

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE-MICROBIOLOGIE



MEMOIRE

DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES
OPTION MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THEME

*Evaluation de l'activité antibactérienne et dosage
des polyphénols des extraits bruts des feuilles de
l'olivier sauvage (Olea europaea subsp sylvestris)*

Réalisé par :

M^{lle} LABANE SARAH

M^{lle} TADALA FERIEL

Devant le jury :

Mme MEGUENNI N. Maitre-assistant classe A à l'UMMTO..... **Président**

Mr HOUALI K. Professeur à l'UMMTO **Promoteur**

Mme GUECHAOUI MESTAR N. Maitre-assistant classe A à l'UMMTO **Co-Promoteur**

Mme IRATNI AICHE G. Maitre-assistant classe A à l'UMMTO **Examineur**

Mr MOUALEK I. Maitre-assistant classe B à l'UMMTO **Examineur**

Année universitaire 2014/2015

Remerciements

Nos remerciements les plus profonds vont à notre Promoteur Mr HOUALI K, Professeur à l'Université Mouloud MAMMERI-Tizi Ouzou, pour nous avoir accordé sa confiance, sa disponibilité, aussi pour son sérieux et sa gentillesse.

Nos remerciements s'adressent également à notre Co-promotrice Mme GUECHAOU N, Maître assistante à l'Université Mouloud MAMMERI-Tizi Ouzou, pour sa disponibilité, son assistance infaillible et ses encouragements.

Nous adressons nos sincères remerciements à la présidente du jury, qui a été notre professeur durant notre cycle. Merci à vous Mme MAGUENNI N, Maître assistante à l'Université Mouloud MAMMERI-Tizi Ouzou, d'avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions également Mme IRATNI G, Maître assistante à l'Université Mouloud MAMMERI-Tizi Ouzou, pour ses conseils, ses orientations ainsi que pour avoir aimablement accepté de siéger dans le jury de ce mémoire

Nos chaleureux remerciements vont à Mr MOUALEK I. Maître assistant à l'Université Mouloud MAMMERI-Tizi Ouzou, pour ses explications précieuses pendant la partie expérimentale et pour avoir accepté d'examiner ce travail.

On remercie également l'ensemble des personnes qui nous ont apporté leur aide : étudiants, doctorants, techniciennes, et tous ceux que nous ne pouvons pas citer individuellement.

A ma très chère mère Zohra

A mon père Sadi

A mes frères : Tarek, Samir, Arezki

Je vous aime.

Sarah.

Dédicaces

A mes parents, Yousef et Leila

A mes sœurs Nadia Hind et Khalida,

A mes frères Yacine et Mohiédine,

A ma famille, mes amis,

A toute personne qui m'est chère.

Feriel.

Table des matières

Résumé	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Liste des abréviations	iv
Introduction-Présentation du sujet	01

Partie I : Revue bibliographique

Chapitre I : Généralités sur l'Olivier « *Olea europaea subsp. sylvestris* »

I.1. Historique	03
I.2. Origine et habitat	03
I.3. Classification	04
I.4. Répartition géographique	04
I.5. Morphologie et description botanique d' <i>Olea europaea subsp. oleaster</i>	06
I.5.1 Description botanique de l'olivier	07
I.5.2 Description botanique de la feuille de l'olivier	07
I.6. Utilisation traditionnelle	08
I.7. Composition chimique	08

Chapitre II : Les polyphénols présents dans les feuilles d'olivier et leurs propriétés thérapeutiques.

II.1. Présentation	10
II.2. Classification des composés bioactifs	11
II.2.1. Les composés non flavonoïdes	11
II.2.1.1. Acide phénolique	11
II.2.1.2. Les secoiridoides	12
II.2.1.3. Les coumarines	12

II.2.2.Les composés flavonoïdes	13
II.2.2.1.Les flavonoïdes	13
II.2.2.2.Les anthocyanes	13
II.2.3.Les tanins	14
II.3.Propriétés thérapeutiques des composés bioactifs.....	15

Partie II : Matériel et méthode.

I. Matériel	20
I.1.Equipements et réactifs chimiques.....	20
I.2.Milieus de cultures utilisées	20
I.3. Matériel biologique	20
I.3.1. Matériels végétal utilisés.....	20
I.3.2. Souche bactériennes testées	21
II. Méthode	22
II.1. Echantillonnage	22
II.1.1. Processus de l'obtention de la poudre	22
II.2.Préparation des extraits bruts.....	23
II.2.1.Extraction assistée par ultrasons (EAU)	23
II.2.2.Extraction assistée par microonde (EAM).....	23
II.2.3.Extraction par un solvant (Ethanol) (EE)	23
II.2.4. Calcul du rendement pour chaque extraction	24
II.3.Etude de l'action antibactérienne	24
II.3.1.Préparation des suspensions bactériennes.....	24
II.3.2.Préparation des échantillons	25
II.3.3.Détermination de l'activité antibactérienne	25
II.3.4. Détermination de la CMI.....	26
II.4. Dosage des polyphenols	27

II.5. Analyse statistiques	28
Partie III. Résultats et discussions	29
Partie IV. Conclusion	45
Annexe	

Résumé :

Dans l'optique d'une connaissance approfondie des plantes à activité antibactérienne, nous nous sommes intéressés aux feuilles de l'olivier sauvage, *Olea europaea subsp. sylvestris*, une plante médicinale traditionnelle dont l'utilisation est très répandue dans le bassin méditerranéen.

L'activité antibactérienne des feuilles de cette oléastre a été testée sur quatre souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

Les feuilles de la plante ont été soumises à une extraction éthanolique (EE), une extraction assistée par ultrasons (EAU) et une extraction assistée par microonde (EAM).

Le rendement d'extraction des différents extraits était de 16.70%, 11.30% et 9.83% respectivement pour l'extraction assistée au microonde, l'extraction à l'éthanol et l'extraction assistée aux ultrasons.

Selon les résultats obtenus, sur les souches testées, nous avons remarqué que nos différents extraits bruts des feuilles d'*O. sylvestris* semblent avoir des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de *B. cereus* et de *S. aureus*.

Les tests effectués ont donné des résultats positifs avec un diamètre d'inhibition atteignant les 22 mm pour *S. aureus*.

Une CMI de l'ordre de 15.63mg/ml et de 31.25 mg/ml a été obtenue pour l'extrait éthanolique vis-à-vis de *S. aureus* et de *B. cereus*.

Pour les extraits obtenus par extraction assistée par microonde, elle a été de l'ordre de 15.63mg/ml pour *S. aureus* et de 62.5mg/ml pour *B. cereus*.

L'analyse quantitative des extraits, a montré lors du dosage des polyphénols totaux que l'extrait obtenu par extraction éthanolique est plus riche 20.7 ± 0.5 mg EAG/g que l'extrait obtenu par extraction assistée par microonde 20.1 ± 0.9 mg EAG/g.

Mots clefs : Feuilles d'olivier, *Olea europaea* L, Oléastre, Activité antimicrobienne, Polyphénol.

Abstract :

In the context of a thorough knowledge of plants to antibacterial activity, we looked to the leaves of the wild olive tree, *Olea europaea subsp. sylvestris*, a traditional medicinal plant whose use is answered in the Mediterranean.

The antibacterial activity of the leaves of this Oleaster was tested on four strains of bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

The leaves of the plant were subjected to an ethanolic extraction (EE), an ultrasound-assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (ASM).

The extraction yield of the different extracts was 16.70%, 11.30% and 9.83% respectively for extracting the microwave assisted, extraction with ethanol and extraction assisted with ultrasound.

According to the results obtained on the strains tested, we noticed that our various crude extract of the leaves of *O. sylvestris* seems to have antimicrobial properties overlooked *B. cereus* and *S. aureus*.

The tests yielded positive results with inhibition diameter reaching 22mm for *S. aureus*.

An MIC of about 15.63mg/ml and 31.25 mg/ml was obtained for the ethanol extract overlooked *S. aureus* and *B. cereus*.

For the extracts obtained by microwave assisted extraction, it was of the order of 15.63 mg/ml for *S. aureus* and 62.5mg/ml for *B. cereus*.

The quantitative analysis of the extracts showed during the determination of total polyphenols that the extract obtained by ethanolic extraction was more rich 20.7 ± 0.5 mg EAG / g that the extract obtained by microwave assisted extraction 20.1 ± 0.9 mg EAG / g.

Keywords: Olive leaves, *Olea europaea* L, oleaster, Antimicrobial activity, Polyphenol.

Abstrat :

In the context of a thorough knowledge of plants to antibacterial activity, we looked to the leaves of the wild olive tree, *Olea europaea* subsp *sylvestris*, a traditional medicinal plant whose use is answered in the Mediterranean.

The antibacterial activity of the leaves of this Oleaster was tested on four strains of bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

The leaves of the plant were subjected to an ethanolic extraction (EE), an ultrasound-assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (ASM).

The extraction yield of the different extracts was 16.70%, 11.30% and 9.83% respectively for extracting the microwave assisted, extraction with ethanol and extraction assisted with ultrasound.

According to the results obtained on the strains tested, we noticed that our various crude extract of the leaves of *O.e sylvestris* seems to have antimicrobial properties overlooked *B.cereus* and *S.aureus*.

The tests yielded positive results with inhibition diameter reaching 22mm for *S.aureus*.

An MIC of about 15.63mg/ml and 31.25 mg/ml was obtained for the ethanol extract overlooked *S.aureus* and *B.cereus*.

For the extracts obtained by microwave assisted extraction, it was of the order of 15.63 mg/ml for *S.aureus* and 62.5mg ml for *B.cereus*.

The quantitative analysis of the extracts showed during the determination of total polyphenols that the extract obtained by ethanolic extraction was more riche 20.7 ± 0.5 mg EAG / g that the extract obtained by microwave assisted extraction 20.1 ± 0.9 mg EAG / g.

Keywords: Olive leaves, *Olea europaea* L, oleaster, Antimicrobial activity, Polyphenol.

