحمر الكونغو أجار لنشاط المضاد الحيوي ضد المكورات العنقودية الذهبية LGA 251. كل من المستخلصات المائية والإيثانولية لأوراق الزيتون تمنع نمو المستعمرات البكتيرية والأغشية الحيوية.

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> L'olivier de Laperrine (Photo Dr Lahcene, 2022).....	6
<b>Figure 2:</b> Distribution naturelle du complexe d'Olea europaea dans le monde (Rubio de casas et al.2006).....	7
<b>Figure 3 :</b> Caractères morphologiques des feuilles de l'olivier de Laperrine <b>A :</b> Disposition opposée des feuilles (Baali-Cherif, 2007) ; <b>B :</b> Face supérieure et face inférieures des feuilles (Dr Lahcene, 2022).....	9
<b>Figure 4 :</b> Représentation des fleurs de l'olivier de Laperrine ; <b>A :</b> Dans son milieu naturel ; <b>I :</b> Inflorescence ; <b>F :</b> Fleur (Photo Dr Lahcene, 2022). <b>B :</b> Coupe longitudinale la fleur (Baali-cherif, 2007) .....	9
<b>Figure 5 :</b> Représentation du fruit de l'olivier de Laperrine ; <b>A :</b> Etat immature ; <b>B :</b> Etat mature. ; <b>C :</b> Graines (Photo Dr Lahcene, 2022).....	10
<b>Figure 6 :</b> Les différents ERO (Favier, 2006) .....	12
<b>Figure 7:</b> Déséquilibre de la balance entre oxydants et antioxydants provoquant le stress oxydant (Rahman et al., 2012).....	13
<b>Figure 8:</b> Structure des bases des flavonoïdes (Collin et Crouzet, 2011).....	15
<b>Figure 9:</b> Structure de différentes familles d flavonoïdes.....	15
<b>Figure 10 :</b> Les différentes étapes de l'extraction.....	23
<b>Figure 11 :</b> Courbe de régression de l'acide ascorbique.....	34
<b>Figure 12 :</b> Capacité de réduction du fer par l'extrait de graine.....	35
<b>Figure 13</b> Résultats des tests antibactérien EA, EE de <i>E.coli</i> et <i>S.aureus</i> . C1 :0,6g/ml ; C2 :0,4g/ml ; C3 : 0,2 g/ml .....	38
<b>Figure 14:</b> Résultats de la CMI des extraits aqueux et éthanolique sur <b>A :</b> <i>E.coli</i> ATCC 25992, <b>B :</b> <i>S. aureus</i> LGA 251 .....	39
<b>Figure 15 :</b> Production de slime chez <i>Staphylococcus aureus</i> isolé sur milieu rouge congo. 40	40
<b>Figure 16:</b> Résultats de l'activité antibiofilm des extrait aqueux et éthanolique de feuilles de l'olivier de Laperrine les zones d'inhibitions sont exprimées en mm (souche productrice de biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> LGA 251) .....	41

**Figures 17** : Résultats de l'activité antibiofilm des extraits EA et EE .....42

---

**Liste des tableaux**

<b>Tableau I</b> : Sous-espèces du complexe taxonomique <i>Olea europaea</i> (Green, 2002) .....	7
<b>Tableau II</b> : Position systématique de l'olivier de Laperrine .....	8
<b>Tableau III</b> : Les principales classes des composés phénoliques (Boubekri, 2014).....	14
<b>Tableau IV</b> : Résultats des différents dosages .....	32
<b>Tableau V</b> : Comparaison des résultats du test FRAP de EAG avec ceux obtenus à partir des extraits de feuilles, de tiges et de fruits de l'olivier de Laperrine .....	35
<b>Tableau VI</b> : Résultats de la coloration de Gram et des tests d'identification biochimiques des souches.....	36
<b>Tableau VII</b> : Le degré de sensibilité des bactéries testées en fonctions des concentrations	37
<b>Tableau VIII</b> : Résultats de l'inhibition de la CMI.....	39
<b>Tableau VIII</b> : Résultat de l'inhibition de la formation du biofilm par les extraits aqueux et éthanolique... ..	40

**Sommaire**

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	3
Chapitre I : synthèse bibliographique.....	5
Première partie : Généralité sur l'olivier de Laperrine	
1.Caractéristiques générales de l'olivier de Laperrine .....	6
1.1. Classification.....	8
1.2. Description botanique.....	8
1.2.1. Appareil végétatif.....	8
1.2.2. Appareil reproducteur .....	9
Deuxième partie : Généralités sur les ROS et les polyphenols	
1. Généralités sur les radicaux libres .....	12
2. Généralités sur les polyphénols.....	13
2.1.Les flavonoides.....	14
2.1.1.Rôle des flavonoides.....	15
2.2.Les tanins .....	16
2.2.1.Les tanins hydrolysables .....	16
2.2.2.Les tanins condensés.....	16
2.2.3.Rôle des tanins .....	16
3. Activités biologiques des oliviers et leurs extraits .....	17

Troisième partie : Activité anti-bactérienne et anti-biofilm

## Sommaire

---

1. Introduction...	19
2. Définition du biofilm .....	19
3. Croissance et maturation du biofilm.....	19
4. Définition et rôle de l'EPS .....	20
Chapitre II : Matériels et MéthodeS .....	22
2.1. Matériel.....	22
2.1.1. Matériel végétal .....	22
2.1.2. Matériel microbien.....	22
2.2. Méthodes.....	22
2.2.1. Procédure d'extraction.....	22
2.2.2. Activité antioxydantes de l'extrait de graines.....	24
2.2.2.1. Analyse quantitative .....	24
2.2.2.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	24
2.2.2.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux.....	24
2.2.2.1.3. Détermination de la teneur en tanins totaux.....	25
2.2.2.2. Activité antioxydante .....	25
2.2.2.2.1. Capacité antioxydante totale ou test du phosphomolybdate .....	25
2.2.2.2.2. Détermination du pouvoir réducteur.....	25
2.2.3. Activité antibactérienne et activité antibiofilm des extraits de feuilles... ..	26
2.2.3.1. Activité antibactérienne .....	26
2.2.3.1.1. Coloration de Gram et tests biochimiques .....	26
*Test de la catalase .....	26
** Test de la DNase.....	26
*** Test TSI.....	27

## Sommaire

---

2.2.3.1.2.Préparation de l'inoculum.....	27
2.2.3.1.2.1.Préparation de la pré-culture .....	27
2.2.3.1.2.2.Préparation de la suspension bactérienne .....	27
2.2.3.1.3.Préparation des échantillons .....	27
2.2.3.1.4.Lecture .....	28
2.2.3.1.5.Détermination de la CMI .....	28
2.2.3.1.5. 1.Préparation de l'inoculum bactérien et sa distribution... ..	28
2.2.3.1.5. 2. Lecture.....	28
2.2.3.2. Activité antibiofilm .....	28
2.2.3.2.1.Préparation de l'inoculum bactérien et sa distribution... ..	29
2.2.3.2.2.Criblage de la production de biofilms sur Gélose Rouge Congo.....	29
2.2.3.2.3. Etude de l'activité antibiofilm et détermination de la CMI .....	29
2.2.3.2. 3.1 .Préparation de l'inoculum bactérien et sa distribution.....	29
2.2.3.2.3.2.Distribution sur RCA.....	30
2.2.3.2.3.3.lecture .....	30
Chapitre III : Résultats et discussion .....	32
3.1.Dosages.....	32
3.1.1.Dosage des polyphénols totaux.....	32
3.1.2.Dosage des flavonoides totaux .....	33
3.1.3 .Dosage des tanins totaux.....	33
3.2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	34

## Sommaire

---

3.2.1.Capacité antioxydante totale.....	34
3.2.2 . Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium (FRAP) .....	35
3.3. Activité antibacterienne .....	35
3.3.1Vérification de la pureté des souches bactériennes .....	36
3.3.2.Test de diffusion sur milieu solide .....	36
3.3.3.Detérmination de la CMI.....	38
3.4.Activité antibiofilm... ..	39
3.4.1.Evaluation de la formation de biofilm.....	40
3.4.2.Evaluation de l'activité antibiofilm des extraits aqueux et éthanolique de feuilles de l'olivier de laperrinedetérmination de la CMI .....	40
Conclusion.....	44
Références bibliographiques .....	45

# **Introduction générale**



### Introduction

Le Sahara est le plus grand désert du monde, il couvre plus de 9.4 millions km<sup>2</sup> d'Afrique du nord. Le nombre d'espèces qu'il comprend est limité, mais quelques taxons endémiques sont signalés dans ces montagnes sahariennes dont l'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *Laperrinei*). Cet arbre appartient à la famille des *Oleaceae*, il est caractérisé par sa grande résistance aux conditions climatiques extrêmes auxquelles il est soumis telles que les températures élevées, exposition solaire soutenue et la sécheresse (Besnard et al., 2012). Cela a pour conséquence la biosynthèse des métabolites secondaires, ces derniers jouent un rôle important dans la capacité adaptative de la plante à son milieu.

L'utilisation abusive des antibiotiques est devenue de nos jours un réel problème dû à l'apparition d'une multi-résistance chez les bactéries. Certaines bactéries manifestent même une résistance totale à toute thérapie antibiotique. Ainsi la recherche de nouvelles molécules comme alternative aux molécules chimiques fait appel aux biomolécules végétales à effet antibactériens. Par ailleurs, lors de leur attachement à un support biotique ou abiotique, les biofilms sont impossibles à éradiquer. L'inhibition de leur formation devient de plus en plus difficile en raison de l'antibiorésistance des bactéries. Parmi les souches bactériennes formatrices de biofilms, nous citons *Staphylococcus aureus* qui peut causer des dangers mortels dans les milieux hospitaliers. Dans le but de remédier à ce problème, les recherches s'orientent vers les molécules biologiques d'origine végétale.

L'olivier est reconnu pour ses innombrables vertus pour la santé humaine, et pour sa richesse en composés phénoliques qui représentent l'une des principales classes des métabolites secondaires. Ils ont un grand pouvoir antioxydant, ils sont anticancéreux, antimicrobiens, jouent un rôle important, dans la lutte contre les maladies cardiovasculaires, inflammatoires... (Guillouty, 2016). Par ailleurs, ils jouent un rôle important en tant qu'anti-biofilms.

Les polyphénols exercent une activité antioxydante par leur capacité à piéger les espèces radicalaires et la chélation des métaux de transition tels que le fer et le cuivre, ce qui entraîne une inhibition de la réaction de Fenton et par conséquent la formation de radicaux libres dans les milieux physiologiques (Pietta, 2000). Ainsi, l'exploitation des biomolécules constitutives des extraits de plantes devient une alternative thérapeutique incontournable aux molécules synthétiques de par leurs effets secondaires limités ou inexistantes. Leur étude est parmi les objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Notre travail consiste à caractériser l'extrait aqueux des graines d'*Olea europaea* subsp. *laperrinei* à travers une analyse quantitative et une évaluation de deux activités antioxydantes (CAT et FRAP). Ce travail est complété par une évaluation de l'activité anti-bactérienne et anti-biofilms des extraits aqueux et éthanolique obtenus à partir des feuilles.

Notre mémoire est structuré en trois chapitres :

- Le chapitre I illustre la description botanique et écologique de l'olivier de Laperrine, donne des généralités sur les radicaux libres et les composés phénoliques et définit les biofilms.
- Le chapitre II au niveau duquel nous résumons l'ensemble des techniques sur lesquelles se base notre expérimentation.
- Dans le chapitre III, nous discutons les résultats obtenus.

Nous terminons notre discussion par une conclusion générale et la présentation de quelques perspectives.

# **Chapitre I**

## **Synthèse bibliographique**

**Première partie**  
**Présentation de l'olivier de**  
**Laperrine**

## 1. Caractéristiques générales de l'olivier de Laperrine

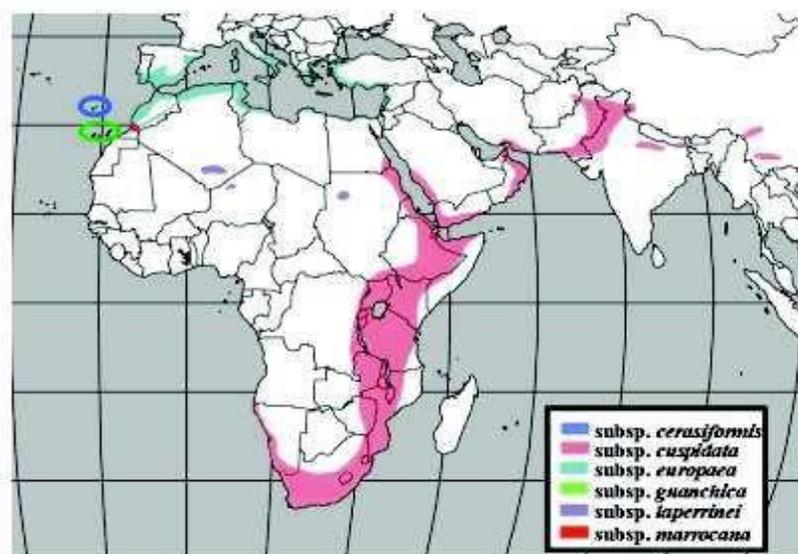
*Olea europaea* subsp. *laperrinei*, ou olivier de Laperrine, est une sous-espèce d'olivier appartenant à la famille des *Oleaceae*. Elle est endémique des régions montagneuses du Sahara central (Baali-Cherif et *al.*, 2007).

En Algérie, elle (Fig. 1) est présente dans les massifs du Hoggar, du Mouydir, du Tafedest et du Tassili n'Ajjer. Les populations de ce taxon relique sont en régression depuis les changements climatiques du Pléistocène. De plus, cette sous-espèce n'a montré aucune trace récente de régénération naturelle, et de ce fait, elle est menacée localement de disparition (Baali-Cherif et *al.*, 2007).