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Répartition géographique d' <i>Olea europaea</i> L, dans le bassin méditerranéen.	05
Figure 02 : Répartition de l'olivier sauvage en Algérie selon les zones les plus importantes	05
Figure 03 : Aspect buissonnant de l'olivier sauvage de la région d'Ouled Ali.....	06
Figure 04 : Forme lancéolée des feuilles de l'olivier sauvage de la région d'Ouled Ali ...	07
Figure 05 : Structures des acides phénoliques.....	11
Figure 06 : Structure chimique de l'oleuropeine.....	12
Figure 07 : Structures chimiques des coumarines	13
Figure 08 : Structure de base des flavonoïdes	13
Figure 09 : Structure de base des anthocyanes.....	14
Figure 10 : Structure de base des tanins	15
Figure 11 : Localisation géographique du site d'échantillonnage.....	22
Figure 12 : Histogramme rendement des différentes extractions	29
Figure 13 : Extraits bruts obtenus après extraction	30
Figure 14 : Histogramme des distributions des diamètres moyens des zones d'inhibition des quatre souches en fonction des solvants et des types d'extractions	35
Figure 15 : Variation des diamètres d'inhibition en fonction de la concentration des extraits vis-à-vis de <i>S.aureus</i>	41
Figure 16 : Variation des diamètres d'inhibition engendrés par <i>B.cereus</i> en fonction de la concentration des extraits.....	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : La classification botanique de l'arbre de l'olivier sauvage	04
Tableau II : Composition chimique globale des feuilles de l'olivier.....	09
Tableau III : Les propriétés thérapeutiques des composés bioactifs présent dans les feuilles de l'oléastre19	
Tableau IV : Préparation des échantillons pour chaque extrait brut solubilisé dans de l'eau distillée et du DMSO à 1%	25
Tableau V : Tableau illustrant les différentes gammes de concentration des extraits bruts	26
Tableau VI : Tableau récapitulatif regroupant le rendement et l'aspect organoleptique des différents extraits.....	29
Tableau VII : Diamètre d'inhibition de l'extrait éthanolique sur les quatre souches testées33	
Tableau VIII : Diamètre d'inhibition de l'extrait obtenu par extraction assisté par microonde sur les quatre souches testées	33
Tableau IX : Diamètre d'inhibition de l'extrait obtenu par extraction assisté par ultrasons sur les quatre souches testées	34
Tableau X : Analyse de la variance.....	34
Tableau XI : Représentation des résultats de l'activité antimicrobienne effectués sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Escherichia coli</i>	37
Tableau XII : Représentation de l'activité antimicrobienne effectuée sur <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Tableau XIII : Représentation des résultats des tests préliminaires effectués sur <i>Bacillus cereus</i>	39
Tableau XIV : Valeur des CMI des extraits obtenus par EE et MAE vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Tableau XV : Valeur des CMI des extraits obtenus par EE et MAE vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i>	42
Tableau XVI : illustration des résultats de la CMI des extraits obtenus par EAM et EE vis-à-vis de <i>S aureus</i>	43
Tableau XVII : illustration des résultats de la CMI des extraits obtenus par EAM et EE vis-à-vis de <i>B cereus</i>	43

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs : absorbance.

ATCC : American Type Culture Collection.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

D1 : première dilution.

D2 : seconde dilution.

DMSO : Dimethylsulfoxyde.

EAG/g .MS : Equivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.

EAM : extraction assisté par microonde.

EAU : extraction assisté par ultrason.

ED : Eau distillée.

EDS : Eau distillée stérile.

EE : extraction éthanolique.

Eth : Ethanol.

Mg EAG : milligramme Equivalent d'acide gallique.

MS : matière sèche.

R(%) : rendement.

SM : solution mère.

UFC : Unité formant colonie.

DNID : diabète non insulino-dépendant.

L'émergence de microorganismes pathogènes multi résistants, due à l'usage abusif et inapproprié des antibiotiques, pose actuellement un problème de santé publique assez préoccupant. En effet, la résistance des bactéries aux antibiotiques rend parfois le traitement thérapeutique inefficace, et met le praticien dans des situations délicates, surtout lorsque la vie du malade en dépend. **(Chebaïbi et al, 2007)**

La solution de ce problème s'avère donc urgente et impose la recherche de nouveaux agents antimicrobiens.

Le recours aux plantes médicinales aux propriétés antimicrobiennes constitue alors une des plus intéressantes pistes à explorer. Précisons que cette pratique n'a pas entièrement disparu dans les campagnes et chez les minorités ethniques de nos sociétés modernes, ainsi ce type de médecine est encore très pratiqué et représente pour les plus défavorisés un complément ou une alternative à la médecine moderne souvent inaccessible **(DellilL., 2013)**.

Selon l'OMS, 65-80% de la population mondiale dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins primaires. **(Newmann, 2000)**

En effet, les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines,...) et peuvent être mises en évidence par différentes techniques d'extraction et de purification, afin d'isoler les principes actifs et les utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés. **(Durauffourd et al , 1997)**.

Olea europaea L est l'une des plantes médicinales les plus utilisées en médecine traditionnelle dans le bassin méditerranéen. Depuis des siècles, les populations méditerranéennes l'ont exploitée comme traitement contre de multitudes de maux (fièvres, plaies infectées, éruptions cutanées...).

Notre travail a pour objectif d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Olea europaea* subsp *sylvestris* obtenus à la suite de différentes méthodes d'extraction.

Ainsi, nous proposons de structurer notre mémoire comme suit :

Une première partie réservée à la présentation de l'espèce étudiée et aux généralités sur les principes actifs de cette plante.

La seconde partie traite la partie expérimentale, ainsi que l'interprétation et la discussions des résultats obtenus.

En fin une conclusion générale résumant les résultats de notre travail, ainsi que quelques perspectives.

I.1 .Historique :

L'olivier est un arbre qui a accompagné le développement de la civilisation méditerranéenne, traité avec égards et respect, il a de tout temps été au centre des préoccupations de la civilisation agraire de ces régions, fournissant nourriture, lumière, cosmétique et médicaments **(Polese, 2007)**.

Il constitue la base de la bonne santé des habitants de ces pays et représente le fleuron de ce que l'on appelle maintenant le régime méditerranéen. Le nom scientifique de l'arbre, *Olea*, vient d'un mot qui signifiait « huile » chez les Grecs de l'Antiquité.

Sa première domestication date des anciennes civilisations de la Méditerranée, lorsque les grecs fondèrent des cités le long de son pourtour et que les phéniciens créèrent des colonies en Afrique du nord ils apportèrent avec eux le goût de cette culture **(Moreaux, 1997)**.

On en trouve la trace historique avant même la naissance de l'écriture. On a retrouvé des rameaux d'olivier dans des tombeaux égyptiens. Les Anciens Égyptiens utilisaient la feuille d'olivier dans le processus de momification des membres de la famille royale.

Symbole de vie de savoir de fidélité de victoire et de puissance autrefois, l'arbre a conservé sa force symbolique et le rameau d'olivier est devenu symbole de la paix et de la victoire partout dans le monde. Il figure actuellement sur le drapeau de l'ONU. **(Ventoso, 2013)**.

I.2 .Origine et habitat :

Originaire de l'Asie mineure, sa culture s'est étendue à tout le bassin méditerranéen à partir du sixième siècle. Aujourd'hui on en trouve même en Australie, en Afrique du Sud, au Japon, en Californie et au Chili. **(Verdier, 2003)**

Hivers froids, étés secs, sols pauvres, c'est tout ce dont l'olivier a besoin. Il requiert peu de soins et pousse même sur des terrains rocheux. **(Loumou, 2003)**.

I.3. Classification :

Selon **Ghedira, (2010)**, *Olea europaea subsp. sylvestris* appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé *Olea* et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce Méditerranéenne est "*Olea europaea*", dans laquelle on trouve l'oléastre ou l'olivier sauvage, et l'olivier cultivé. (**Tableau 01**)

Tableau I : La classification botanique de l'arbre de l'olivier sauvage selon **Ghedira, (2008)**.

Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	<i>Magnoliophyta</i>
Sous embranchement :	<i>Magnoliophytina</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe :	<i>Dialypetales</i>
Ordre :	<i>Lamiales</i>
Famille :	<i>Oleaceae</i>
Genre :	<i>Olea</i>
Espèce :	<i>Olea europaea L</i>
Sous espèce :	<i>O. europaea subsp. sylvestris</i>

I.4. Répartition géographique :

A/ Répartition géographique dans la méditerranée :

La zone naturelle de répartition géographique de l'olivier dans le monde se situe principalement entre le 30^e et le 45^e degré de latitude nord et sud (**figure 01**).

L'olivier est cultivé par ordre d'importance en Afrique en : Tunisie, Maroc, Algérie, Libye, Egypte, Afrique du Sud et Angola. En Europe : Espagne, Italie, Grèce, Portugal, Albanie, Chypre, France, Slovénie et Malte. Au Moyen Orient et en Asie : Turquie, Syrie, Palestine, Liban, Israël, Jordanie, Irak, Iran et Chine.

Selon (**Verdier, 2003**), environ 97% des 850 millions d'oliviers, qui couvrent une superficie de 9500000 hectares, dans le monde poussent en région méditerranéenne.

Le bassin méditerranéen reste une zone privilégiée par rapport au reste du monde pour la culture de l'olivier grâce à son climat adéquat tant au niveau de la température mais aussi au niveau de l'hydrométrie (**Gaussorgues, 2009 ; Carrion, et al., 2010**).

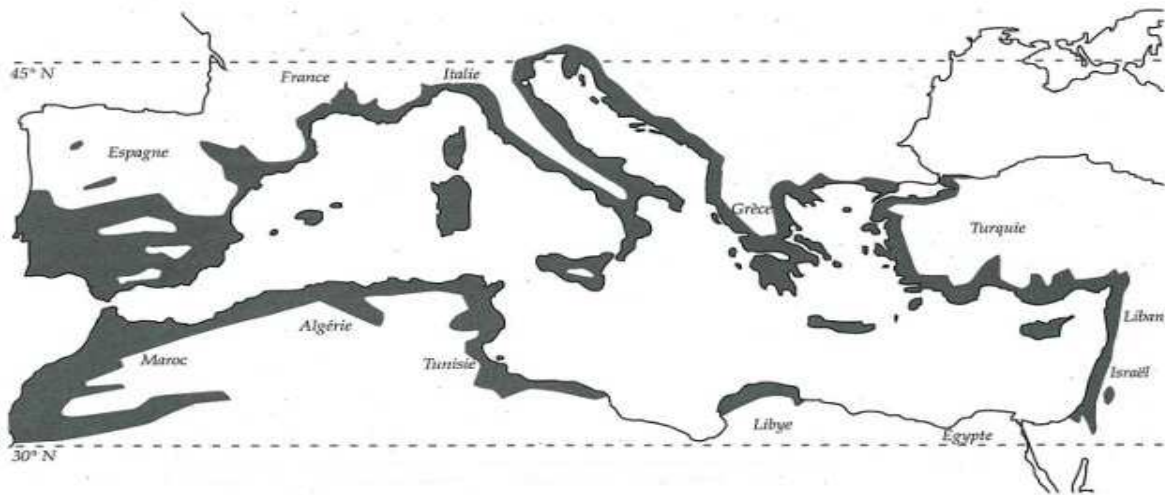


Figure 01 : Répartition géographique d'*Olea europaea* L, dans le bassin méditerranéen (Amouretti et Comet, 2000).

B/Répartition en Algérie :

En Algérie, l'olivier se répartit en trois zones importantes :

1. La zone de la région ouest, représentant 31 400 Hectares repartis en cinq wilayas qui sont : Tlemcen, Ain-Temouchent, Mascara, Sidi Bel Abbès et Relizane.
2. La zone de la région centrale, de loin la plus importante, elle couvre une superficie de 110 200 Hectare, repartis en : Ain Defla, Blida, Boumerdes, TiziOuzou, Bejaia, Bouira.
3. La zone de la région Est, représentant 49 900 Hectares, est repartis en : Jijel, Skikda, Mila et Guelma.

D'après(Khoumeri, 2009), la majorité des surfaces oléicoles se localisent dans les montagnes et les collines, recouvrant une surface d'environ 195 000 hectares.(Figure 02).

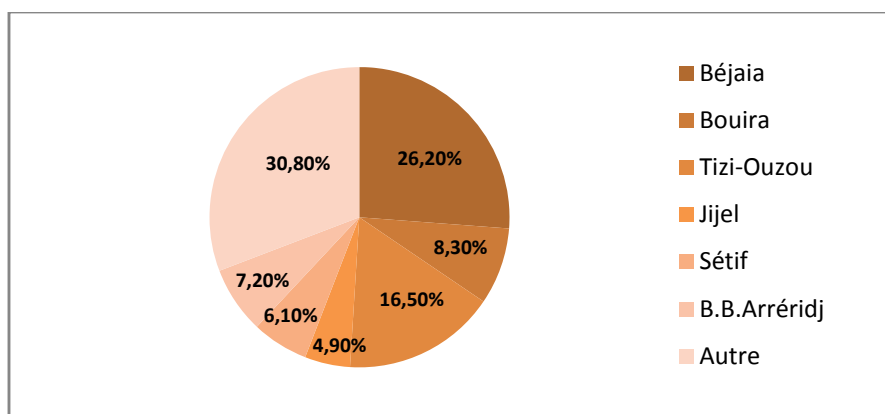


Figure 02 : Répartition de l'olivier sauvage en Algérie selon les zones les plus importantes.

I.5.Morphologie et Description botanique *Olea europaea subsp. sylvestris*:

I.5.1. Morphologie et situation botanique de l'olivier :

Dans le bassin méditerranéen, l'olivier se répartit en deux groupes: *Olea europaea subsp. sylvestris*, la variété sauvage (Oléastre) et *Olea europaea subsp. sativa*, la variété cultivée.

L'oléastre est un arbuste buissonnant de 6 m de haut maximum, a un troc lisse, gris, des branches régulières et des feuilles petites, les rameaux sont épineux, les feuilles sont plus courtes et plus raides que celles de l'olivier cultivé les fleurs sont blanc jaunâtre et petites. Les fruits n'ont pas les qualités de l'olivier cultivé, ils sont moins charnus et fournissent moins d'huile (**Jean Paquereau, 2013**).

(**Polese, 2007**) rapporte que les variétés actuelles d'oliviers sont issues de cet olivier sauvage, a force de soin et de sélection

L'oléastre se reproduit par graine, l'olivier cultivé, quant à lui, a besoin d'être greffé pour retrouver les vertus de l'arbre dont il est issu. (**André Berville, 2012**).



Figure 03 : Aspect buissonnant de l'Oléastre de la région d'Ouled Ali.

I.5.2. Description des feuilles de l'olivier :

Selon **Quezel et Santa** ,(1962), **Bruneton**, (1993) et **Hannachi et al.**, (2008), les feuilles de l'oléastre sont courtes, de largeur moyenne, d'environ 4-10 cm et de 1-3 cm de largeur, ovales ou ovales lancéolées ; la face inférieure est pubescente le long des nervures de couleur blanc argenté **(A)** et la face supérieure verte foncée luisante et lisse **(B)**. **(Figure 04)**

L'olivier est un arbre toujours vert ses feuilles sont inodores, amères et acerbes, elles vivent en moyenne trois ans puis jaunissent et tombent principalement en été. **(J-B Mouret, 1783)**, **(Molina alcaide et al., 2008)**

D'après **Boudhrioua et al.**, (2008), la production des feuilles est estimée à 25 kilogramme par olivier. En cas de sécheresse, les feuilles sont capables de perdre jusqu'à 60 % de leur eau, de réduire fortement la photosynthèse et de fermer les stomates permettant les échanges gazeux, pour réduire les pertes en eau par évapotranspiration, permettant ainsi la survie de l'arbre. C'est grâce à sa feuille que l'olivier peut survivre en milieu aride. Quand il pleut, les cellules foliaires s'allongent pour emmagasiner l'eau.



Figure 04 : Forme lancéolée des feuilles de l'olivier sauvage de la région d'Ouled Ali.

I.6. Utilisation traditionnelle:

À l'époque de la Grèce antique, on employait les feuilles pour désinfecter les blessures cutanées.

Les Anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Médecin, pharmacologue et botaniste grec, recommandait la feuille astringente en décoction contre les dents cariées pour les faire tomber (**Ventoso L, 2013**).

Au cours du dix-neuvième siècle les anglais y avaient recours pour traiter les maladies tropicales, telle la malaria (**Lee et al., 2008**)

I.7. Composition chimique :

Les feuilles fraîches de l'olivier sont caractérisées par une matière sèche aux alentours de 50%.

D'après(**Nefzaoui, 1995**), la composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, période de prélèvement, âge des plantations.

Des études ont été faites par (**Boudhrioua et al.,2009**) ; (**Erbay et Icier ,2009**) ;(**Garcia-Gomez et al.,2003**), sur la composition chimique des feuilles de l'olivier. (**Tableau II**)

Tableau II : Composition chimique globale des feuilles de l'olivier (exprimé en g par 100 g) selon plusieurs auteurs.

Composition (%)	Boudhrioua et al., 2009	Erbay et Icier, 2009	Garcia-Gomez et al., 2003
Eau	46,2-49,7 a	49,8 a	Nd
Protéine	5,0-7,6 a	5,4 a	Nd
Lipides	1,0-1,3 a	6 b	6,2 b
Minéraux	2,8-4,4 a	3,6 a	26,6 b
Carbohydrates	37,1-42,5 a	27,5 a	Nd
Fibres brutes	Nd	7,0 a	Nd
Cellulose	Nd	Nd	19,3 b
Hémicellulose	Nd	Nd	25,4 b
Lignine	Nd	Nd	30,4 b
Polyphénols totaux	1,3-2,3 b	Nd	Nd

a : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse fraîche des feuilles d'olivier.

b : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier. **nd** : valeur non déterminée.

II.1. Introduction :

Les végétaux ont la particularité de synthétiser un grand nombre de substances chimiques appelées métabolites secondaires. Ces métabolites sont des molécules nécessaires à la défense de la plante contre les agressions extérieures.

Les métabolites secondaires présentent une grande variété structurale, plus de 200 000 structures définies (**Hartmann, 2007**).

Ces dernières années ils se sont largement illustrés dans le domaine thérapeutique. (**Anderson et Markham., 2006**)

Les composés phénoliques ou polyphénols (PP) sont des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules divisées en plusieurs classes chimiques, qui présentent tous un point en commun : la présence d'au moins un cycle aromatique de six carbones dans leurs structures lui-même portant de nombreuses fonctions hydroxyles OH. (**Hennebelle et al., 2004**)

Les cycles aromatiques sont issus de deux grandes voies métaboliques de synthèse : la voie du shikimate et celle de l'acétate (**Bruneton,1999**).

D'après **Bouaziz et al.,(2005)**, les fruits de l'olivier et leurs dérivés (feuilles, tiges) représentent une source connue de plusieurs composants naturels d'une bio activité importante tel que les antioxydants comme l'oleuropeine, les flavonoïdes et les acides phénoliques.

Les composés phénoliques présents dans les feuilles de l'oléastre possèdent une activité biologique très importante liée essentiellement à leur pouvoir anti oxydant (**Sarni-Manchado et al., 2006**).

Pour **Visioli et al.,(2002)**, l'activité antioxydante de ces polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif tel que les cancers, et les maladies cardiovasculaires, mais aussi comme agent anti-inflammatoire, anti viral, anti microbien.

II.2. Classification des composés bioactifs

Les polyphénols présents dans les feuilles d'*Olea europaea* peuvent se diviser en deux grands groupes :

- Les composés non flavonoïde comportant : les acides phénoliques, les sécoiridoïdes, les coumarines.
- Les composés flavonoïdes comportant : les flavonoïdes, les tanins, les anthocyanes.

II.2.1. Les composés non flavonoïdes

II.2.1.1. Les acides phénoliques.

Ce sont des composés rencontrés universellement chez les plantes, ils se distinguent en (Figure 05):

- Les acides hydroxybenzoïques : l'acide salicylique et l'acide gallique.
- Les acides hydroxycinnamiques : l'acide férulique, l'acide caféique et l'acide coumarique.

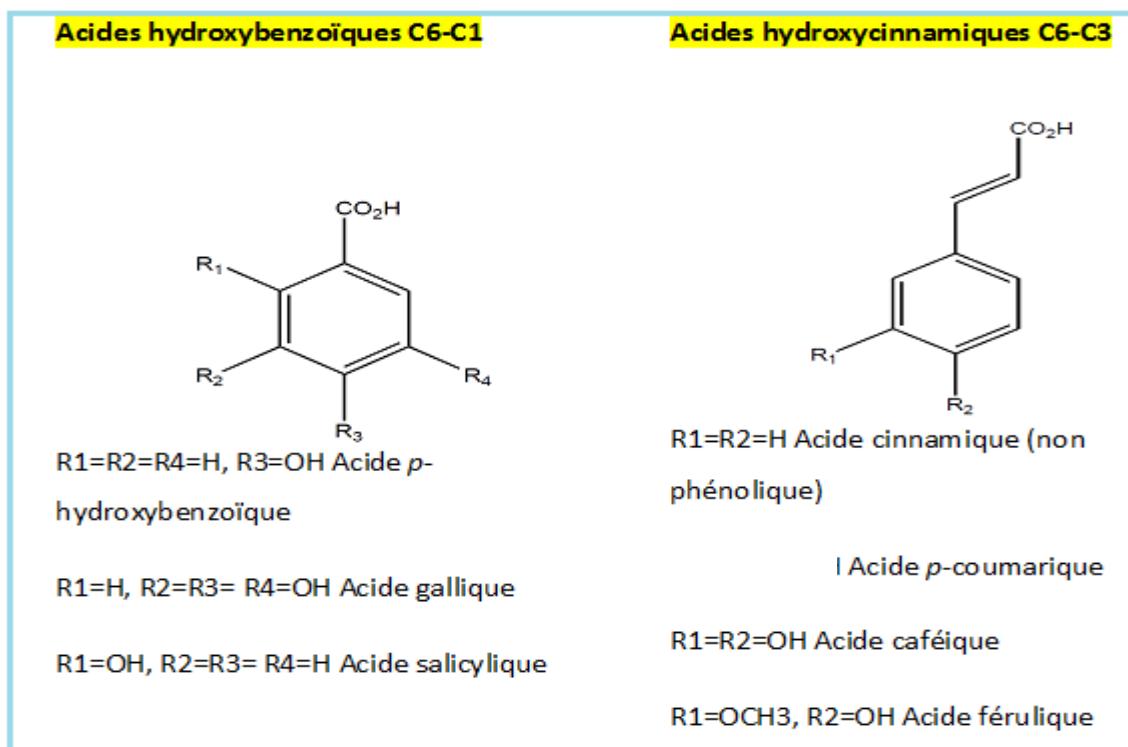


Figure 05 : Structures des acides phénoliques.