**Figure 1** : L'olivier de Laperrine (Photo Dr Lahcene, 2022).

Selon Green (2002), l'olivier de Laperrine appartient au complexe *Olea europaea* localisé principalement dans la région montagneuse du Sahara central dans lequel nous comptons six sous-espèces (Fig. 2; Tab. 1). Il est présent depuis l'Afrique du sud jusqu'en Chine, en Méditerranéen, en Macaronésie et enfin dans les montagnes Sahariennes (Besnard, 2009).



**Figure 2:** Distribution naturelle du complexe d'*Olea europaea* dans le monde (Rubio de casas et al.2006).

**Tableau I :** Sous-espèces du complexe taxonomique *Olea europaea* (Green, 2002).

Sous-espèces de l' <i>Olea europaea</i>	Localisation
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i>	caractéristique du bassin méditerranéen dont la variété cultivée (var. <i>europaea</i> ) est l'olivier et dont les variétés sauvages (var. <i>sylvestris</i> ) sont désignées sous le nom d'oléastre.
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>cuspidata</i>	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.
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>cerasiformis</i>	endémique de Madère
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>guanchica</i>	endémique des îles canaries
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>laperrinei</i>	présente dans les montagnes sahariennes (Battandier et Trabut, 1911)
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>marroccana</i>	représentée par une population isolée du haut Atlas marocain (Greuter et Burdet) (Vargas et al., 2001)

L'olivier de Laperrine représente une ressource génétique importante par la qualité de sa résistance à la sécheresse pouvant être potentiellement utilisée comme porte greffe des différentes variétés d'olivier cultivées dans les régions arides. Sa présence depuis des millénaires dans un milieu vaste et isolé où les flux génétiques entre populations sont très limités lui confère un patrimoine génétique très conservé (Baali-Cherif, 2007).

### 1.1. Classification

Cronquist (1981), classe l'olivier de Laperrine dans la famille des *Oleaceae* (Tab.II).

**Tableau II** : Position systématique de l'olivier de Laperrine.

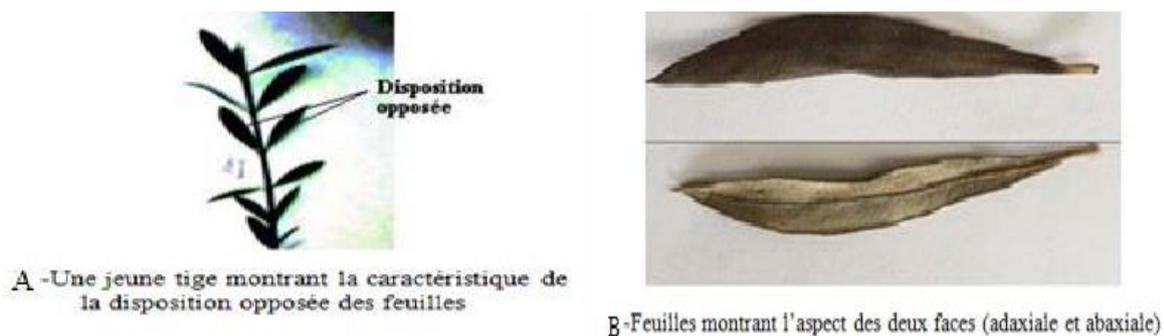
<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous Règne</b>	Tracheobionta
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Scrophulariales
<b>Famille</b>	<i>Oleaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Olea</i>
<b>Espèce</b>	<i>Europaea</i>
<b>Sous espèce</b>	<i>O. e.laperrinei</i>

### 1.2. Description botanique

#### 1.2.1. Appareil végétatif

Il est rare de trouver l'olivier de Laperrine sous forme de pied franc, il se présente le plus souvent sous une forme buissonnante formée de 3 à 6 rejets (Baali-Cherif, 2007). D'après Battandier et Trabut (1911), l'olivier de Laperrine est représenté en générale par des individus dont la taille moyenne des rejets varie de 1,5 à 4 m de haut et dont le tronc présente un diamètre de 0,4 à 0,5 m environ. Il prend l'allure soit d'un arbuste à rameaux intriqués, soit d'un arbre au tronc noueux. Les rameaux feuillés forment un enchevêtrement serré caractéristique de l'action anthropique, fourrage aux animaux (Benichou, 1962).

Les feuilles sont coriaces, opposées et entières portées par des rameaux qui sont grêles et flexibles (Fig.3A). Elles ont une forme lancéolée-linéaire de 4 à 6 cm de long et 0,5 à 0,7 cm de largeur en moyenne. Elles sont vertes cendrées sur la face supérieure, alors qu'elles sont argentées sur la face inférieure (Fig. 3B). La surface foliaire est réduite ce qui permet de limiter la perte d'eau (Baali-Cherif et Besnard, 2005).



**Figure 3 :** Caractères morphologiques des feuilles de l'olivier de Laperrine  
**A :** Disposition opposée des feuilles (Baali-Cherif, 2007) ; **B :** Face supérieure et face inférieures des feuilles (Dr Lahcene, 2022).

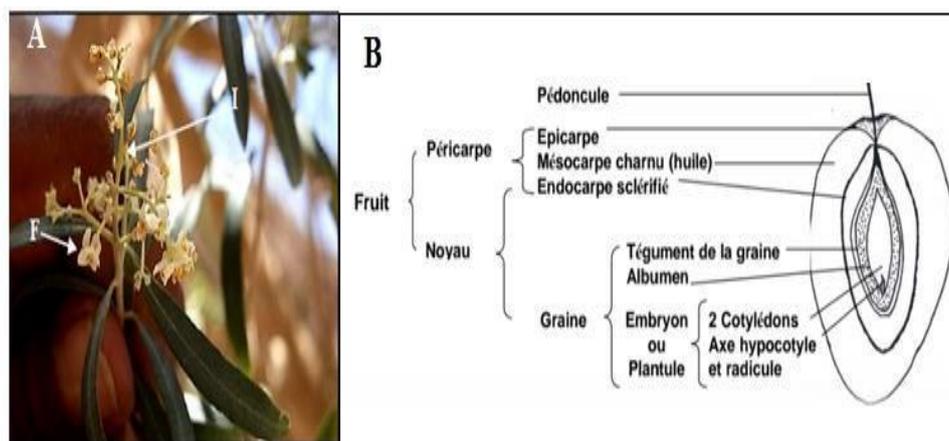
Le système racinaire adapté de ce taxon lui permet de capter l'eau à une grande profondeur (Baali-Cherif et Besnard, 2005).

### 1.2.2. Appareil reproducteur

L'inflorescence de l'olivier de Laperrine est caractérisée par une grappe, flexible comportant un axe principale avec 2 à 4 ramifications secondaires.

Les fleurs sont axillaires de 4 à 6 mm de diamètre, de couleur blanchâtre avec des bractéoles présentes et bien développée (Fig. 4). L'olivier du sud fructifie rarement (Baali-Cherif et Besnard, 2005) et seulement quelques arbres produisent des graines (Besnard et *al.*, 2007).

Les fruits ou les olives sont rassemblés en panicules. Ils sont de forme ovoïde à sphérique, mesurant 4 à 5 mm de diamètre et 5 à 8 mm de longueur. La pulpe est de couleur violette (Medail et *al.*, 2001).



**Figure 4 :** Représentation des fleurs de l'olivier de Laperrine ; **A :** Dans son milieu naturel ; **I :** Inflorescence ; **F :** Fleur (Photo Dr Lahcene, 2022). **B :** Coupe longitudinale la fleur (Baali-cherif, 2007)

Au cours de la maturation, les olives passent de la couleur vert tendre (Fig..5A) à la couleur noirâtre (Fig.5B). Le mésocarpe est charnu et mou, il renferme un noyau très dur à endocarpe scarifié contenant 1 à 2 graines (5C).



**Figure 5** : Représentation du fruit de l'olivier de Laperrine ; **A** : Etat immature ; **B** : Etat mature. ; **C** : Graines (Photo Dr Lahcene, 2022).

**Deuxième partie**  
**Synthèse sur les radicaux libres et les**  
**composés phénoliques**

## 1. Généralités sur les radicaux libres

L'oxygène est indispensable à la vie. En effet, c'est cette molécule qui permet l'apport d'énergie à l'être humain par son rôle d'accepteur final d'électron au sein de la mitochondrie (Guillouty, 2016). Dans les conditions physiologiques environ 1 à 3% de l'oxygène utilisés par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Garait, 2006). Ces derniers participent à la dégradation des biomolécules à savoir les lipides, les protéines, et l'ADN (Favier, 2006).

Les ERO sont produites physiologiquement et en continu par les organismes aérobies notamment par la respiration mitochondriale et la phagocytose. Elles peuvent aussi être le résultat de facteurs externes comme les rayonnements UV, la pollution, le tabac et l'alcool ainsi que certains herbicides et pesticides.

Selon Droge (2002), toute substance qui est capable à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats est un antioxydant.

Un radical libre est une molécule qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche externe (Bouchouka, 2016). La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, et elles sont très réactives (Carange, 2010).

La figure 6 résume les principales ERO.

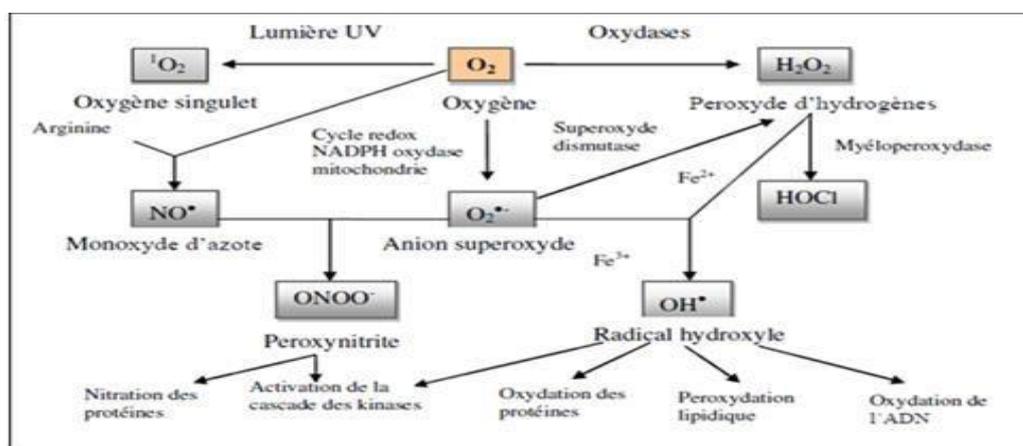
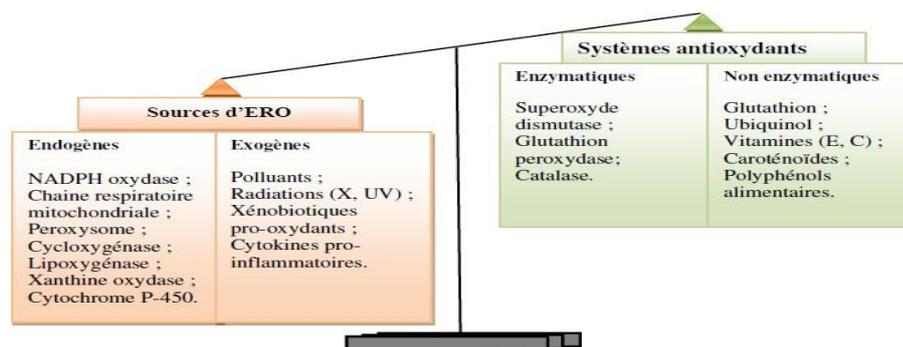


Figure 6 : Les différents ERO (Favier, 2006).

Les radicaux libres agissent comme des accepteurs d'électrons et arrachent donc des électrons à d'autres molécules afin d'atteindre un état stable. Cette perte caractéristique d'un électron correspond au phénomène d'oxydation et les radicaux libres sont considérés comme des agents oxydants puisqu'ils incitent les molécules à donner des électrons (Carange, 2010).

La production de ces radicaux se fait naturellement chez les organismes, ce mécanisme est régulé par de nombreux processus chimiques ou enzymatiques de détoxification. En effet, l'organisme possède ses propres moyens de défense lui permettant de lutter contre les radicaux libres (Hadj Salem, 2009).

Quand ce système de protection perd de son efficacité suite à des altérations du mécanisme de défense résultant de mutations, inactivation d'enzyme, carence en vitamines... ou quand le nombre de radicaux libres augmente de manière significative, il en résulte un stress oxydant (Fig.7).



**Figure 7:** Déséquilibre de la balance entre oxydants et antioxydants provoquant le stress oxydant (Rahman et al., 2012).

Ce dernier est responsable de graves pathologies chez l'Homme (Hadj Salem, 2009). C'est l'exemple de nombreuses maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington...), de maladies cardiovasculaires, inflammatoires, du diabète de certains cancers et du vieillissement cellulaire. (Favier, 2006. Richard, 2013).

## 2. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols sont métabolites secondaires spécifiques du règne végétal. Ces biomolécules représentent une large gamme de substances chimiques (Bruneton, 1993). Les composés phénoliques ne sont pas directement impliqués dans la croissance et de la reproduction des plantes. Ils jouent cependant, un rôle important dans les interactions de la plante avec son environnement (Patra et Saxena, 2010), interviennent dans la protection du végétal contre les insectes, les herbivores et les radiations ultra-violettes solaires. Ils jouent par ailleurs un rôle attractif vis à vis des insectes pollinisateurs (Houdjedje et Mehimmedetsi, 2018).

Structurellement, ils englobent un noyau benzénique aromatique (Urquia et Leighton, 2000 et Frankel et al., 1998, Chira et al., 2008) auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une fonction éther, ester ou hétéroside. Le groupement hydroxyle permet aux composés phénoliques simples de se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés (Nagendran, 2006). Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont

organisées en métabolons (Bénard., 2009). Ils sont principalement synthétisés par la voie du shikimate (Hoffmann, 2003). Ils sont présents dans toutes les parties de la plante, depuis les racines jusqu'aux fruits, mais avec une répartition quantitative qui varie entre les différents organes et tissus (Madi, 2018). Les polyphénols sont principalement répartis dans deux compartiments, les vacuoles et la paroi (Bénard., 2009).