II.2.1.2. Les sécoiridoïdes :

Isolée en 1908, par Bourquelot et Vintilesco, l'oleuropeine est le sécoiridoïdes majoritaire des feuilles d'olivier, représentant 60 à 90 mg par g du poids sec et responsable de l'amertume typique et l'arome piquante associée aux olives et aux feuilles.

Pour **Bruneton, (1999)**, C'est un hétéroside sécoiridoïdes dérivé des iridoïdes. (**Figure 06**)

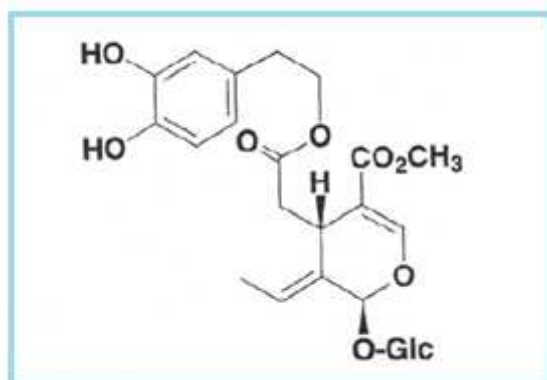


Figure 06 : Structure chimique de l'oleuropeine.

II.2.1.3. Les coumarines :

Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarounaodorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes.

Selon **Boubekri, (2014)**, les coumarines sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux. Leur structure est donnée dans la **figure 07**.

Ils ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance (**Hoffmann, 2003**).

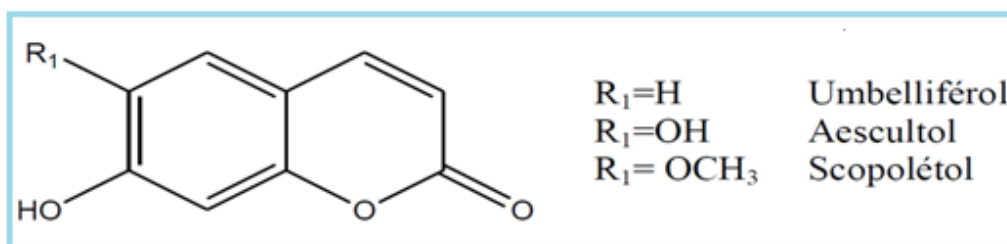


Figure 07 : Structures chimiques des coumarines.

II.2.2. Les composés flavonoïques :

II.2.2.1. Les flavonoïdes :

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner les pigments ayant un squelette ($C_6-C_3-C_6$) (**Figure 08**) provenant du mot latin flavus qui signifie jaune (**Bouakaz, 2006**).

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels. Ils constituent les pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (**Ghedira, 2008**).

D'après les tests *in vitro*, ils exercent des effets antioxydants jusqu'à 2.5 fois plus que la vitamine C et E (**Benavente-Garcia et al., 2000**).

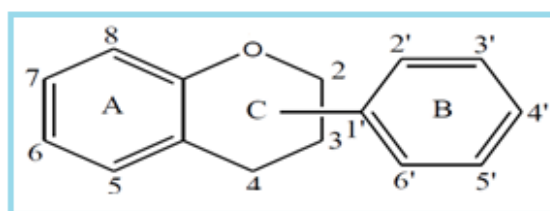


Figure 08 : Structure de base des flavonoïdes

II.2.2.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (flavones), qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleues, rouges, ou pourpre (**Mazza et Miniati, 1993**).

La structure des anthocyanes est illustrée sur la **figure 09**

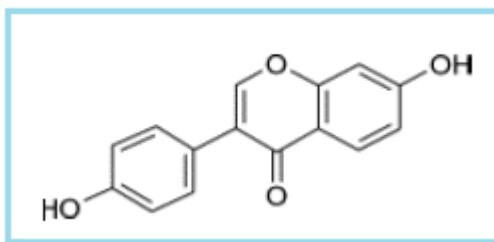


Figure 09: Structure de base des anthocyanes.

II.2.3. Les tanins

Les tanins sont des substances poly phénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

Selon **Paolini et al, (2003)**, il existe deux catégories de tanin d'origine biosynthétique différentes :

- Les tanins hydrolysables
- Les tanins condensés.

Bruneton, (1999) a défini les tanins hydrolysables comme des esters d'oses et d'acides phénoliques.

Guignard, (1996) a défini les tanins condensés comme des polymères flavanoliques, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbones-carbones le plus souvent, tel la catéchine.

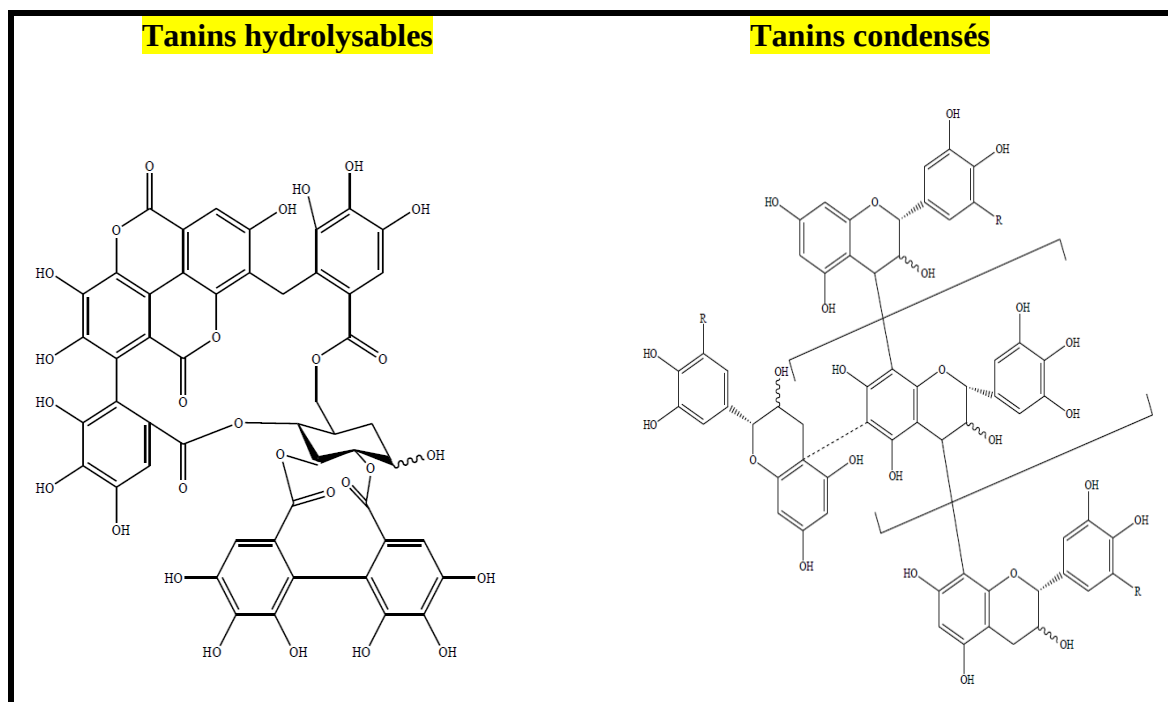


Figure 10 : Structure de base des tanins.

II.3. Propriétés thérapeutiques des composés bioactif d'*Olea europaea subsp. sylvestris*

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical et biotechnologique où on leur reconnaît des activités antivirales, anti tumorales, anti inflammatoires, antiallergiques, anticancéreuses et antimicrobiennes. (**Tableau 03**)

II.3.1. Activité hypotensive :

L'effet hypotenseur de l'extrait aqueux des feuilles d'olivier est du aux composés bioactifs via une action plasmolytique qui agit directement sur le muscle lisse. Il permet la dilatation des vaisseaux sanguins, des artérioles et des coronaires, tout en calmant la fréquence cardiaque, et entraîne donc une diminution de la tension artérielle. (www.mdidea.com)

Les études cliniques récentes de **Ghedira et al., (2008)** ont montrées qu'une dose de 500mg de l'extraits des feuilles d'olivier, deux fois par jours, peut remplacer une dose de 12.5-25mg en CAPTOPRIL, dans l'abaissement des tensions artérielles systoliques et diastoliques chez les patients hypertendus.

II.3.2. Activité hypoglycémiant :

Une étude de **Al-Azzawie et al.,(2006)** sur les extraits aqueux des feuilles a montré que ceux-ci permettait de diminuer la glycémie selon deux mécanismes :

- Amélioration de la libération de l'insuline déclenchée par le pic de glucose sanguin lors des repas ainsi permettre une meilleure absorption cellulaire du glucose.
- Provocation de l'augmentation de l'utilisation périphérique du glucose, ce qui va entraîner une seconde diminution de la glycémie.

Ces deux mécanismes rappellent ceux provoqués par le traitement DNID. (**Avenard., 2008**)

L'administration à un diabétique d'un extrait des feuilles d'olivier riche en oleuropeine (8mg/kg) pendant 4 semaines, montre une diminution significative du glucose.

II.3.3. Action contre l'athérosclérose :

L'athérosclérose se traduit par la perte de l'élasticité des artères, provoquée par l'accumulation de corps gras essentiellement le mauvais cholestérol LDL au niveau de la tunique interne (intima) des artères.

Ce dépôt (Athérome) peut aller de la simple plaque rétrécissant la lumière artérielle (sténose) jusqu'à l'oblitération du vaisseau (Thrombose).(**www.vasculaire.com**)

Un des facteurs déclencheurs de cette pathologie est l'excès des LDL et de leur oxydation au niveau de l'intima des artères.

Les extraits des feuilles exercent leur effet antioxydant vis-à-vis de l'oxydation des LDL qui sont à l'origine de l'altération des tissus vasculaire au niveau des artères. (**Benavente-Garcia et al., 2000**)

Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL). En inhibant leur oxydation, ils limitent leur incrustation dans les parois artérielles ainsi prévenir le processus physiopathologique de l'athérosclérose.

D'après **Scalbert et al.,(2005)**, ils agissent aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères.

II.3.4. Action antiallergique :

Ces effets sont attribués à l'influence des polyphénols sur la production de l'histamine.

En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et l'ATP ase, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. **(Di Carlo et al., 1999)**

II.3.5. Effet anti ulcéreux

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré certains composés phénoliques jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. **(Di Carlo et al., 1999)**

II.3.6. Activité anticancéreuse

L'activité anticancéreuse est attribuée à :

- la capacité d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. **(Piantelliet al., 1996)**
- L'inhibition de la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones. Également par d'autres mécanismes, à savoir :
 - ✓ la stabilisation du collagène. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène et inhibe l'activité de la collagénase, mais aussi, la réduction des radicaux libres. **(Harvey et al., 1987)**

II.3.8. Effet antimicrobien :

Les effets antimicrobiens des phénols issus de l'olive, l'huile d'olive et les feuilles de l'olivier ont été le sujet de différentes recherches qui confirment leur effet antimicrobien.

Il a été établi que l'oleuropeine, une des classes principales de polyphénols contenues dans les feuilles, empêche ou retarde le taux de croissance d'une gamme de bactéries et de microchampignons.