Ces composés formant une grande famille de plus de 8000 composés chimiques (Bouchouka, 2016) sont classés en deux groupes : les composés flavonoïdes et les composés non flavonoïdes dont les tanins (Cathy, 2008). Boubekri (2014), les a organisés en 8 classes selon leurs structures chimiques globales comme le montre le tableau III.

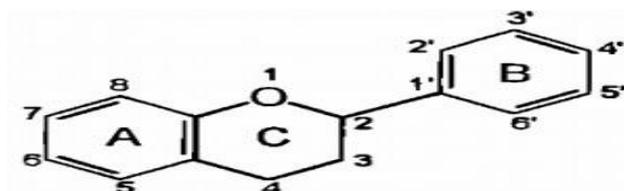
**Tableau III** : Les principales classes des composés phénoliques (Boubekri, 2014).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
<b>C6</b>	Phénols simple	Catéchol	Nombreuses espèces
<b>C6-C3</b>	Acides hydroxy-benzoïques	p-Hydrox benzoïques	Epices, fraise
<b>C6-C3</b>	Acides hydroxy-cinnamique	Acide caféique, acide Férulique, esculétine, Scopolétine	Pomme de terre, pomme Citrus
<b>C6-C2-C6</b>	Silènes	Resvératrol	Vigne
<b>C6-C3-C6</b>	Flavonoïdes : • Flavonols  • Anthocyanes  • Flavanols  • Flavanones  • Isoflavonols	Kamphérol, quercétine  Cyanidine, pélargonidine  Epicatéchine, Catéchine  Naringénine  Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs  Fleurs, fruits rouges  Pomme, raisin  Citrus  Soja
<b>(C6-C3)2</b>	Lignanes	Pinorésinol	Pin
<b>(C6-C3) n</b>	Lignines		Bois, noyau de fruits
<b>(C15) n</b>	Tanins		Raisin rouge, kaki

## 2.1. Les flavonoïdes

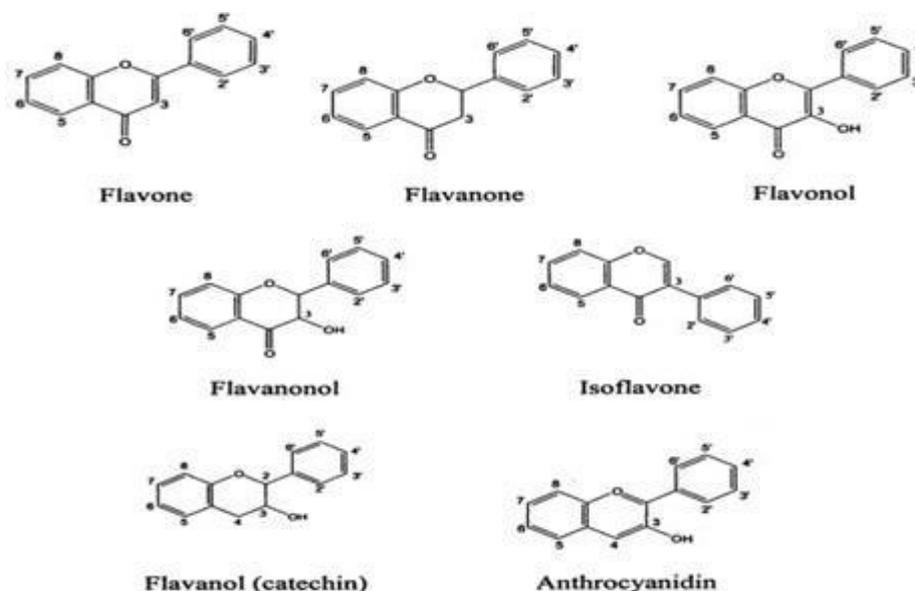
Les flavonoïdes représentent la majorité des composés phénoliques qui sont caractérisés par leurs faibles poids moléculaires. Ils sont responsables de la pigmentation chez les plantes, ces pigments sont responsables des colorations (jaune, orange, rouge) de divers organes de la plante (Chdira, 2005).

Les flavonoïdes partagent tous la même structure de base (squelette) à quinze atomes de carbone qui sont combinés à une configuration C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Tapas et al., 2008). Constitué de deux noyaux benzéniques A et B accolés par un cycle pyranique central (Fig. 8).



**Figure 8:** Structure des bases des flavonoïdes (Collin et Crouzet, 2011)

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes (Fig. 9) telles que : les flavones, les flavonols, les flavon-3-ols, les isoflavones, les anthocyanidines (Chira, 2008).



**Figure 9:** Structure de différentes familles de flavonoïdes

### 2.1.1. Rôle des flavonoïdes

Les flavonoïdes agissent comme catalyseurs de la photosynthèse et/ou en tant que régulateurs des canaux ioniques impliqués dans la phosphorylation. Ils fonctionnent également comme des protecteurs du stress oxydatif dans les cellules végétales en éliminant les espèces réactives à l'oxygène et à l'azote, produites par le système de transport d'électrons photosynthétiques.

(Pietta, 2000; Stalikas, 2007). Ils repoussent les herbivores par leur goût désagréable, jouant ainsi un rôle protecteur des plantes. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Wetterson et Butler, 1983).

Selon Guillouty (2016), une alimentation riche en flavonoïdes est bénéfique pour la santé humaine. De nombreuses études suggèrent que les flavonoïdes réduisent l'incidence de nombreuses maladies telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires et antivirale (Hanhineva, 2010). Ils présentent, ailleurs des propriétés *antioxydantes* (Pisoschi et al., 2009), activité anti-microbienne (Yala et al., 2001) et activité anti-inflammatoire. Ils pourraient être utilisés comme des agents de prévention dans certains cancers (Stagos et al., 2012), l'athérosclérose, l'obésité, et le diabète (Leonoudakis et al., 2017).

## 2.2. Les tanins

La majeure propriété de ces substances est leur capacité à se lier à de grosses molécules comme les protéines (Hagerman et Butler, 1978; Mc Manus et al., 1981).

Deux groupes de tanins différents par leur structure et par leur origine biogénétique, ce sont :

### 2.2.1. Les tanins hydrolysables

Ces tanins sont des dimères d'acides galliques condensés sur un dérivé glycosyle, ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphéniques. Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et aqueuse à l'eau chaude (Conrad et al., 1998).

### 2.2.2. Les tanins condensés

Les tanins condensés sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des unités de flavon-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> des unités adjacentes (Wollgast et Anklam, 2000).

Leur structure chimique est très variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique ; on peut ainsi les classer en : *tanins hydrolysables*, qui donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique, soit de l'acide ellagique ; *tanins condensés*, non hydrolysables, qui par oxydation donnent du pyrocatechol (Kholkhal, 2014).

### 2.2.3. Rôle des tanins

La synthèse des tanins par les végétaux est un des mécanismes de défense contre les agressions des phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des prédateurs (Herbivores, insectes). Ils possèdent un large éventail d'activités biologique, antibactériennes, antivirales et

anti-oxydantes (Rina, 2019). D'après les travaux (Ray et *al.*, 2000) ils jouent aussi un rôle dans la prévention contre les deux formes de mort cellulaire connues, l'apoptose et la nécrose.

### 3. Activités biologiques des oliviers et leurs extraits

De nombreuses études scientifiques ont montré qu'*Olea europaea* L. est une source naturelle des composés phénoliques dont un grand nombre présentent un large éventail d'activités biologiques. L'olivier est utilisé en médecine traditionnelle, ses feuilles sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle en infusion, elles soulagent la fièvre, la malaria (Lee et *al.*, 2009) et le paludisme (Ferreira et *al.*, 2007). Elles sont également utilisées en cosmétiques (Benseddik et Rami, 2021).

L'HPLC obtenue à partir des extraits de feuilles de l'olivier révèle la présence de l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol, la lutéoline, l'apigénine, la catéchine, la vanilline, la rutine, l'acide vanillique, l'acide caféique, le tyrosol et la lutéoline (Benavente-Garcia et *al.*, 2000. Lahcene et *al.*, 2018).

Selon le même auteur, l'olivier se caractérise par des activités antifongiques, antidiabétiques, hypoglycémiantes et hypotensives.

De nombreuses études ont montré que l'olivier représente une source très riche de composés phénoliques et possède de nombreuses propriétés biologiques liées au pouvoir antioxydant des principes actifs de ses extraits et leur rôle en tant que piègeurs de radicaux libres (Le Tutour et Guedon, 1992 ; Caturla et *al.*, 2005 ; Visioli et Galli, 2002 ; Bouaziz et Sayadi, 2005 et Lahcene (2020).

**Troisième partie**  
**Synthèse sur les Biofilms**

## 1. Introduction

Le développement du biofilm sur les surfaces est un processus dynamique impliquant l'adhérence progressive, la croissance, la motilité et la production de polysaccharide extracellulaire (Aparna et Sarita, 2008). Peu d'attention a été accordée aux biofilms formés par certaines bactéries pathogènes, telles que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Alors que ces bactéries sont signalées parmi les microorganismes les plus fréquemment isolés à partir des surfaces et des produits alimentaires (Gibson et al., 1999).

L'étude de ces bactéries productrices de biofilms suscite donc un grand intérêt, car elles pourraient servir de source de contamination microbienne qui peut conduire à l'altération des aliments ou à la transmission de maladies. L'évaluation de la dynamique de formation des biofilms peut être utile pour prévenir leur formation, et ainsi, réduire les risques.

Les microorganismes peuvent adhérer sur des surfaces (abiotiques) très variées (verre, plastique, acier inoxydable...) et sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans les domaines de la santé publique et de l'industrie car générant des charges économiques importantes. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, on peut citer les contaminations des produits alimentaires, la biodétérioration des matériaux et la propagation des maladies nosocomiales (Parot, 2007).

## 2. Définition du biofilm

Le biofilm est une communauté pluricellulaire de microorganismes sessiles agrégés en micro-colonies ; parfois complexe et fréquemment incluse dans une matrice de polymères extracellulaires autoproduits (Branda et al., 2005 ; Shakibaie et al., 2014), adhérant entre eux et sur une surface biotique ou abiotique, allant du naturel comme les muqueuses de l'organisme, racines et feuilles des plantes, minéral comme les roches aux artificiels comme les canalisations et les équipements en industries. Ces structures organisées s'établissent aux interfaces air-solide, air-liquide, liquide-solide ou liquide-liquide (Costerton et al., 1999 ; Randrianjatovo et Gbalou, 2016).

## 3. Croissance et maturation du biofilm

La croissance du biofilm correspond à la multiplication cellulaire, à la production d'EPS (extracellular polymeric substances) ainsi qu'au matériel extracellulaire varié. La prolifération des cellules aboutit à la formation de micro-colonies qui sont décrites comme des foyers tridimensionnels hautement organisés et résistant (Conibear et al., 2009). En effet l'unité de base du biofilm est la micro-colonie (Donlan, 2002), qui est aussi l'une des caractéristiques la plus remarquable de ce phénotype. La morphologie des colonies dans les biofilms diffère de celle des colonies des cultures libres dites planctoniques. L'arrangement spatial des micro-colonies contribue à l'architecture du biofilm et à de profondes implications pour son fonctionnement (Davey et O'Toole, 2000). La proximité des cellules au sein de la micro-

colonie ou entre les micro-colonies fournit un environnement idéal pour la création de gradients nutritionnels et pour les échanges génétiques (Donlan, 2002).

#### 4- Définition et rôle de l'EPS

De nombreuses bactéries à Gram positif ou à Gram négatif possèdent une couche d'exopolysaccharides plus ou moins épaisse et visqueuse recouvrant la face extérieure de la paroi, couche dont la composante de base est le poly- $\beta$ ,6-N-acetylDglucosamine(PGA) (Robert et *al.*, 2007). Ces polysaccharides sont soit attachés à la paroi par des liaisons covalentes ou par des interactions fortes en tant que polysaccharides capsulaires (PSC) soit forment une couche diffuse facilement détachable de la surface et se trouvent par la suite dans le milieu extracellulaire en tant que polysaccharides de « slime» (PSS) (Yang et *al.*,2010).

Aussi, de nombreuses souches de *Staphylococcus* à coagulase négative (SNC) forment un film bactérien adhérent, le slime, dont la formation a été mise en cause comme facteur de virulence. Il est postulé qu'il s'agit d'un mécanisme par lequel la bactérie adhère et colonise certains dispositifs prothétiques. Plusieurs rapports ont montré que le SNC produit d'énormes quantités de cette substance extracellulaire lors de la croissance sur des surfaces inertes, permettant l'adhésion de micro-organismes à ces surfaces. Cette adhésion est augmentée par la fibronectine tissulaire et le plasma. Le contrôle génétique de la production de mucus a commencé à être élucidé, d'abord chez *S. epidermidis* puis chez *S. aureus*. La synthèse du polysaccharide capsulaire est médiée par l'opéron *ica* (Alcaraz et *al.*, 2003);

La production des exo-polysaccharides joue un rôle important dans les infections causées par différents microorganismes (Alcaraz *etal.*, 2003); et est considérée comme un facteur de virulence important pour certains microorganismes tels que *Staphylococcus aureus*. Les EPS (exo-polysaccharides) sont généralement des matériaux polysaccharidiques, qui sont impliqués dans la protection des cellules microbiennes. En plus, les microorganismes qui les produisent sont plus résistants à la dessiccation, à la prédation et aux produits chimiques (Ophir et *al.*, 1994). Cependant, ces molécules sont également importantes dans la formation de biofilms sur les surfaces puisqu'elles sont impliquées dans les premières étapes de ce processus.

# **Chapitre II**

## **Matériel et Méthodes**

## 2.1. Matériel

### 2.1.1. Matériel végétal

Les feuilles et les graines de l'olivier de Laperrine utilisées au cours de notre expérimentation, proviennent de la station de Tamanrasset. Notre matériel végétal est fourni par le Dr Lahcene (2022).

### 2.1.2. Matériel microbien

Le test antimicrobien est effectué sur deux souches bactériennes de références, ce sont : *Staphylococcus aureus* LGA 251 mec C et *Escherichia coli* ATCC 25922.

## 2.2. Méthodes

Les extractions et les divers protocoles visant à évaluer le potentiel antioxydant de l'extrait de graines de l'olivier de Laperrine et ceux visant à évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles, l'activité antibiofilm sur une bactérie Gram<sup>+</sup> et une bactérie Gram<sup>-</sup> ont été réalisés au niveau du laboratoire de recherche en biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

### 2.2.1. Procédure d'extraction

Nous avons procédé à la dissolution de 20 grammes de poudre (de feuilles et de graines) dans 200ml de solvant représenté par de l'eau distillée pour les graines et par de l'eau distillée et de l'éthanol pour les feuilles. Après une macération pendant 24h à l'obscurité sous agitation (100rpm) à température ambiante, la phase aqueuse du macérât est filtrée sur papier Wattman n°1 (Aiche- Iratni et *al.*, 2015 ; Lahcene, 2018). Le filtrat résultant de l'extraction est lyophilisé (Fig.10). Les poudres végétales ainsi obtenues sont conservées à l'obscurité à 4°C dans des flacons, hermétiquement fermés en vue de leurs utilisations ultérieures.

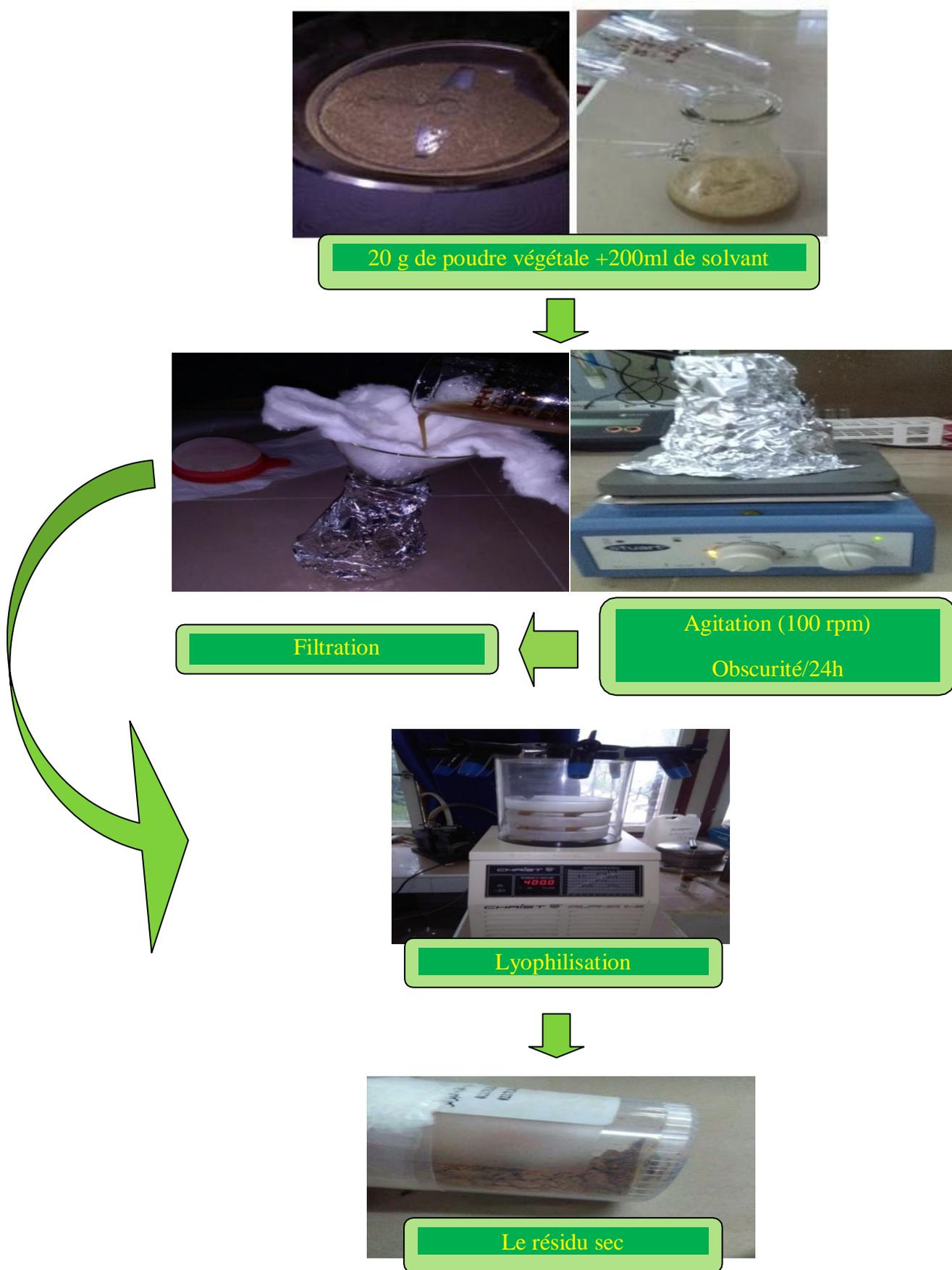


Figure 10 : Les différentes étapes de l'extraction

## 2.2.2. Activité antioxydantes de l'extrait de graines

### 2.2.2.1. Analyse quantitative

L'analyse quantitative est menée par une série de dosages spectrophotométriques UV-visible.

#### 2.2.2.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Les phénols totaux sont estimés par la méthode au Folin-ciocalteu décrite par Singleton et Rossi (1965).

Les phénols présents dans l'extrait de graines subissent une réaction d'oxydation en présence du réactif de Folin-ciocalteu (RFC). En effet ce réactif est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange de deux acides, l'acide phosphotungstique et l'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, le réactif réagit avec la fonction OH des phénols, ceci entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu proportionnelle à la quantité de polyphénols contenus dans l'extrait de graines d'olivier.

La teneur en polyphénols totaux est déterminée par extrapolation sur la courbe étalon, établie à partir d'une série de dilutions (10-100µg/ml) d'acide gallique servant de référence. Dans chaque tube à essais sont ajoutés 0,25ml de l'échantillon à doser, 1,25ml du réactif RFC (1/10) et 1ml de carbonate de sodium (75g/l). Les différentes solutions sont incubées à 40°C pendant 30 minutes. L'absorbance est par la suite mesurée à 765 nm par un spectrophotomètre Meline MD 2000. La teneur en polyphénols totaux est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de résidu sec (mg EAG/g RS).

#### 2.2.2.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La méthode utilisée est celle décrite par Chang *et al.* (2002). Elle est basée sur l'utilisation du chlorure d'aluminium donnant une coloration jaunâtre par chélation des flavonoïdes. En effet ce réactif forme avec les flavonoïdes totaux des complexes acides stables colorés soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle(OH) en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. L'apparition de la couleur jaune indique la formation de ce complexe. Ceci se traduit par le fait que le métal (Al) a perdu deux électrons pour s'unir à deux oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneurs d'électrons. Ainsi, à 0,5 ml de la solution de l'extrait de graines, sont ajoutés 1,5 ml de méthanol, 0,1ml de chlorure d'aluminium, 0,1 ml d'acétate de potassium et 2,8 ml d'eau distillée.

Le mélange est incubé pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 415 nm. La courbe étalon est réalisée avec la quercétine (10-100µg/ml), et l'équation de régression linéaire, permet de calculer la teneur totale en flavonoïdes exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme de résidu sec (mg EQ/g RS).

### 2.2.2.1.3. Détermination de la teneur en tanins totaux

Le dosage des tanins est réalisé selon le protocole mis au point par Hagerman et Butler (1978). Ce dosage est expliqué chimiquement par la précipitation de la BSA par les tanins ainsi à la formation d'un complexe protéines-tanins. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins.

La teneur totale en tanins exprimée en milligramme équivalent acide tannique par gramme de résidu sec (mg EAT/g RS), est déterminée par l'utilisation de l'équation de régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide tannique (10-100 µg/ml).

### 2.2.2.2. Activité antioxydante

Ce sont des méthodes spectro-photométriques le plus souvent utilisées pour l'évaluation des activités antioxydantes de l'extraits de graines. Tous les tests sont répétés trois fois.

#### 2.2.2.2.1. Capacité antioxydante totale ou test du phosphomolybdate

Le test du phosphomolybdate permet d'évaluer la capacité antioxydante totale des extraits végétaux. Ce test agit selon deux mécanismes majeurs : soit par transfert d'atomes d'hydrogène, soit par transfert d'électrons. Il implique la réduction d'un oxydant qui entraîne un changement de couleur. Son mécanisme réactionnel est basé sur la réduction des ions molybdène Mo(VI) à pH acide en molybdène Mo(V).

La capacité antioxydante totale est estimée par le dosage du phosphomolybdène selon le protocole mis au point par Prieto et *al.* (1999). Le test consiste à mélanger 0,1ml de l'extrait végétal à différentes concentrations (SM=2000 µl/ml) avec 1ml du réactif de molybdate composé de 0,6 M d'acide sulfurique, 28m M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 4Mm molybdate d'ammonium.

Après une incubation de 90 minutes à 95°C et refroidissement du mélange à température ambiante, l'absorbance est lue à 695nm. La courbe étalon est établie avec l'acide ascorbique (10-100 µg/ml), la droite de régression permet de calculer la teneur totale de la TAC. Cette dernière est exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g d'extrait). Ce test agit selon deux mécanismes majeurs : soit par transfert d'atomes d'hydrogène, soit par transfert d'électrons. Il implique la réduction d'un oxydant qui entraîne un changement de couleur. Son mécanisme réactionnel est basé sur la réduction du molybdène (VI) au molybdène (V) par les composés réducteurs présents dans l'échantillon et la formation subséquente d'un complexe phosphate de Mo (V) vert à pH acide.

#### 2.2.2.2.2. Détermination du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits est évalué selon la méthode d'Oyaizu (1986). Elle est basée sur la réduction des ions ferriques (Fe<sup>+3</sup>) présents dans le ferricyanure de potassium, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 6à1% (m/V) en ions ferreux (Fe<sup>+2</sup>) en présence d'un antioxydant qui a le pouvoir de céder des électrons. Cette réaction conduit à la formation d'un complexe bleu dont l'intensité indique une augmentation de la réduction du fer.

Différentes concentrations d'extrait de graines d'olivier de Laperrine (SM=4000 µg/ml) sont préparées dans de l'eau distillée et mélangées avec 2,5ml de tampon phosphate (200 mM, pH 6,6) et 2,5ml de ferricyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) (1% m/v). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 minutes, puis 2,5ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés. Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 rpm /10 min.

Nous prenons 5ml du surnageant que nous mélangeons à 5ml d'eau distillée et 1ml de FeCl<sub>3</sub> (0,1%). Enfin, l'absorbance est mesurée à 700nm.

L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur. L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif dans les mêmes conditions expérimentales.

### 2.2.3. Activité antibactérienne et activité antibiofilms des extraits de feuilles

#### 2.2.3.1. Activité antibactérienne

Cette activité est réalisée sur les extraits aqueux (EA) et éthanolique (EE) obtenus à partir des feuilles de l'olivier de Laperrine. L'objectif consiste en la détermination de la capacité de ces extraits à inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* LGA 251 et d'*Escherichia coli* ATCC 25922 par la méthode de diffusion sur milieu solide. Des disques de papier Whatman n°1 de 6 mm de diamètre sont déposés sur milieu solide ensemencé 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 LABAB à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

##### 2.2.3.1.1. Coloration de Gram et tests biochimiques

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 (Bergey et *al.*, 1994). Une couleur violette indique une bactérie Gram+ alors qu'une couleur rose caractérise une bactérie Gram- . Afin de vérifier la pureté de cultures bactériennes nous procédons au préalable à des tests biochimiques, ce sont :

##### \*Test de la catalase

Ce test consiste en un prélèvement de cellules bactériennes à partir de colonies ayant poussées sur milieu Chapman et un étalement sur lame auquel nous ajoutons quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Une réaction positive se traduit par la formation de bulles d'air.

**\*\* Test de la DNase**

Après ensemencement de la bactérie *Staphylococcus aureus*, sur milieu (DNase) et incubation à 37°C pendant 24h, nous ajoutons de l'acide chloridrique à la culture. Après une incubation qui dure de 2 à 5 mn., il y'a l'apparition d'une zone claire autour des colonies bactériennes qui confirme que la souche testée est productrice de l'enzyme désoxyribonucléase.

**\*\*\* Test TSI**

Dans le cas d'*Escherichia coli*, nous réalisons le test TSI. Ainsi le milieu TSI est coulé dans un tube de manière telle que nous obtenons un culot d'environ 3,5 cm et une gélose en pente. Un ensemencement est réalisé dans le culot par piqûre et en strie sur la gélose en pente de couleur rougeâtre. Après une incubation de 18 à 24h à 37°C, la réaction positive se manifeste par le changement de la couleur du milieu qui vire du rouge au jaune au niveau des deux compartiments du tube de culture avec dégagement gazeux observé par un vide au milieu de la gélose.

**2.2.3.1.2. Préparation de l'inoculum****2.2.3.1.2.1. préparation de la pré-culture**

Les tests bactériens sont réalisés à partir de cultures jeunes, en phase de croissance exponentielle. L'enrichissement des souches se fait par ensemencement de la bactérie sur le milieu BHIB liquide. Après une incubation de 24h à 37°C, un ensemencement sur milieu solide MH est réalisé, suivit d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

**2.2.3.1.2.2. Préparation de la suspension bactérienne**

La préparation des suspensions bactériennes est effectuée selon le protocole mis au point par Djennane et *al.* (2012). A partir de cultures jeunes sur gélose, nous prélevons quelques colonies bien isolées dans de 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).