L'oleuropeine et les produits de son hydrolyse sont capables d'inhiber le développement et production de l'enterotoxine B par *Staphylococcus aureus*, le développement de *Salmonella enteritidis*, des spores de *Bacillus cereus* (Bisignano et al., 1999), de *Klebsiella pneumoniae*, et *Escherichia coli* (Aziz et al., 1998).

Également actif dans la régulation de la flore gastrique par la réduction sélective de *Helicobacter pylori* et *Campylobacter jejuni*. (Sujna et al., 2009)

II.3.9. Effet antioxydant :

Les antioxydants présents dans les feuilles d'olivier sont habiles à piéger les radicaux libres ainsi, d'inhiber le processus d'oxydation

Les plus actives flavonoïdes (rutine, catéchine et lutéoline) exercent, d'après les tests in vitro, des effets antioxydants jusqu'à 2,5 fois plus que la vitamine C et E et sont comparable au lycopène. (Garcia et al., 2000)

Mais le plus important c'est que l'effet antioxydant produit par les extraits de feuilles d'olivier est plus important grâce à la synergie des flavonoïdes, des phénols et de la richesse en oleuropeine. (Rauwald et al., 1994)

Nombreux sont les auteurs qui ont travaillé sur les composés phénoliques des feuilles d'*Olea europaea*, nous pouvons citer Bruneton.1999 ; Balasundram et al., 2006 ; Hennebelle, 2007 ; Lee et al., 2007 ; Habauzit et Horcajada, 2008 ; Bondia-Pons et al., 2009 ; Gresele et al., 2011.

Le tableau III ci-dessous résume l'activité biologique de quelques composés phénoliques rencontrés dans les feuilles

Tableau III : Les propriétés thérapeutiques des composés bioactifs présent dans les feuilles de l'oléastre.

Composés bioactifs	Activité biologique
Acides phénolique	• Antifongique • Antibactérien • Antioxydant
Tanins	• Effet stabilisant sur le collagène. • Antioxydant. • Anti diarrhéique. • Effet antiseptique. • Effet vasoconstricteur.
Anthocyanes	• Protecteur capillaro veineux. • Antioxydant.
Coumarines	• Anticoagulant. • Antioxydant. • Protecteur vasculaire • Anti œdémateux.
Flavonoïdes	• Anti tumoral. • Anti carcinogène. • Anti inflammatoire. • Antioxydant. • Anti allergique. • Anti ulcéreux • Anti viral. • Antimicrobien. • Hypotenseur. • Diurétique
Oleuropeine	• Anti viral. • Antimicrobien.

La partie expérimentale a été menée au niveau du laboratoire commun de physico-chimie et de microbiologie du département de Biologie de la faculté des sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

I. Matériel :

I.1. Equipement et réactif chimique :

L'équipement (verrerie, appareillage, matériel en plastique et autres) ainsi que les réactifs chimiques sont donnés dans l'**Annexe 01**.

I.2. Milieux de culture :

1. Bouillon BHIB :

BrainHeart Infusion Broth, le bouillon a été utilisé tant que milieu de revivification pour toutes les souches bactériennes testées. C'est un milieu polyvalent adapté à la culture d'une grande variété de microorganismes. La croissance et mise en évidence par l'apparition d'une turbidité dans le milieu.

La composition du bouillon BHIB est donnée dans l'**Annexe 02**.

2. Milieu Mueller Hinton :

Le milieu Mueller a été utilisé vu sa particularité d'être un milieu de base non sélectif pour la culture des bactéries, il est principalement utilisé pour la réalisation d'antibiogramme standard.

La composition du milieu Mueller Hinton est donnée dans l'**Annexe 02**.

I.3. Matériel Biologique :

Le matériel biologique est constitué de matière végétale et de souches bactériennes.

I.3.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé se constitue d'une poudre obtenue à partir des feuilles de l'oléastre après broyage.

I.3.2. Souches bactériennes testées :

Les souches bactériennes testées sont des souches référencées du laboratoire de recherche du département Biologie de l'Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

Les souches testées sont :

- Gram négatives :

Escherichia coli ATCC25922.

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853.

- Gram positives :

Bacillus cereus ATCC10876.

Staphylococcus aureus ATCC43300.

Les caractéristiques des souches sont données dans **l'annexe 05**.

Un test MEVAG, un ensemencement sur milieu King A et un test oxydase ont été effectués pour *Pseudomonas aeruginosa*.

La composition des milieux utilisés est donnée dans **l'annexe 02**.

II. Méthodes :

II.1. Echantillonnage

Les feuilles d'*Olea europaea subsp. sylvestris* ont été récoltées durant le mois de Mars sur des individus localisés dans la région d'Ouled Ali, Boumerdes. **(Figure 11)**

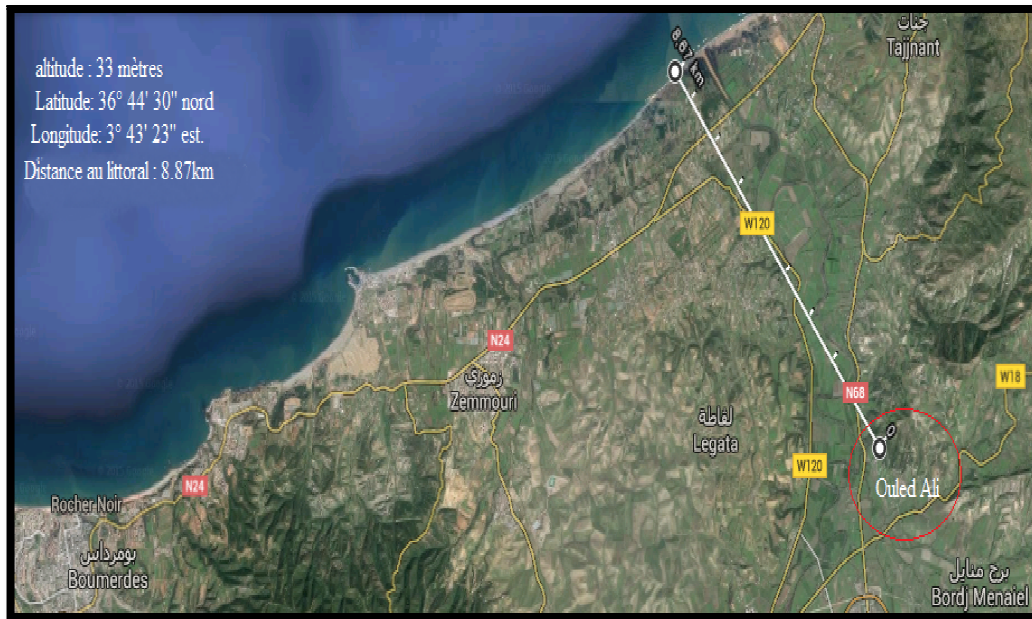


Figure 11 : Localisation géographique du site d'échantillonnage

II.1.1.processus d'obtention de la poudre :

Récolte et triage , puis nettoyage des feuilles à l'eau distillé



Séchage, jusqu'à stabilité du poids dans un endroit aéré et sec à l'abri du soleil.



Broyage dans un robot (broyeur électrique)



Récupération de la poudre par tamisage, avec un tamis de 1mm de diamètre.

La poudre obtenue est stockée dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière et de l'humidité à température ambiante.

II.2. Préparation des extraits bruts :

La préparation des extraits végétaux bruts a été faite selon trois types d'extractions différentes.

II.2.1.Extraction assistée par ultrasons (EAU):

- **Principe:**

En milieu liquide, les ondes émises par l'appareil conduisent au phénomène de cavitation (Bulles). Ces bulles microscopiques vont croître jusqu'à devenir instable et imploser, entraînant des températures et des pressions élevées. Au cours de l'implosion, un micro jet dirigé vers le matériel végétal est créé, causant la destruction des parois cellulaires de la matrice végétale et leur contenu peuvent être libérés dans le milieu environnant. **(Pétrier., 2008)**

L'extraction a été réalisée en utilisant un Sonicateur type BANDELIN *electronic* Type RK514.

II.2.2. Extraction assistée par microonde (EAM) :

- **Principe**

Le procédé consiste à appliquer des ondes durant le contact entre la poudre et le solvant. Les ondes émises par l'appareil sont absorbées par l'eau présente dans la poudre puis converti en chaleur.

L'augmentation de la chaleur conduit à la formation de vapeur qui fractionne le reste des structures végétales présentes dans la poudre et libère les substances présentes à l'intérieur ; elles seront récupérées dans le solvant.

L'extraction a été réalisée en utilisant un microonde de cuisine type Maxi power MAXMO20C, dimension 262mm(H) x 452mm(W) x 365mm (D).

II.2.3. Extraction Ethanologique (EE) :

- **Principe :**

L'extraction consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée.

Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction etc.

- **Mode opératoire :**

20gr de poudre dans 200ml solvant sont soumis à une macération à température ambiante pendant 30 minutes :

- Pour l'extraction éthanolique, le solvant utilisé est l'éthanol 70%.
- Pour l'extraction assistée par microonde et ultrason, le solvant était de l'eau distillée.

Après macération, le macérât obtenu par extraction éthanoliques est filtré puis mis dans une étuve à 40°C.

Les macérât obtenues avec de l'eau distillée on subit des traitements différents, l'un avec microonde et l'autre avec les ultrasons, pendant 30min. ils sont filtrés par la suite et mis dans l'étuve à 40°C pour sécher jusqu'à ce que le poids se stabilise.

Les poudres obtenues après séchage des filtrats des trois extractions, constituent l'extrait brut, elles sont conservées au réfrigérateur à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

II.2.4.Calcul du rendement pour chaque extraction :

Le rendement représente le rapport entre le poids des extraits secs et le poids du matériel végétal utilisé. Le résultat de chaque extraction est exprimé en % suivant la formule ci-dessous :

$$R(\%) = (P_s / P_v) \cdot 100$$

R : rendement des extractions en %.

P_s : poids sec des extraits végétaux en gr.

P_v : poids du matériel végétal en gr.

II.3. Etude de l'action antibactérienne

II.3.1. Préparation des suspensions bactériennes :

Les tests antimicrobiens doivent être réalisés à partir de souches de 24h soit à la phase exponentielle de croissance, pour cela une réactivation des souches est obligatoire sur BHIB puis laisser incuber pendant 24h à 37°C.

A partir des souches ensemencées dans du bouillon BHIB, un repiquage est effectué sur des boîtes de pétri contenant du Mueller Hinton puis incubées à 37°C pendant 24h.

Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir des pré-cultures.

A l'aide d'une anse de platine, on prélève quelques colonies bien isolées qu'on introduit dans des tubes contenant 5ml d'eau physiologique stérile. Après homogénéisation des tubes au vortex, la lecture de sa densité optique a été effectuée à une longueur d'onde de 620 nm. La DO de la suspension doit être comprise entre 0.08 et 0.1, correspondant à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml.

La suspension est ensuite diluée jusqu'à 10^6 UFC/ml soit au 1/10^e qui correspond à la concentration finale de la suspension.