**2.2.3.1.3. Préparation des échantillons**

Dans un premier, un antibiogramme est réalisé pour chacune des deux souches bactériennes sur lesquelles portent nos tests. Il consiste en la détermination de la résistance ou sensibilité des souches à différents antibiotiques. Les différents disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose MH préalablement ensemencée. Trois répétitions sont réalisées pour chaque souche. Par la suite, nous testons l'effet antibactérien des extraits EA et EE sur *S.aureus* et *E.coli* en faisant varier leur concentrations dans la gamme (0,2 à 0,6 g/ml). Le test est réalisé par dépôt de disques sur la gélose MH. Nous déposons un volume de 20µl de

chacun des extraits sur les disques, la gentamicine 10 $\mu$ g est utilisée comme témoin positif pour *S.aureus* et la colistine 10  $\mu$ g est utilisé comme témoin positif pour *E.coli* et un disque de papier watman n°6 vierge imbibé de 20  $\mu$ l d'eau distillé stérile représente le témoin négatif. La boîte est alors mise dans le réfrigérateur à +4°C pendant deux heures puis incubé dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

#### 2.2.3.1.4. 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. Dans le soucis d'apprécier la sensibilité des deux souche bactériennes vis a vis de nos extraits, nous avons adopté la méthode de Ponse (2003), en effet , selon cet auteurs la sensibilité des bactéries est définie comme suit :

- Pour un diamètre < 8 mm, la bactérie est non sensible (-)
- Un diamètre variant de 8 à 14mm caractérise des bactéries sensibles(+)
- Un diamètre compris entre 15 et 19mm définit des bactéries très sensibles (++)
- Pour un diamètre >20 mm les bactéries sont extrêmement sensible (+++)

#### 2.2.3.1.5. Détermination de la CMI

La méthode de dilution en milieu liquide, décrite dans le recueil de standardisation de l'antibiogramme, est utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice, la CMI correspond à la plus faible concentration des extraits pour laquelle les microorganismes testés ne montrent aucune croissance visible à l'œil nu. La gamme de concentration teste varie est de 0,6 à 0,025g/ml. Le solvant de dilution utilisé est représenté par de l'eau distillée stérile.

#### 2.2.3.1.5. 1.Préparation de l'inoculum bactérien et sa distribution

A partir de la souche pure testée, nous réalisons une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile et d'une densité de 0.08 à 0.1 de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland qui correspond à une concentration d'environ 10<sup>8</sup> UFC/ml. Un ensemencement sur milieu solide MH est réalisé par la suite. Des spots de 20  $\mu$ 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.

#### 2.2.3.1.5. 2. Lecture

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait ou aucune croissance bactérienne n'est observée. La lecture se fait selon le même procédé utilisé pour l'activité antibactérienne.

### 2.2.3.2. Activité antibiofilm

L'objectif de cette partie du travail est en premier lieu l'étude de la capacité de notre souche bactérienne *Staphylococcus aureus* LGA 251 à former un biofilm dans les conditions *in vitro* sur le milieu de culture RCA (Rouge Congo Agar) grâce aux méthodes qualitatives décrites par Freeman et *al.* (1989) et en deuxième lieu l'étude du pouvoir antibiofilm des extraits aqueux et éthanolique de la poudre de feuilles de l'olivier Laperrine.

La souche bactérienne à étudier doit être testée pour sa capacité à former des biofilms. Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détection de la capacité de formation de biofilms: méthode des tubes (MT), production d'un «slime» sur milieu solide «rouge congo agar» ou «RCA» et l'adhésion sur microplaques de polystyrène (Oliveira et Cunha, 2010).

La capacité des bactéries à produire un «slime», un polysaccharide formant une couche diffuse facilement détachable de la paroi bactérienne est testée sur milieu solide au rouge congo modifié (Mariana et *al.*, 2009).

Les bactéries possédant une forte production de "slime" donnent des colonies noires avec un anneau clair au centre, par contre les bactéries possédant une faible production donnent des colonies marrons parfois avec un brunissement occasionnel au centre (Mathur et *al.*, 2006).

Le colorant rouge congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un «slime» et donnent des colonies noires sur milieu CRA contrairement aux colonies non productrices d'EPS.

#### 2.2.3.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien et sa distribution

A partir de la souche purifiée et revivifiée, nous réalisons 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  $10^8$  UFC/ml.

#### 2.2.3.2.2. Criblage de la production de biofilms sur Gélose Rouge Congo

Nous avons utilisé la méthode préconisée par Freeman et *al.* (1989), ainsi, à partir de la suspension bactérienne, nous réalisons un ensemencement en stries à 3 cadrans sur gélose rouge Congo. Les boîtes de pétri sont par la suite incubées à 37°C en condition aérobie pendant 24 heures.

L'apparition de colonies noires indique que la souche est capable de développer un biofilm

### **2.2.3.2. 2. Etude de l'activité antibiofilm détermination de la CMI**

#### **2.2.3.2. 2.1 .Préparation de l'inoculum bactérien et sa distribution**

A partir de la souche purifiée et revivifiée, 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  $10^8$  UFC/ml.

##### **2.2.3.2.2.2. Distribution sur RCA**

Un ensemencement par écouvillonnage sur milieu solide RCA est réalisé, par la suite, des tests de diffusion sur disque sont effectués avec les dilutions suivantes des extraits de feuilles aqueux et éthanolique : (0,4mg/ml, 0,2mg/ml) pour l'activité anti-biofilm et les concentrations variant de 0,4mg/ml à 0.025mg/ml pour la détermination de la CMI. Six disques sont déposés à la surface de la boîte préalablement ensemencée, 3 disques de papier Watman imbibés de 20 $\mu$ l de l'extrait aqueux, 1 disque d'antibiotique (gentamicine), 1 disque qui représente le témoin positif et 1 disque de papier Watman vierge comme témoin négatif.

L'opération se fait de la même manière pour chacune des dilutions et la même technique est utilisée avec l'extrait éthanolique.

##### **2.2.3.2.2 .3. Lecture**

La lecture consiste en la détection et une mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque de papier Watman. Les résultats sont exprimés en mm.

# **Chapitre III**

## **Résultats et discussion**

### 3.1. Dosages

Afin d'évaluer quantitativement les composés phénoliques contenus dans l'extrait aqueux de la graine de l'olivier de Laperrine, un dosage des polyphénols totaux (PPT), des flavonoïdes totaux (FT) et tanins totaux (TT) est effectué par les méthodes spectrophotométriques notamment celle du Folin-ciocalteu, trichlorure d'Aluminium, et celle basée sur la formation du complexe protéine-tanins.

Peu de travaux sont publiés sur les composés phénoliques des graines de l'olivier en particulier et de la plante en général. Ainsi donc et en raison du manque de données scientifiques sur les extraits de graines d'olivier, nous comparons nos résultats à ceux obtenus par d'autres parties de la plante et par rapport à d'autres espèces et familles végétales.

#### 3.1.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures (Abdel-Hameed, 2009).

La quantification des composés phénoliques est calculée en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par un extrait d'étalon de l'acide gallique). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme de résidu sec de la plante.

Les résultats concernant les teneurs en composés phénoliques sont regroupés dans le tableau IV. Les valeurs obtenues révèlent des teneurs plus élevées en polyphénols et en tanins par rapport aux flavonoïdes. Ce qui est lié au fait que l'olivier de Laperrine est une espèce sclérophyte des régions sèches ou arides caractérisées par un manque d'eau ou à sa faible disponibilité, notamment les zones à pluviosité réduite et les zones sahariennes (Lahcene, 2020). Pour Sahli, (2015), Les plantes sclérophytes présentent une grande biodisponibilité en polyphénols, qui peuvent être considérées, en soit, comme une forme d'adaptation au stress oxydatif par leur capacité à limiter les pertes d'eau.

**Tableau IV** : Résultats des différents teneurs en PPT, FT, et en TT

	Polyphénols totaux (mg EAG/g RS)	Flavonoïdes (mg EQ/g RS)	Tanins totaux (mg EAT/g RS)
Teneurs	42,38 ± 6,56	1 ± 0,87	3,13 ± 0,47
Équations de régressions de la courbe	Y = 0,008X + 0,093 R <sup>2</sup> = 0,98	Y = 0,004X + 0,056 R <sup>2</sup> = 0,96	Y = 0,008X + 0,095 R <sup>2</sup> = 0,94

Le dosage des polyphénols dans l'extrait EAG donne une teneur qui correspond à la valeur de  $42,38 \pm 6,56$  mg EAG/g RS. Cette teneur est multipliée par deux dans la graine de blé mur, en effet, Larba et al. (2021) notent une valeur de  $90,39 \pm 0,75$  mg EAG/g, quant à Boukhanouf et al. (2016), ils enregistrent une teneur de  $36,3 \pm 0,37$  mg EAG/g MS dans les graines de fèves mûres (*Vicia faba L.*). Pour les graines de *Nigella sativa*, Meziti (2009), obtient une valeur de  $27,07 \pm 0,58$  mg EAG/g RS, quant à Zabayou (2017), la teneur enregistrée est de  $1,32 \pm 0,09$  mg EAG/g RS.

Cependant, la comparaison de nos résultats à ceux des différents travaux ayant quantifié les polyphénols totaux montre que l'extrait aqueux des graines de l'olivier laperrine contient une quantité non négligeable en polyphénols. En effet, Boudjellal (2008) enregistre une faible teneur en polyphénols totaux dans l'extrait de la pulpe du fruit de *Elaeagnus angustifolia* qui est de  $2,32 \pm 0,48$  mg EAG/g d'extrait.

### 3.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur totale en flavonoïdes de l'extrait aqueux est déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium  $AlCl_3$  le calcul est basé sur l'exaction de régression obtenu à partir de la quercitrine (Tab.IV). La teneur des flavonoïdes correspondants est rapportée en mg équivalent quercitrine par g de résidu sec. Le dosage des flavonoïdes dans l'extrait EAG, montre une teneur de  $1 \pm 0,87$  mgEQ/g RS.

Cette valeur est en accord avec les données bibliographiques enregistrées dans différentes graines de différentes espèces végétales. Ainsi, Boukhanouf et al. (2016) enregistrent une teneur de  $0,623 \pm 0,019$  EQ/g MS à partir d'extrait aqueux de graine de fève mûre *Vicia faba L.* alors que Zabayou (2017), enregistre une valeur de  $2,12 \pm 0,015$  mgEQ/gRS à partir d'extrait aqueux de lentille métropole crue. La teneur en flavonoïdes enregistrée dans la graine de *Nigella sativa* est de  $2,45 \pm 0,06$  mg EQ/g RS (Meziti, 2009).

Enfin, la teneur en flavonoïdes que nous avons obtenue à partir de l'extrait EAG est supérieure à celle enregistrée par Boudjellal (2008) à partir d'un extrait de la pulpe du fruit de l'olivier *Elaeagnus angustifolia* qui correspond à  $0,15 \pm 0,06$  mg EQ/g d'extrait.

### 3.1.3. Dosage des tanins totaux

Le dosage des tanins totaux déterminé sur l'extrait aqueux des graines d'olivier de Laperrine et calculé à partir de l'équation de régression de l'acide tannique (Tab.IV) donne ressortir une teneur qui correspond à  $3,13 \pm 0,47$  mg EAT/g RS

La bibliographie consultée ne fait aucune référence à des dosages de tanins réalisés à partir d'extraits de graines. Raison pour laquelle la comparaison de nos résultats est faite par rapport aux différents résultats obtenus sur des extraits aqueux de feuilles, de tiges et de fruits de l'olivier de Laperrine. Ainsi, Lahcene (2020), obtient une teneur  $214,75$  mg EAT/g RS, Benseddek et Rami (2021), enregistrent une valeur de  $90$  mg EAT/g RS, alors que Ouattara (2021), calcul une teneur de  $51,79$  mg EAT/g RS. Il ressort de cette comparaison que la teneur en tanins totaux contenus dans la graine de l'olivier est très faible.

Il faut cependant noter que Boudjellal (2008) enregistre une valeur de  $2,57 \pm 0,35$  mg EAT /g d'extrait de la pulpe du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* des teneurs de l'ordre de d'extrait inférieur à nos résultats.

D'après les travaux de Lahcene (2020) sur un extrait aqueux de feuille de l'olivier de Laperrine, Benseddik et Rami (2021) sur l'extrait aqueux de tiges et ceux d'Ouattara (2021) sur l'extrait de fruit, ce sont les extraits de feuilles qui donnent les teneurs les plus élevées en polyphénols, flavonoïdes et en tanins totaux. Comparés à l'extrait de feuilles, les résultats obtenus par l'extrait de graine est relativement insignifiant.

### 3.2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait de graines d'olivier de Laperrine est réalisée par le test de la capacité antioxydante totale (CAT) et le test de la réduction de fer (FRAP).

#### 3.2.1. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale de l'extrait de graines de l'olivier de Laperrine est exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide ascorbique par gramme de résidu sec (mg EAA/g de RS). Le calcul est réalisé à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage illustrée par la figure 11 de l'acide ascorbique suivante  $Y = 0,004 X - 0,063$  ( $R^2 = 0,98$ ).

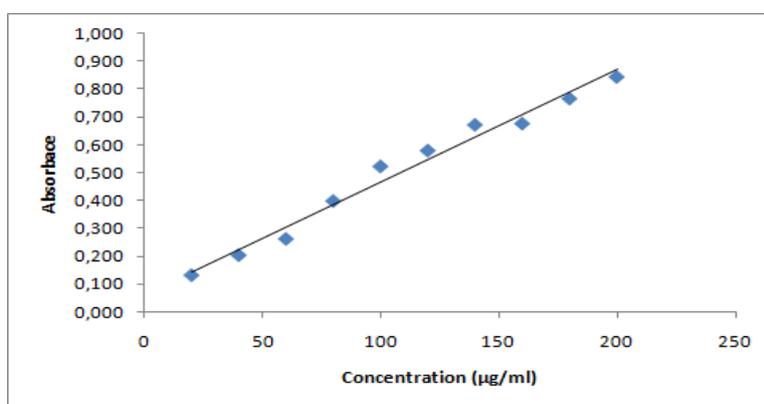


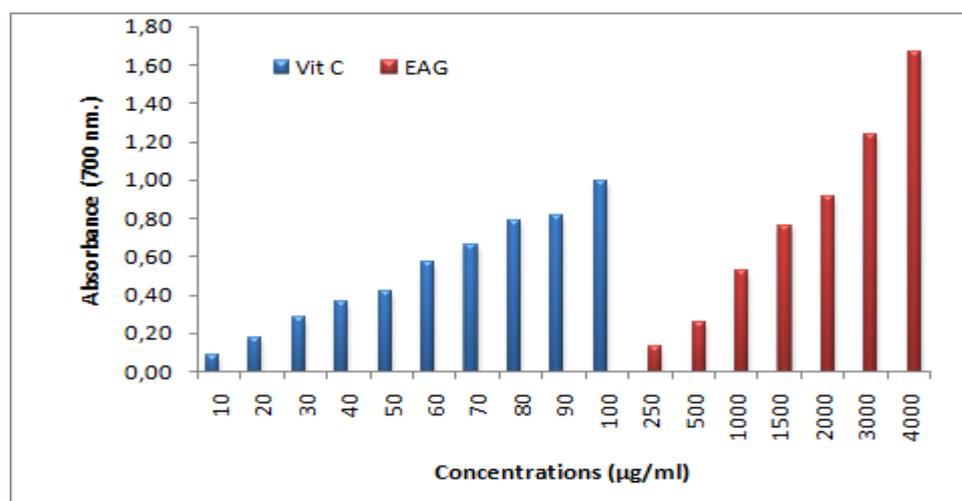
Figure 11 : Courbe de régression de l'acide ascorbique

L'extrait de graines d'*Olea europaea* subsp. *laperrinei* révèle une capacité antioxydante de  $58,25 \pm 1,75$  mg/EAA /g RS. Cette valeur en moyenne par cinq comparée de la teneur calculée par Lahcene (2020) à partir d'un extrait aqueux de feuilles d'olivier de Laperrine et qui correspond à  $267,26 \pm 2,67$  mg EAA /g de RS.

L'extrait EAG se caractérise par un pouvoir antioxydant nettement plus élevé que celui calculé par Zabayou (2017) à partir des graines de lentilles métropole ( $16,67 \pm 1,12$  mg EAA/g RS), et de graines de lentilles corailles ( $11,67 \pm$  EAA/g RS)

### 3.2.2 . Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium (FRAP)

Les résultats obtenus montrent que la capacité de l'extrait à réduire le fer est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique ( $IC_{50}=54,32 \mu\text{g/ml}$ ). Il faut cependant noter que EAG est un extrait brut contenant un mélange de molécules différentes alors que l'acide ascorbique est un produit pur connu pour ces vertus antioxydants. Ce test a montré également que la capacité réductrice de l'extrait EAG est dose-dépendant et augmente de manière proportionnelle à l'augmentation de concentrations des échantillons (Fig.12).



**Figure 12 : Capacité de réduction du fer par l'extrait de graines**

L'activité antioxydante de l'extrait EAG et celle de l'acide ascorbique est déterminée à partir de l' $IC_{50}$ , c'est la concentration nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres. L' $IC_{50}$  de l'extrait calculée correspond à la valeur de  $1021,25 \pm 11,36 \mu\text{g/ml}$ . Le manque de données scientifiques ne nous permet pas de comparer nos résultats à d'autres familles de graines. Cependant une comparaison avec les  $IC_{50}$  déterminées à partir d'extrait aqueux obtenus à partir des feuilles (Lahcene, 2020), des tiges (Beseddik et Rami, 2021) et du fruit (Ouattara, 2021) de l'olivier de Laperinne illustrée par le tableau V montre que la capacité donatrice d'électrons par l'extrait EAG est relativement négligeable par rapport aux extraits aqueux de feuilles, de tiges et de fruits.

**Tableau V : Comparaison des résultats du test FRAP de EAG avec ceux obtenus à partir des extraits de feuilles, de tiges et de fruits de l'olivier de Laperinne**

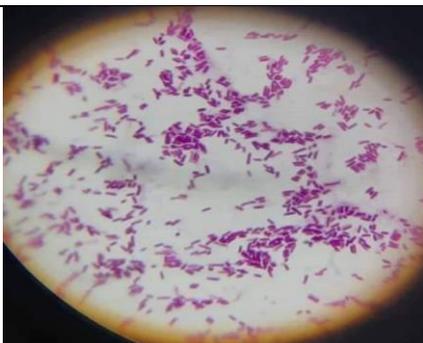
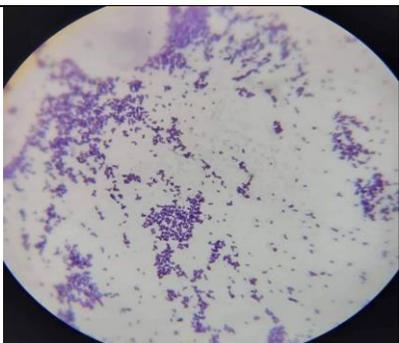
Extraits de l'olivier de Laperinne	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Bibliographie
Extrait de graine	$1021,25 \pm 11,36$	Notre résultat
Extrait de feuille	$234,91 \pm 7,69$	Lahcene (2020)
Extrait de tiges	$383,17 \pm 12,36$	Beseddik et Rami (2021)
Extrait de fruit	387,5	Ouattara (2021)

### 3.3. Activité antibactérienne

#### 3.3.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes

Afin de vérifier la pureté des souches bactériennes utilisée au cours de notre expérimentation, une coloration de Gram est réalisée ainsi que des tests biochimiques, les résultats sont résumés dans le tableau VI.

**Tableau VI:** Résultats de la coloration Gram et des tests d'identification biochimique des souches bactériennes

	<i>E.coli</i> ATCC 25992	<i>S.aureus</i> LGA 251
Coloration de Gram	 <p>Bacille de couleur rose Gram-</p>	 <p>Cocci en grappe de raisin de couleur violette Gram+</p>
Test de DNase	-	DNase +
Test de la Catalase	-	 <p>Catalase +</p>
TSI	<p>Gaz + Lactose + Glucose + Virage du milieu du rouge au jaune</p>	-

La coloration de Gram et les tests biochimiques réalisés montrent bien que les souches bactériennes sur lesquelles porte notre expérimentation sont bien pures et correspondent respectivement à *E. coli* et à *S. aureus*.

### 3.3.2. Test de diffusion sur milieu solide

Nous étudions dans des conditions *in vitro* le pouvoir antibactérien de l'extrait aqueux (EA) et éthanoliques (EE) des feuilles d'olivier de Laperrine par la méthode de diffusion sur milieu solide MH.

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

Afin de mettre en évidence l'effet antibactérien des extraits EA et EE, nous avons réalisés une gamme de concentrations des extrait de 0,2 à 0,6 g/ml afin de les tester sur les souches bactériennes.

Les résultats obtenus montrent que les extraits EA et EE présentent une activité antibactérienne vis à vis des deux souches bactériennes utilisées (Tableau VII).

**Tableau VII:** Le degré de sensibilité des bactéries testées en fonctions des concentrations

Souche	Extrait	Concentrations (g/ml)		
		0,6	0,4	0,2
<i>E.coli</i> ATCC25922	EA	+	+	+
	EE	+	+	+
<i>S.aureus</i> LGA251	EA	+	+	+
	EE	+	+	+

Les diamètres des zones d'inhibition mesurés varient de 8 à 14 mm (Fig. 13), les deux souches bactériennes testées sont donc selon Ponce (2003), sensibles aussi bien à l'extrait EA qu'à l'extrait EE. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Benramdane et Djouab (2016) qui ont démontrés l'effet bactéricide des extraits bruts de feuilles de l'olivier sur neuf souches bactériennes.

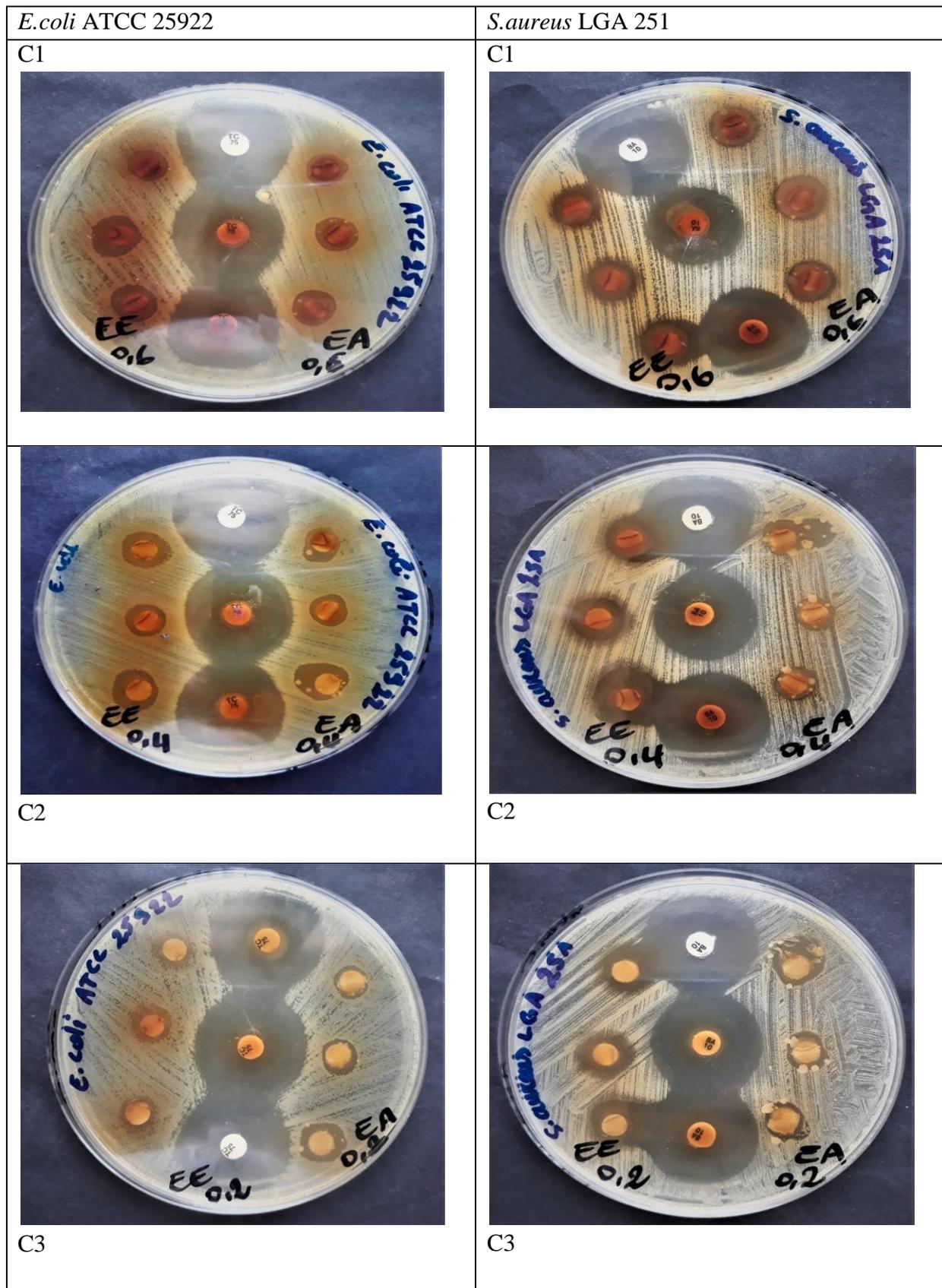


Figure 13 Résultats des tests antibactérien EA, EE de *E.coli* et *S.aureus*. C1 :0,6g/ml ; C2 :0,4g/ml ; C3 : 0,2 g/ml

Detérmination de la CMI

Les resultats de la CMI des extraits aqueux et éthanoliques sont rapportés dans le tableau VIII et la figure 14.

Tableau VIII: Résultats de l'inhibition de la CMI

Souche	Extrait	Concentration en g/ml					
		0,6	0,4	0,2	0,1	0,5	0,025
E.coli ATCC25922	EA	-	-	-	+	+	+
	EE	-	-	-	+	+	+
S.aureus LGA251	EA	-	-	-	-	-	+
	EE	-	-	-	-	-	+

- : pas de croissance, + : croissance.

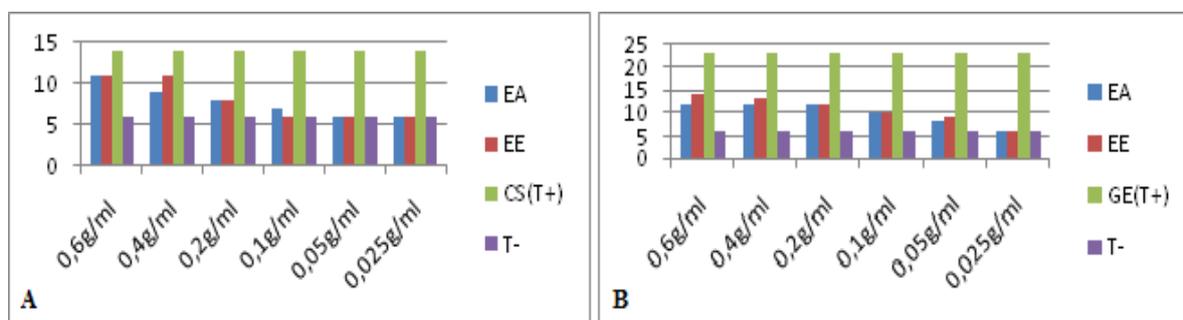


Figure 14: Résultats de la CMI des extraits aqueux et éthanolique sur A : *E.coli* ATCC 25992, B : *S. aureus* LGA 251

Dans le cas d'*E.coli*, seulement deux concentrations (0,4g/ml, 0,2g/ml) des extraits EA et EE donnent des zones d'inhibitions de la croissance alors que les trois autres concentrations (0,1g/ml ; 0,05g/ml et 0,025g/ml), elles ne donnent aucune inhibition de la croissance bactérienne. Pour *S.aureus* LGA 251, les concentrations 0,4g/ml, 0,2g/ml, 0,1g/ml, 0,05g/ml des extraits EE et EA inhibent de la croissance bactérienne. Quant à la concentration de 0,025g/ml, elle ne présente aucune inhibition de la croissance chez *S. aureus*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Benramdane et Djouab (2016) qui enregistrent chez *S.aureus* LGA 251 une CMI à la concentration de 1,56 mg/ml pour un extrait aqueux de feuilles de l'olivier de Laperrine et à une concentration de 25 mg/ml pour un extrait éthanolique.