II.3.2. Préparation des échantillons :

Pour l'obtention de nos échantillons, nous avons fait varier la solution de solubilisation pour chaque extrait brut, en utilisant soit de l'eau distillée soit du DMSO à 1%. (**Tableau IV**)

Tableau IV : Préparation des échantillons pour chaque extrait brut solubilisé dans de l'eau distillée et du DMSO à 1%.

	EAU			EAM			EE		
Dilution	SM	D1	D2	SM	D1	D2	SM	D1	D2
Volume échantillon (µl)	1000	 500	 500	1000	 500	 500	1000	 500	 500
Concentration de l'extrait (g/ml)	0.5	0.25	0.125	0.5	0.25	0.125	0.5	0.25	0.125

II.3.3. Détermination de l'activité antibactérienne:

Ces tests ont été réalisés par la méthode de diffusion en milieu solide en déterminant les diamètres des zones d'inhibitions. Ainsi, des disques de 6mm de diamètre découpés dans un papier Watman n°7, stérilisés et imprégnés des différentes concentrations d'extraits à raison de 20µl par disque, ont été déposés délicatement à la surface d'un milieu préalablement ensemencé. Parallèlement, dépôt d'un disque d'antibiotique, Amoxicilline/Acide clavulanique (AUG) de 30µg, et d'un disque imprégné de 20µl d'ED ou de DMSO (servant de témoin de négatif).

Supplémentairement à l'AUG, des disques de Pénicilline G de 10µg ont aussi été testés sur *P.auruginosa*.

Les diamètres d'inhibition sont mesurés autour des disques après une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24h.

II.3.4. Détermination de la CMI :

- **Méthode de diffusion :**

Il s'agit de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI). Lors de notre travail, nous avons déterminé la CMI pour les extraits qui ont présentés la meilleure activité antimicrobienne lors des tests préliminaires soit : les extraits obtenus par extraction assistée par microonde (EAM) et par l'éthanol (EE) vis-à-vis de *S.aureus* et *B.cereus*.

La gamme de concentration a été réalisée en allant de 0.5g/ml à 0.00098g/ml de progression géométrique de raison de 2. Les dilutions ont été réalisées dans de l'eau distillée stérile, et sont illustrées dans le tableau V comme suit

Tableau V: Tableau illustrant les différentes gammes de concentration des extraits bruts.

N° Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume de l'échantillon (µl)	1000	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Concentration de l'extrait (g/ml)	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.01563	0.00782	0.00391	0.00196	0.00098

Il a été impossible de déterminer les CMI suivant la méthode décrite dans le recueil de standardisation de l'antibiogramme. C'est pour cela qu'on a choisi de tester nos différentes dilutions par la méthode de diffusion sur boîtes ensemencées de la souche testée, tirée de la méthode de l'antibioaromatogramme (**V-G de Billerbeck, 2007**).

La méthode est la même que celle décrite avant dans les tests de l'activité antibactérienne. Les disques sont déposés à la surface du milieu gélosé (Mueller Hinton), préalablement ensemencé avec une suspension bactérienne (10^6 UFC / ml) en phase exponentielle de croissance.

A partir des disques, les extraits diffusent dans la gélose, leurs concentrations étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne du disque 01 (gradient de concentration). Les boîtes de Pétri sont incubation pendant 24h à 37 °C.

La zone d'inhibition correspondant à la dernière dilution à laquelle une croissance bactérienne a été constatée représente la dilution de l'extrait dont la concentration correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

II.4. Dosage des polyphénols :

En se basant sur les résultats des diamètres générés lors des tests de l'activité antibactérienne, nous nous sommes intéressés à quantifier les polyphénols totaux contenus dans les deux extraits à savoir l'extrait obtenu par EE et par EAM.

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué sur les deux extraits bruts obtenus par extraction assistée par microonde et par solvant (éthanol) suivant la méthode de Folin-Ciocalteu.

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit en 1965 par **Singleton et Rossi**.

- **Principe :**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribereau, 1968**).

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux **(Ghazi et Sahraoui, 2005)**.

- **Mode opératoire :**

Une quantité de 200µl des deux extraits est mélangée avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (dilué au dixième) et 800µl de carbonate de sodium à 7.5% (Na_2CO_3). L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 2h. **(Belekki et Bendimerad., 2001)**.

La lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche

II.5. Analyse statistique :

Les courbes et les histogrammes sont tracés par Microsoft Excel 2007, les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne $\pm$ l'écart type. Chaque expérience a été faite avec des répétitions, 3 répétitions pour chaque essai.

Les significations statistiques entre les solvants utilisées, les souches testées et les types d'extraction, ont été évaluées avec une ANOVA en utilisant le logiciel STATBOX afin de déterminer d'éventuelles différences significatives à $P < 0,05$.

L'analyse de la variance ANOVA a pour objectif d'étudier l'influence d'un ou de plusieurs facteurs sur une variable. Le facteur de variable est exprimé par la p value et comparé à une valeur seuil de 0.05.

- Si $0.01 < p \leq 0.05$ il y a une différence significative au seuil de 5%
- Si $0.001 < p \leq 0.01$ il y a une différence hautement significative au seuil de 1%
- Si $p \leq 0.001$ il y a une différence très hautement significative au seuil de 1%

I. Analyse quantitative des extraits :

I.1. Calcul du taux d'extraction :

Le taux d'extraction ou le rendement des différents extraits obtenus est défini comme étant le rapport entre la masse des extraits bruts à l'état sec et celle de la matière végétale utilisée, il est calculé comme suit d'après **Ouahas *et al*, (1988)**

$$R(\%) = (P_s / P_v) \cdot 100$$

R : rendement des extractions en %.

P_s : poids sec des extraits végétaux en gr.

P_v : poids du matériel végétal en gr.

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le poids final des extraits récupérés après évaporation, les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau VI et la Figure 12.

Tableau VI : Tableau récapitulatif regroupant le rendement et l'aspect organoleptiques des différents extraits.

Matériel végétal	Extraction	Aspect	Couleur	Rendement
Feuilles d'<i>Olea europaea subsp sylvestris</i>	Solvant (Ethanol)	Poudreux	Verte	11.30%
	Microonde	Pâteux/visqueux	Miel /Marron	16.70%
	Ultrasons	Pâteux/visqueux	Marron/Acajou	9.83%

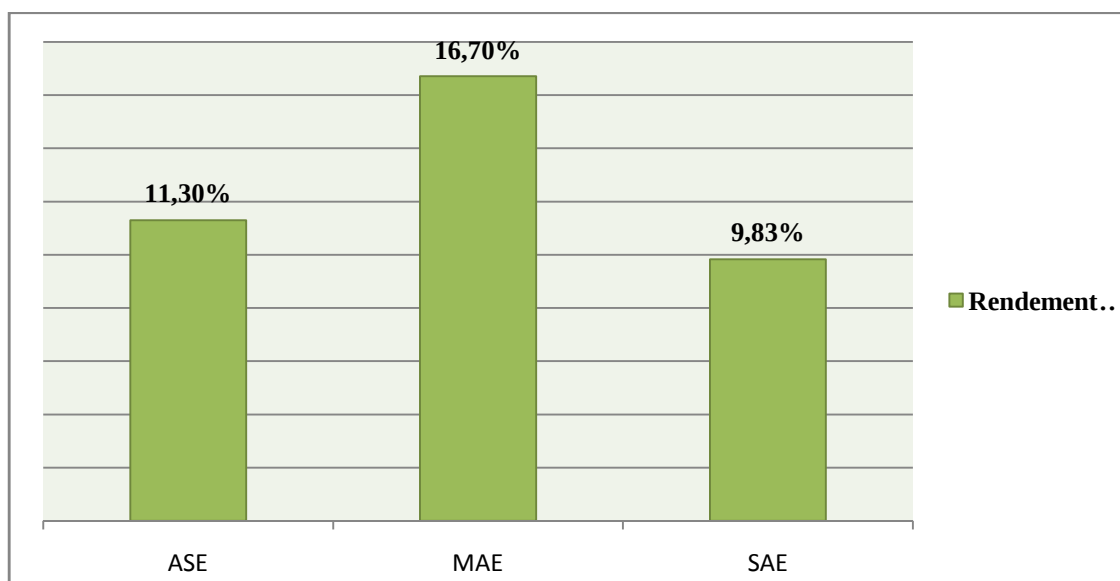


Figure 12 : Histogramme rendement des différentes extractions.

Les résultats obtenus montrent que parmi les trois méthodes d'extractions, l'extraction au microonde représente le rendement le plus élevé avec un taux de rendement de 16.70%, suivi par l'extraction éthanolique avec 11.30%, puis par l'extraction aux ultrasons avec 9.8% de taux de rendement.

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

La méthode d'extraction la plus utilisée pour les composés phénoliques est celle de l'extraction solide-liquide basée sur la séparation des substances phénoliques du reste des composants. La solubilité des composés phénoliques est liée au volume et au type de solvant (Naczk et Shahidi., 2006)

Cette méthode d'extraction menée à température ambiante et sous agitation contenue, permet d'extraire le maximum des composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable, dont la température élevée provoque l'inactivation des composés phénoliques, la diminution de leur rétractibilité dans le solvant, aussi affecte leur quantification (Hagermann et al., 2000).

Par ailleurs, on constate que la couleur est affectée par le procédé d'extraction. Les extraits bruts obtenus sont de différentes couleurs, en fonction des méthodes d'extraction appliquées. (Figure 13)

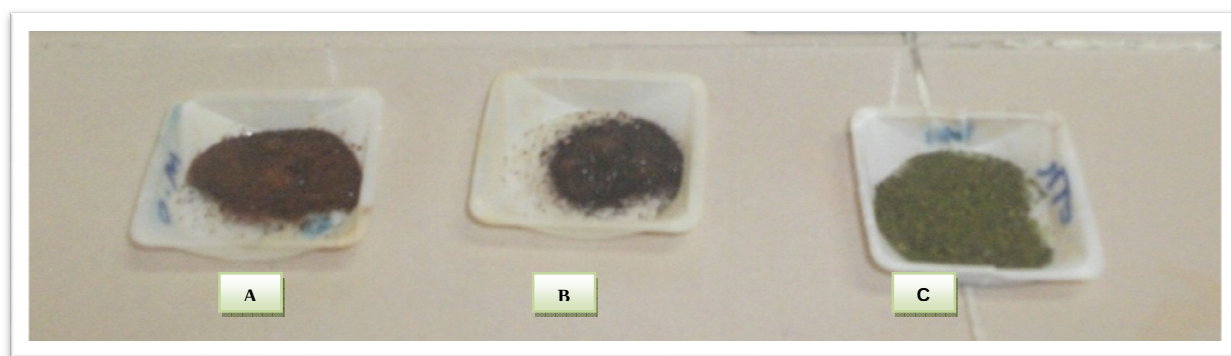


Figure 13 : Extraits bruts obtenus après extraction, **A** : extrait obtenu par extraction assistée par microonde ; **B** : extrait obtenu par extraction assistée par ultrasons ; **C** : extrait obtenu après extraction par éthanol.

En effet, la poudre verte foncée obtenue après évaporation de l'éthanol contient différents composants chimiques, notamment la chlorophylle qui est une molécule soluble dans les solvants organique d'où la couleur verte de la poudre.