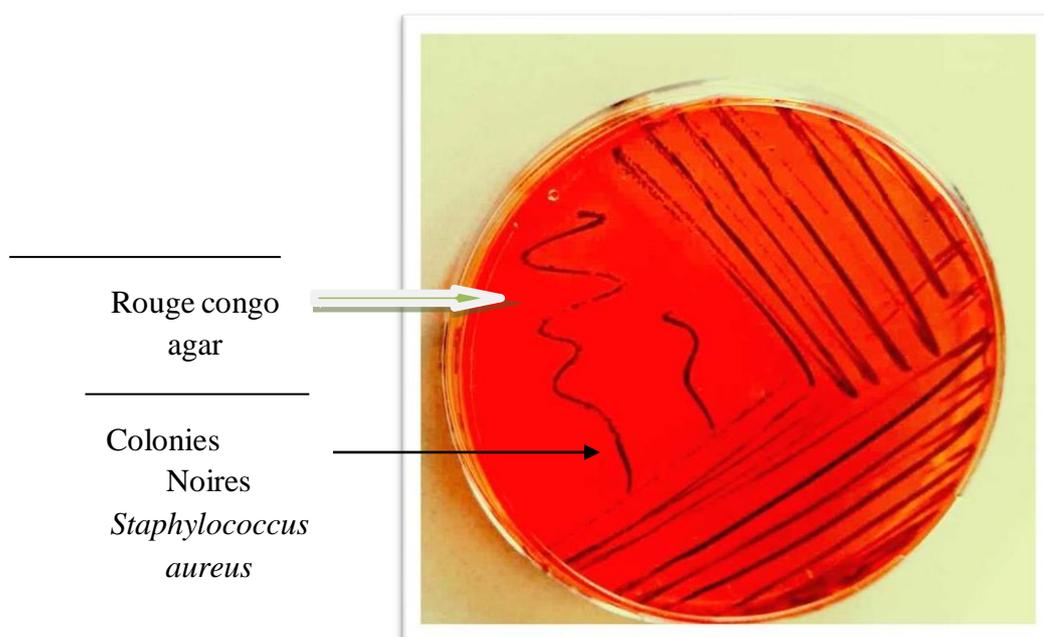
### 3.4. Activité antibiofilm

#### 3.4.1. Evaluation de la formation de biofilm :

Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms, Ils ont montré que les bactéries productrices de biofilms sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (Saitou, 2009).

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm *in vitro* ont été établies, telle que la méthode qualitative du Rouge Congo. (Freeman et *al.*, 1989; Mathur et *al.*, 2006)

Le criblage de la production de biofilms par la méthode Gélose Rouge Congo a montré que la souche étudiée *Staphylococcus aureus* LGA 251 est fortement formatrice de biofilms, présentant des colonies noires avec un cristallin de consistance sèche sur Gélose Rouge Congo. Cet aspect est dû à la production des exo-polysaccharides(EPS) ou(SLIME) qui réagissent avec le rouge Congo (Fig.15).



**Figure 15 :** Production de slime chez *Staphylococcus aureus* isolé sur milieu rouge congo

#### 3.4.2. Evaluation de l'activité antibiofilms des extraits aqueux et éthanolique de feuilles de l'olivier de laperrine et détermination de la CMI :

Les résultats des tests de sensibilité de *S. aureus* aux EE et EA par la méthode de diffusion des disques sur milieu de culture solide RCA et la détermination de la CMI sont résumés dans le tableau VIII).

**Tableau VIII : Résultat de l'inhibition de la formation du biofilm par les extraits aqueux et éthanolique.**

Concentration des extraits EE/EA	0,4g/ml	0,2g/ml	0,1g/ml	0,05g/ml	0,025g/ml	0,0125g/ml
Croissance(+) ou absence de croissance(-) <i>Staphylococcus aureus</i> LGA 251	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+

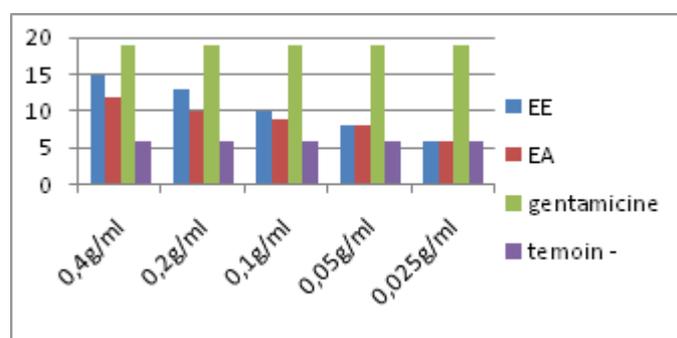
(+) : croissance, (-) : pas de croissance,

D'après les résultats obtenus, les extraits aqueux et éthanolique présentent un effet antibiofilms, inhibant la croissance de la bactérie testée. Les résultats obtenus pour ces composés sont comparables à ceux obtenus par la gentamicine (témoin positif).

Pour les deux extraits, les concentrations 0,4g/ml ; 0,2g/ml ; 0,1g/ml ; 0,05g/ml donnent des zones d'inhibition supérieures ou égale à 8 mm. De plus, les diamètre d'inhibition mesurés augmentent en fonction de la concentration des extraits, il ya absence de formation du biofilm, ce qui démontre la sensibilité de la souche aux différentes concentrations des extraits EE et EA.

Aussi pour les extraits éthanolique et aqueux des feuilles de l'olivier de Laperrine, la concentration correspondant à la valeur de 0,025g/ml donne des zones d'inhibitions inférieure à 8 mm, il ya formation de biofilms, ce qui démontre la résistance de la souche aux extraits EE et EA à cette concentration.

La concentration minimale inhibitrice du biofilms formé par *Staphylococcus aureus* LGA 251 se situe entre les concentrations de 0,025g/ml et 0,05g/ml comme en témoignent la figure 16.

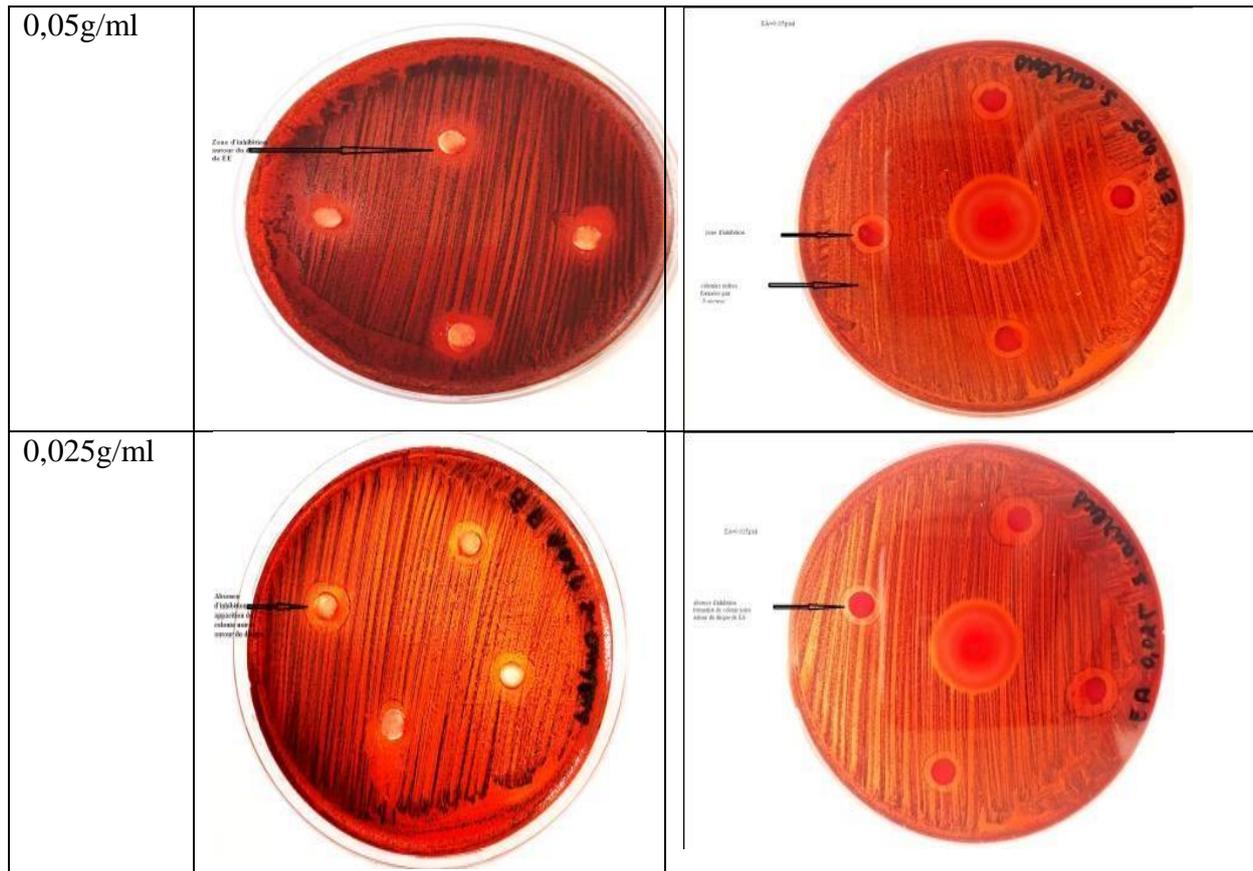


**Figure 16:** Résultats de l'activité antibiofilms des extrait aqueux et éthanolique de feuilles de l'olivier de Laperrine les zones d'inhibitions sont exprimées en mm (Souche productrice de biofilms *Staphylococcus aureus* LGA 251)

Les différentes zones d'inhibition sont illustrées dans la figure 17 qui démontrent bien que la CMI est située entre les concentrations correspondant aux valeurs de 0,025g/ml et 0,05g/m.

Figures 17 : Résultats de l'activité antibiofilm des extraits EA et EE

Concentration	Extrait éthanolique	Extrait aqueux
0,4g/ml		
0,2g/ml		
0,1g/ml		



# **Conclusion générale**

La présente étude rentre dans le cadre de la valorisation de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *Laperrinei*), espèce endémique des hautes montagnes sahariennes de l'Algérie. L'olivier se caractérise par sa remarquable résistance à un environnement hostile et sec, il présente en effet, des caractéristiques morphologiques et physiologiques qui lui permettent de s'adapter aux conditions arides de son habitat. Cette adaptation se manifeste entre autres par la synthèse des métabolites secondaires. Ces dernières constituent les éléments essentiels dans les interactions de la plante avec son environnement.

L'objectif de cette étude est de quantifier le contenu phénolique de l'extrait aqueux de graines à travers les méthodes spectrométriques et d'évaluer leurs propriétés antioxydantes par le test de la capacité antioxydante totale (CAT) et le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP). De plus, une évaluation de l'activité antibactérienne et anti-biofilms est menée sur les extraits bruts issus de feuilles.

L'estimation quantitative des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins totaux, a montré que les graines de l'olivier de Laperrine renferment des polyphénols les teneurs calculées sont cependant négligeables par rapports à celles enregistrées dans les feuilles, les tiges et les fruits.

La CAT et la FRAP montrent que l'extrait de graines est doté d'une capacité antioxydante totale, et d'un pouvoir réducteur peu élevés mais qui sont cependant non négligeables en comparaison avec d'autres familles de graines, ces deux paramètres sont corrélés avec le contenu en polyphénols de l'extrait étudié. Ainsi l'extrait de graines semble présenter un relatif potentiel en tant que piègeur de radicaux libres.

Nous relevons aussi que les extraits de feuilles présentent une bonne activité antibactérienne contre les deux souches testées et qu'ils ont un potentiel anti-biofilms qu'il convient de mieux étudier.

Nos résultats sont obtenus dans des conditions *in vitro*, il serait judicieux de compléter cette étude par des tests *in vivo* pour mieux apprécier et appliquer les résultats obtenus au cours de notre expérimentation.

Il serait aussi intéressant de réaliser :

\*Une identification des molécules présentes dans les extraits bruts sur lesquels a portée notre expérimentation avec des méthodes chromatographiques ;

- \*\*Une évaluation de l'activité antioxydante par d'autres test notamment le test DPPH ;
- \*\*\*Une évaluation de l'activité anti- microbienne et anti-biofilms sur des souches bactériennes multi résistantes.

# **Références Bibliographie**

**Abdel-Hameed, E.S. (2009).** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem.*114:1271-1277.

**Alcaráz L.E., Satorres S.E., Rodolfo M. L., Olga N. P de Centorbi. (2003).** Species identification, slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:45-51 ISSN 1517-8382.

**Aiche-Iratni G., Moualek I., Mestar-Guechaoui N., Mezaache-Aichour S., Zerroug M.M., Houali K. (2015).** In vitro evaluation of biological activities of Pistacia lentiscus aqueous extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(11): 133-139

**Aparna M.S., Sarita Y. (2008).** Biofilms: microbes and disease Review *Braz. J.Infect.Dis.* 12(6):526-30.

**Baali-cherif D. (2007).** Etude des populations d'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*) du Sahara central algérien (Hoggar et Tassili) : Aspects biologiques et caractérisation moléculaire. Thèse de doctorat. USTHB. Alger.102p.

**Baali-Cherif D., BesnardG. (2005).** High genetic diversity and clonal growth in relict populations of *Olea europaea* subsp. *Laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. *Annals of Botany*, 96 (5): 823-830.

**Baali-CherifD., BouguedouraN., BesnardG., BouhiredL. (2007).** Etude des populations de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*Batt. et Trab.) du Sahara Central algérien (Hoggar et Tassili) : aspects biologiques et caractérisation moléculaire. *Annales de l'Institut National Agronomique El Harrach*, 28(1-2): 35-73.

**Battandier M.J.A., Trabut L. (1911).** Contribution à la flore du pays des Touaregs.*Bulletin de la Société Botanique de France*, 58 (6): 623-629.

**Bénard C. (2009).** Étude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate .Thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'INPL .Mention : sciences agronomiques. UMR 1121 .Université de Nancy.

**Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuño A., Del Rio J.A. (2000).** Antioxydant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Food Chemistry*, 68(4): 22 457-462.

**Benichou A. (1962).** Recherches critiques sur l'Olivier de Laperrine. *Botanique Saharienne. Bulletin N° 6 de l'IRS, Université d'Alger*, 6:1-55.

**Benramdane E., Djouab L. (2016).** Screening phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts des feuilles de l'olivier de Laperrine *Olea europaea* subsp. *laperrinei* Batt et Trab sur neuf souches bactérienne. Master de microbiologie appliquée UMMTO. Algerie. 73p.

**Bensedike S., Rami K. (2021).** Analyse quantitative et évaluation de quelques activités antioxydantes d'extrait de tiges de l'olivier de Laperrine *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Batt. et Trab.) Cifferi. Master de Biochimie de la nutrition UMMTO. Algerie. 60p.

**Bergey D.H., Holt J.G., Krieg N.R., Peter H.A. (1994).** Sneath, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Lippincott Williams & Wilkins, books.google.com

**Besnard G. (2009).** Génétique et évolution des plantes en milieux méditerranéen et tropical. Thèse de doctorat, habilitation à diriger des Recherches. Université des Sciences et Technologies de Lille 1. France. 45p.

**Besnard G., Christin P.A., Baali-Cherif D., Bouguedoura N., Anthelme F. (2007a).** Spatial genetic structure in the Laperrine's olive (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*), a long-living tree from the central Saharan mountains. *Heredity*, 99 (6): 649-657.

**Besnard G., Rubio de Casas R., Vargas P. (2007b).** Plastid and nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*). *Journal of Biogeography* 34, 736-752

**Besnard G., Anthelme F., 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, 319-328

**Branda S.S., Vik S., Friedman L., Kolter R. (2005).** Biofilms: the matrix revised. *Trends in Microbiology* 13:20-26.

**Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie et phytochimie, plantes médicinales. Ed Tec et Doc. Lavoisier. Paris. 278-279.

**Bouchouka E. (2016).** Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. **Thèse de Doctorat en science Phytochimie** 2016 Université Badji Moktar de Annaba (UBMA). 126p.

**Boubekri C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat en sciences. Spécialité : Chimie. Faculté des Sciences exactes des sciences de la nature et de vie. Université Mohamed Khider .Biskra. Algerie. 210P.

**Bouaziz M., Sayadi S. (2005).** Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(7-8): 497-504.

**Boudjellal K. (2008/2009).** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* L. Thèse de magister : Biochimie Appliquée. Université El Hadj Lakhder Batne Algerie.84P.

**Boukhanouf S., Louaileche H., Perrin D.(2016).** Phytochemical content and in vitro antioxidant activity of faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by maturity stage and cooking practice. *International Food Research Journal* 23(3): 954-961.

**Butler L.G., Hagerman A. E. (1978).** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 26(4): 809-812.

**Carange J. (2010).** Rôle antioxydant et anti-apoptotiques des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection, Comme exigences partielle de la maîtrise en biophysique et biologie cellulaires. Thèse de doctorat. Université du Québec à trois-rivières.138p

**Cathy S. (2008).** Mes petites soupes magiques. Mincir grâce aux soupes aromatiques :Tous les bienfaits des légumes et des plantes dans un verre .Éditeur : LEDUC.S EDITIONS . EAN : 9782848992488 .224p.

**Caturla N., Perez-Fons L., Estepa A., Micol V. (2005).** Differential effects of oleuropein, abiophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem Phys Lipids*, 137: 2-17

**Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug 18 analysis*, 10(3): 178-182.

**Cronquist A. (1981).** An integrated system of classification plant. Columbia University. Press. New York. 1262p.

**Collin S ., Crouzet J.(2011).** Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Coll.: Agence Universitaire de la Francophonie. Edit : Lavoisier TEC& DOC. 11, rue Lavoisier 75008 .Paris. ISBN : 978-2- 28 7430-1338-7.

**Conibear T C., Collins S L., Webb J S. (2009).** Role of mutation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS One* 4:6289.

**Conrad.J., Volger B., Klaiber I., Roos p. (1998).**deux esters triterpéniques d'écorce de *terminalia macroptera* .ISSN:0031-9422; 48(4):647-650p

- Costerton J.W., Lewandowski Z., De Beer D., Caldwell D., Corber D., James G. (1994).** Minireview: biofilms, the customized microniche. *J. bactériol.* 176: 2137-2142
- Droge W. (2002).** Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* . 82(1) 11 47–95
- Donlan RM. (2002).** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease journal.* 8 (9): 881-890
- Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P.(2012).** Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Revue «Nature et Technologies»,* (07): 53-61.
- Davey M.E., O'Toole G. (2000).** Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology* 64 (4): 847-861.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique,* novembre-décembre 108-115.
- Ferreira I.C.F.R., Barros L., Soares M.E., Bastos M.L., Pereira J.A. (2007).** Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry,* 103(1): 188-195.
- Freeman D J., Falkiner F R., keane C T. (1989)** .Newmethod for detecting slime production by coagulase negative staphylococci *J. Clin. Pathol* 42:872-874.
- Garait B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Thèse de doctorat, discipline : Biologie Cellulaire université Joseph Fournier, Grenoble I, France. 189p.
- Ghedira K.(2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique phytothérapie 3(4), 162-169.
- Gibson H., Taylor J.H., Hall K.E., Holah J.T. (1999).** Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 87(1):41-48.
- Green P.S. (2002).** A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bull.* 57(1): 91-140.
- Guillouty A. (2016).** Plantes médicinales et antioxydants. Thèse de doctorat en Pharmacie Université III Paul Sabatier Toulouse, France. 94

**Hadj Salem J. (2009).** Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique. Doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine. France. 251 p.

**Hanhineva K., TÖrrÖen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., kolehmainen M., Mykkänen H., Poutanen B. (2010).** *Métabolism.Int.J.Mol-Sci*, 11:1365-1402.

**Houdjedje C ., Mehimmedetsi D. (2018).**Evaluation de l'activité antioxydante in vitro des extraits d'olives Thèse de Master en sciences de Toxicologie. Université des Frères Mentouri .Constantine.Algerie.119p.

**Hoffmann L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et 6 caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT) .Thèse de doctorat en : Biologiecellulaires .Université Louis Pasteur. Strasbourg.France.289p.

**Kholkhal F. (2014).** Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. Thèse de Doctorat en Biologie.Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.Algerie.200p.

**Lahcene S., Taibi F., Mestar N., Ali Ahmed S., Boumendjel M., Ouafi. S, Houali K. (2018).** Insecticidal effects of the *Olea europaea* subsp. *laperrinei* extracts on the flour Pyralid *Ephesia kuehniella*. *Cellular and Molecular Biology*. 64(11):6-12.

**Lahcene S .( 2020).** Caractérisation biochimique et activités biologiques des extraits de l'olivier de Laperrine *Olea europaea* subsp *laperrinei*(Batt. et Trab.) Cifferi.These de doctorat. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou Algerie.143P.

**Le Tutour B., Guedon D. (1992).** Antioxidative activities of *Olea europaea* related phenolic compounds. *Phytochemzstry*, 31(4): 1173-1178.

**Labga L., Meziani S., Saidani S., Liamani O., Demouche A. (2021).** Détermination des teneurs en polyphénols totaux et activité antioxydante des couches périphériques de trois phases des grains d'orge en développement. e-Congrès National sur la Valorisation des Substances et Matériaux Naturels 05 et 06 Juin 2021. 1-UDL-SBA .Université Djillali Liabes, Sidi Bel Abbes, Algérie.

**Lee O.H., Lee B.Y., Lee J., Lee H.B., Son J.Y., Park C.S., Shetty K., Kim Y.C. (2009).** Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidantactivities. *Bioresource Technology*, 100(23): 6107-6113.

**Leonoudakis D., Rane A., Angeli S., Lithgow G.J., Andersen J.K., Chinta S.J. (2017).** Anti-inflammatory and neuroprotective role of natural product securinine in activated glial cells, implications for Parkinson's disease. *Mediators of inflammation*, 2017, 1-11.

**Madi A. (2018).** Caractérisation phytochimique et évaluation des activités biologiques de *Cleome arabica*. Thèse de doctorat en science. Université des frères Mentouri. Constantine, Algérie .106p.

**Mariana N.S., Salman S.A., Neela V., Zamberi S. (2009).** Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research* 3:330-338.

**Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiolog.* 24: 25-29

**Medail F., Quezel P., Besnard G., Khadari B. (2001).** Systematics, ecology and 10 phylogeographic significance of *Olea europaea* L. ssp. *maroccana* (Greuter & Burdet) 11p.

**Meziti A. (2009).** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Étude in vitro et in vivo. mémoire Magister. Université El Hadj Lakhdar Batna Algérie.105P.

**Nagendran B., Kalyana S., Samir S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agrindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 12 99, 191–20.

**Ouattaka K. (2021).**Analyse quantitative et évolution de quelque activité antioxydantes des exrtrait bruts des fruits de l'olivier de Laperrine (*olea europaea* subsp .*laperrinei* ). Mémoire de masrer de Biochimie appliquée UMMTO. Algérie. 50 p.

**Ouattara K.E., Doga D., Orsot Bosson Arobia M.B., Zirihi Guédé N.(2021).** Plantes médicinales utilisées dans le traitement des maladies microbiennes dans la région du hambol, nord de la Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences* 47 (1): 8412-8425.

**Oliveira A., Cunha M D. (2010).** Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci.*BMC Research Notes*3:260

**Ophir T., Gutnick D.L. (1994).** A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.*60 (2):740-745.

**Parot S. (2007).**Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanisme. Thèse deDoctorat. Spécialité : Génie des Procédés et de l'environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, pp. 3-10. 247p

**Patra A.K., Saxena J. (2010).** A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen, .Disponible sur: [www.elsevier.com/locate/phytochem](http://www.elsevier.com/locate/phytochem) *Phytochemistry*. 71(11-12):1198–1222.

**Pietta P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7): 1035- 43 1042.

**Pisoschi A.M., Cheregi M.C., Danet A.F. (2009).** Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: Electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules*, 14(1),480-493.

**Ponce A.G., Fritz R., del Valle C., Roura S.I.(2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*36: 679-684.

**Rahman T., Hosen I., Towhidul I., Uddin S. H. (2012).** Oxidative stress and human health. *Advances in Biosciences and Biotechnology*, 3: 997-1019.

**Ray S-D., Wong V., Rinkovsky A., Bagchi M., Raje R.R., Bagchi D. (2000).** Unique organoprotective properties of a novel IH 636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride -induced nephrotoxicity in mice. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*.107(1-2):105-128.

**Rira M. (2019).** Les tannins hydrolysables et condensés : une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical. Thèse de Doctorat de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé -agronomie-environnement. Université Clermont Auvergne.France.231p.

**Robert J., Palmer J., Stoodley P. (2007).** Biofilms: Broadened Horizons and New Emphases. *Journal of Bacteriology*189:7948–7960.

**Rubio de Casas R., Besnard G., Schönswetter P., Balaguer L., Vargas P. (2006).** Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(4): 575-583.

**Saitou, K., Furuhashi, K., Kawakami, Y., Fukuyama M. (2009).** Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol science*14, 65-68

**Shakibaie M., Forootanfar H., Yaser Golkari Y .(2014).** Activité anti-biofilm des nanoparticules de sélénium biogénique et du dioxyde de sélénium contre les isolats cliniques de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis*. *Journal des oligo-éléments en médecine et en biologie*. 29 : 235-241.

**Singleton V.L., Rossi J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158.

**Stagos D., Amontzias G.D., Matakos A., spyrou A.A., Tsatsakis A.M., Kouretas D. (2012).** Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. Food and chemical Toxicology 50: 2155-2170.

**Tapas A.R., Skarkar D.M., Kakde R.B. (2008).** Flavonoids as nutraceuticals: A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 7(3):1089-1099.

**Urquiaga I., Leighton F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biological research, 33(2): 1-11.

**Vargas P., Muñoz Garmendia F., Hess J., Kadereit J. (2001).** Olea europaea ssp. Guanchica and ssp. Maroccana (Oleaceae), two new names for olive très relatives. Anales Jardin Botánico de Madrid 58: 360-361.

**Visioli F., Galli C. (2002).** Biological properties of olive oil phytochemicals. Critical reviews in food science and nutrition, 42(3): 209-221.

**Watterson J.J., Bulter L.G.(1983).** Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and absence of proanthocyanidins in sorghum leaves. J Agr. food. chem;31:41645

**Wollgast J., Anklam E. (2000).** Review on polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International,6(33):423-447.

**Yala D., Merad A.S., Mohamed D.,Ouar Korich M.N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine de Maghreb .N° 91.

**Yang., Hua X., Yunyun Z., Hyeon-Yong L., Juhee A. (2010).** Effect of NaCl on the Biofilm Formation by Foodborne Pathogens. J. of Food Sci. 75 (9):80-85.

**Zabayou.N. (2017).** Evaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes des composés phénoliques des lentilles crues et cuites. Mémoire Master. Université Mohammed Seddik Benyahia -Jijel-Algerie.84p.