La couleur des extraits obtenus par l'extraction assistée par microonde et par les ultrasons vire vers le marron.

Cette couleur est similaire à celle obtenue par **Dahmoun et al., (2014)**, lors d'une étude portant sur la comparaison entre l'extraction assistée par microonde, ultrasons et solvant accéléré pour la récupération des polyphénols des pelures de *Citrus sinensis*. Selon cet auteur, la couleur marron est due à la dégradation des composés chromogènes provoquée par les traitements à haute température.

Il a été démontré que pour l'extraction par les solvants à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenu à température ambiante. (**Majhenic et al., 2007**).

Dans une autre étude réalisée par **Athamena et al., (2010)**, les résultats ont prouvé que l'éthanol était le meilleur solvant pour extraire les composés phénoliques, suivi du méthanol et finalement par de l'eau, en raison de leur polarité et de leur bonne solubilité pour ces composés (**Mohsen et Ammar, 2009**).

I.2. Détermination de la teneur en polyphénols totaux :

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g de MS). La courbe étalon de l'acide gallique est donnée dans l'annexe 06.

Les teneurs en polyphénols totaux obtenus par les deux méthodes d'extraction est de 20.1 ± 0.9 mg EAG/g pour l'extraction assistée par micro-onde et 20.7 ± 0.5 mg EAG/g pour l'extraction à l'éthanol.

Nos résultats sont en dessus de ceux trouver par **Salah et al., (2012)** , qui a travailler sur l'extraction des feuilles de l'olivier cultivé variété *chamlal* , le taux de polyphénols était de 99 ± 11.45 mg EAG/g.

Selon une étude faite par **Rafiee et al., (2012)** sur les extraits de *Olea europaea* assisté au micro onde le taux de polyphénols trouvé est de 42.447 ± 0.17 mg EAT/g cette valeur avoisine celle de l'éthanol qui est de $48,08 \pm 0.7$ mg EAT/g.

Une légère différence dans le dosage des polyphénols totaux a été trouvée dans les échantillons des deux extractions.

D'après les travaux de **Ezgi, (2012)** sur la différence du taux de polyphénols dans les types d'extraction il en a déduit qu'il n'y a pas une grande différence entre l'extraction à l'éthanol et au microonde en terme de contenu phénolique, le microonde a diminué de manière significative le temps d'extraction qui a un rôle important dans le maintien des composés phénolique.

Cette légère différence du taux de polyphénols obtenue par EAM, et EE pourraient s'expliquer par une différence interspécifique ou alors par la différence du procédé d'extraction et des conditions d'extraction (nature du solvant, T°..).

Teasiola-Margari et Okogeri., (2001), ont démontré que la concentration des polyphénols dépend du solvant d'extraction et de la classe des polyphénols présents dans le matériel végétal

En effet l'éthanol aqueux a prouvé son efficacité pour extraire les polyphénols simples (**Rayan et al., 2001**) grâce à sa polarité.

II. Analyse qualitative des extraits :

II.1. Détermination de l'activité antibactérienne :

L'évaluation et l'activité antibactérienne des composés phénoliques des feuilles d'*Olea europaea subsp sylvestris* est déterminée par la méthode de diffusion sur gélose.

Cette activité se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné des extraits de feuilles. La lecture des résultats est faite par une mesure des diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle.

Selon **Ponse (2003)**, la sensibilité des bactéries aux extraits végétaux est définie comme suit :

Ø inférieur à 8 mm : bactéries non sensible (-)

Ø compris entre 8 et 14 mm : bactérie sensible (+)

Ø compris entre 15 et 19 mm : bactérie très sensible (++)

Ø supérieur à 20 mm : bactérie extrêmement sensible (+++)

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition ont été mesurées.

Les tableaux (VII ; VIII; IX) indiquent les résultats des tests de l'activité antibactérienne des extraits bruts des feuilles de l'olivier dilués successivement dans du DMSO 1% et dans de l'eau distillé sur les quatre souches testées.

Tableau VII : Diamètres d'inhibition de l'extrait éthanolique sur les quatre souches testées.

Souches testées	<i>E.coli</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>B.cereus</i>			<i>S.aureus</i>		
Dilutions	SM	D 1	D 2	S M	D 1	D 2	SM	D1	D2	SM	D1	D2
DMSO	0	0	0	0	0	0	8±1,7 3	6±0,57	5±0,5 7	21,3±0,5 7	19±2,6 4	18±0,5 7
Sensibilité	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+++	++	++
ED	0	0	0	0	0	0	8±1,1 5	7,6±0,5 7	7±2,3 0	21±0,57	21±0,5 7	20± 0,57
Sensibilité	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++	+++

les diamètres illustrés dans les tableaux représentent les moyennes de trois répétitions pour chaque dilution.

Tableau VIII : Diamètres d'inhibition de l'extrait obtenu par extraction assistée par microonde sur les quatre souches testées.

Souches testées	<i>E.coli</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>B.cereus</i>			<i>S.aureus</i>		
Dilutions	SM	D1	D2	SM	D1	D2	SM	D1	D2	SM	D1	D2
DMSO	0	0	0	0	0	0	11±1,0	7±2,3	7±1,15	15,6±1,52	12±1,15	9±0,57
Sensibilité	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	+	+
ED	0	0	0	0	0	0	11±1,52	8±1,15	7±1,73	19±1,15	18±1,52	17± 1,5
Sensibilité	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	++	++

Tableau IX : Diamètres d'inhibition de l'extrait obtenu par extraction assistée pas ultrasons sur les quatre souches testées.

Souches testées	<i>E.coli</i>			<i>P.aeruginosa</i>			<i>B.cereus</i>			<i>S.aureus</i>		
Dilutions	SM	D1	D2	SM	D1	D2	SM	D1	D2	SM	D1	D2
DMSO	0	0	0	0	0	0	8,6±0,57	8±1,52	0	0	0	0
Sensibilité	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
ED	0	0	0	0	0	0	7,6±1,54	0	0	0	0	0
Sensibilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Les zones d'inhibition les plus importantes ont été obtenues par l'extraction assistée par microonde et par l'éthanol en utilisant L'ED comme solubilisant.

D'après les résultats illustrés sur les tableaux précédents, on remarque que *P.aeruginosa* (Gram-) et *E.coli* (Gram-) sont non sensibles aux extraits comparés à *S.aureus* (Gram+) et *B.cereus* (Gram+). D'après ces observations, il semble que nos extraits sont plus efficaces sur les Gram+ que sur les Gram-.

L'application de l'ANOVA à ces données à révéler des résultats qui vont dans le même sens de notre interprétation.

Sur la figure (14), représentant l'histogramme des distributions des diamètres moyens des zones d'inhibition des quatre souches en fonction des solvants et des types d'extraction nous pouvons voir que comparé au DMSO 1%, l'ED est le meilleur solvant solubilisant, et que l'extraction éthanolique s'est avérée la plus efficace.

Ceci est confirmé par la différence très hautement significative de l'interaction entre trois facteurs (souches / extractions / solvants), (Tableau X) donnée par la valeur de la p-value qui est égale à 0 au risque de 5%.

Tableau X : Analyse de la variance

	SCE	DDL	CM	Test F	PROBA	CV
Var Inter F1*F2*F3	160.665	24	6.694	12.359	0	15.49%
Var. Residuelles	78	144	0.542			

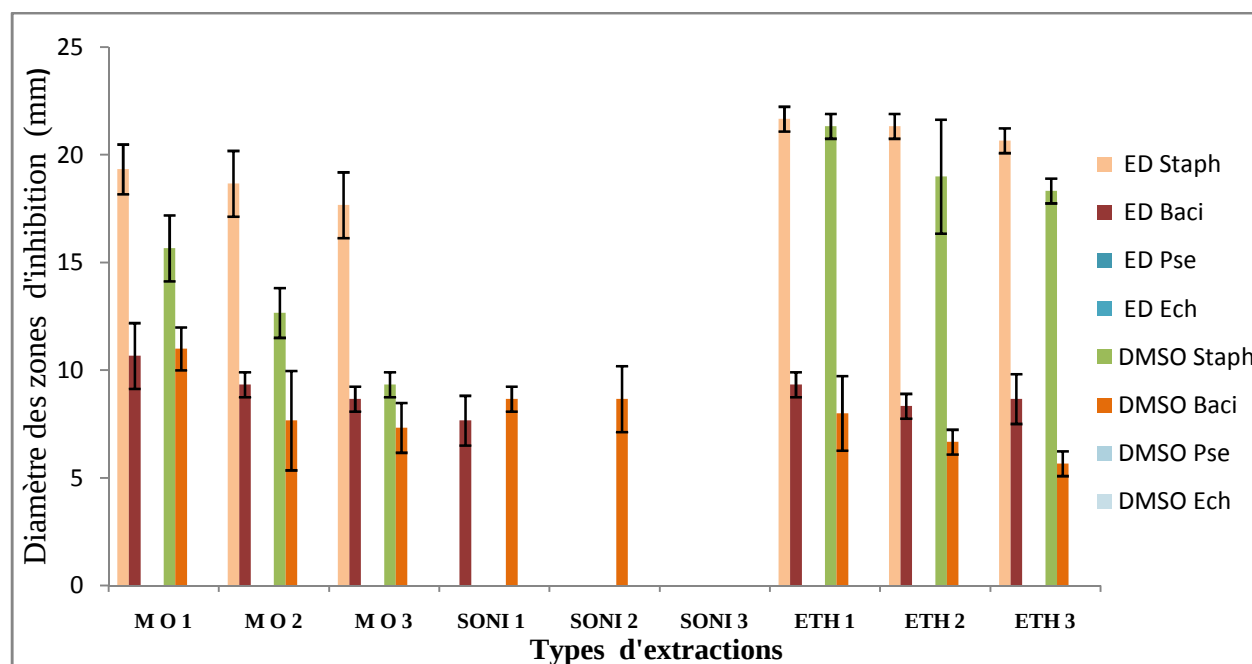


Figure 14 : Histogramme des distributions des diamètres moyens des zones d'inhibition des quatre souches en fonction des solvants et des types d'extraction

Effet antibactérien sur les souches :

- Pouvoir antibactérien des antibiotiques utilisés sur les souches testés :

Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus par l'extraction assistée par microonde, ultrasons et par éthanol sont comparé à ceux obtenus par AUG (Amoxiciline/ Acide clavulanique) et la Pénicilline G, antibiotiques utilisés comme témoin positif.

Les diamètres d'inhibition générés par l'antibiotique AUG (Amoxiciline/ Acide clavulanique) étaient de 22 mm de diamètre pour *S.aureus*, 10 mm *B.cereus* et de 23 mm pour *E.coli*.

Aucune zone d'inhibition n'a été obtenue avec AUG (Amoxiciline/ Acide clavulanique), vis-à-vis de *P.aeruginosa*, de même que pour la Pénicilline G.

- Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis de *P.aeruginosa* et *E.coli* :

Les différents extraits à différentes concentrations n'ont montrés aucune activité antimicrobienne vis-à-vis de ces deux souches. (**Tableau 07 ; 08 ; 09**)

L'interprétation des résultats négatifs obtenus par *P.aeruginosa* et *E.coli* peuvent être interprétés suivant ce qui a été rapporté dans la littérature.

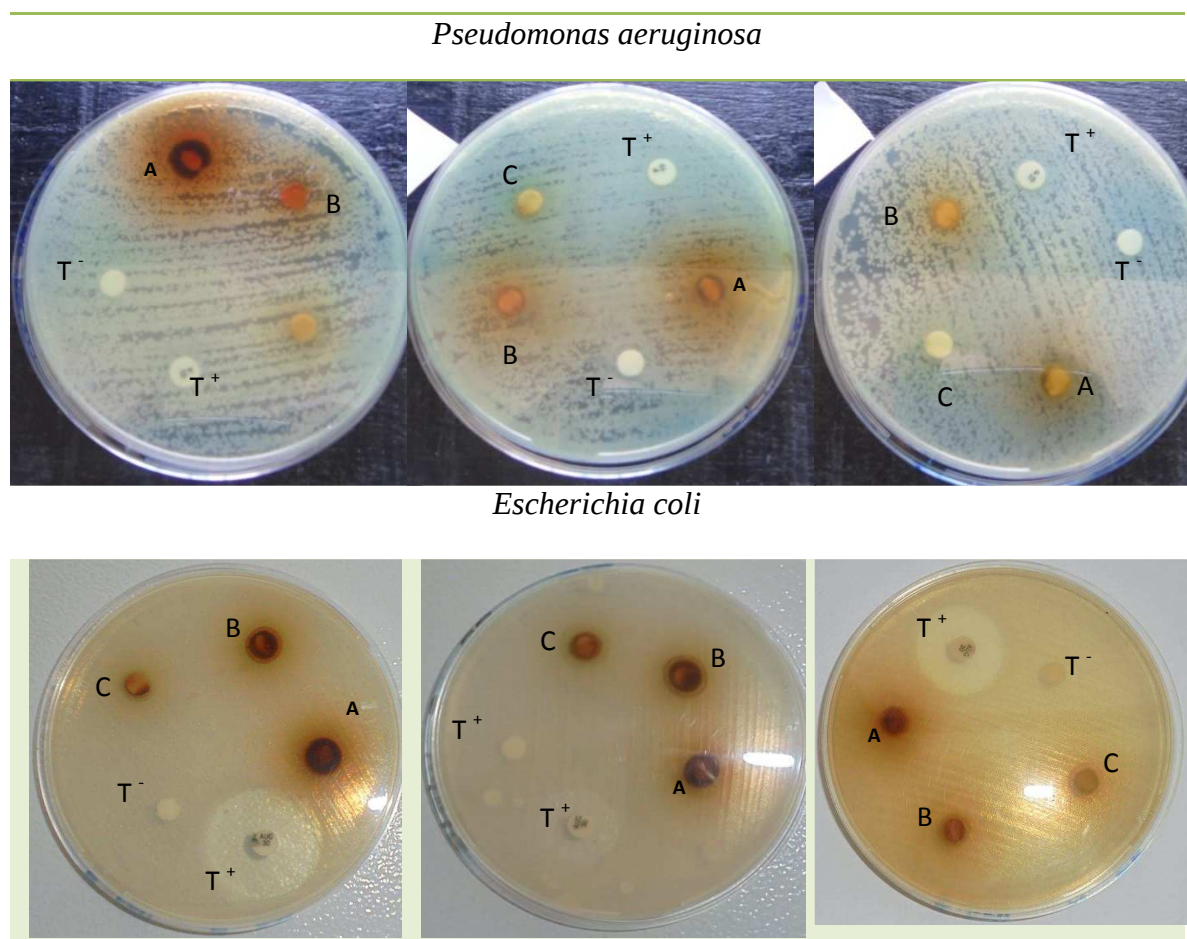
La tolérance des bactéries aux polyphénols dépend essentiellement de l'espèce bactérienne et de la structure des polyphénols (**Almajano et al., 2008**).

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

Pour **Tepe et al., (2004)**, les bactéries à Gram négatif, sont généralement résistantes aux agents antimicrobiens. La réduction de la perméabilité de la membrane externe, entourant la paroi cellulaire, aux agents antibactériens hydrophobes par la structure lipopolysaccharidique peut favoriser la résistance à ces agents. Cet effet dépend de la composition en lipide et de la charge extérieure nette des membranes microbiennes.

Les résultats obtenus lors des tests de l'activité antibactérienne sont illustrés ci dessous. (Tableau XI)

Tableau XI : Représentation des résultats des tests de l'activité antibactérienne sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.



■ A : extraits obtenus par ultrasons ; B : extraits obtenus par microonde ; C : extraction éthanolique ; T⁺ : AUG/ P ; T⁻ : ED.

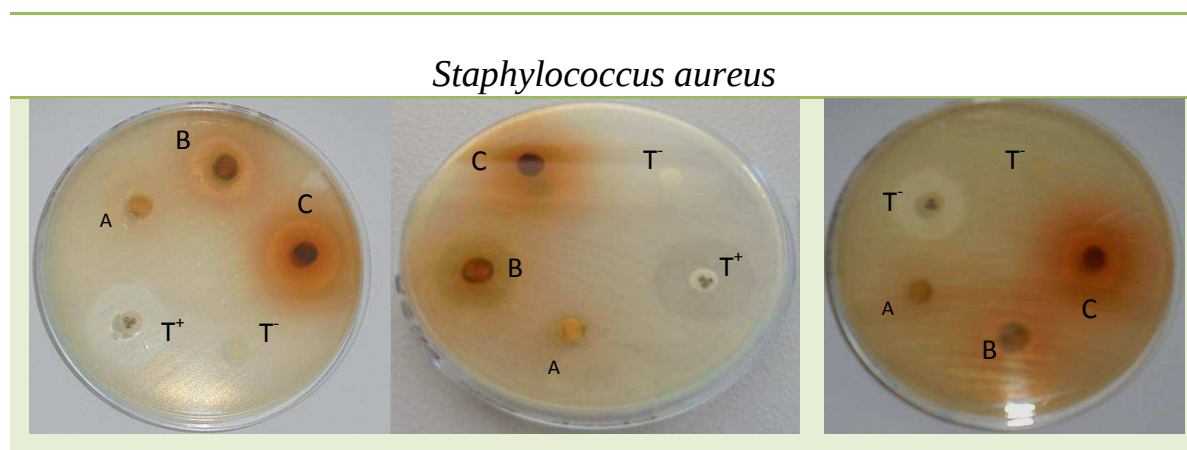
■ Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis de *S.aureus* :

S.aureus s'est montré particulièrement sensible à la présence des extraits obtenus par extraction assistée par microonde et par l'éthanol avec des diamètres respectifs de :

15,6 ±1,52 mm et de 21,3±0,57 mm pour une concentration de 0.5g/l. 12±1.15mm et 19±2.64mm pour une concentration de 0.25g/l. 9±0.57 mm et 18±0.57mm pour une concentration de 0.125g/l pour les extraits dilués dans du DMSO.

Parallèlement, des diamètres de 19±1,15mm et de 21±0,57mm pour la concentration 0.5g/l. 18±1.02mm et 21±0.57mm pour la concentration 0.25g/l. 17±1.5 mm et 20±0.57mm pour la concentration 0.125g/l pour les extraits dilués dans de l'eau distillé. **(Figure 14)**

Tableau XII: Représentation des résultats des tests de l'activité antibactérienne effectués sur *Staphylococcus aureus*.



▪ Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis de *B.cereus* :

Tous les extraits se sont révélés actifs vis-à-vis de cette souche avec des degrés différents.

Les diamètres d'inhibitions induits par *B.cereus* par extraction assistée par microonde et par l'éthanol sont de $11 \pm 1,0$ mm et de $8 \pm 1,73$ mm pour une concentration de 0.5g/l et de $7 \pm 2,3$ mm et $6 \pm 0,57$ mm pour une concentration de 0.25g/l et de $7 \pm 1,15$ mm et $5 \pm 0,57$ mm pour une concentration de 0.125g/l pour les extraits dilués dans du DMSO.

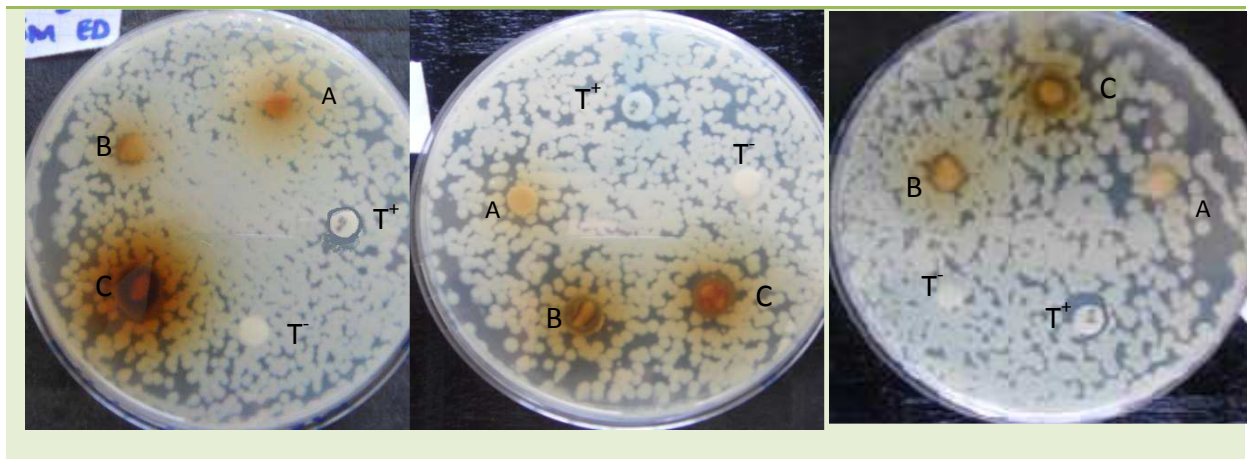
Parallèlement, des diamètres de $11 \pm 1,52$ mm et de $8 \pm 1,15$ mm pour une concentration de 0.5g/l et de $8 \pm 1,15$ mm et $7,6 \pm 0,57$ mm pour une concentration de 0.25g/l et de $7 \pm 1,73$ mm et $7 \pm 2,30$ mm pour une concentration de 0.125g/l pour les extraits dilués dans de l'eau distillé.

Quant à l'extrait obtenu par extraction assistée par ultrasons, il s'est révélé le moins actif, en effet, seul *B.cereus* s'est montré sensible vis-à-vis de l'extrait avec des zones de $8,6 \pm 0,57$ mm en utilisant le DMSO comme diluant et des zones de $7,6 \pm 1,54$ mm en utilisant l'ED comme solvant. **(Figure 14).**

Le tableau 12 illustre les résultats de l'activité antibactérienne effectués sur *Bacillus cereus*.

Tableau XIII: Représentation des résultats des tests préliminaires effectués sur *Bacillus cereus*.

Bacillus cereus



Les diamètres obtenus par *S.aureus* se rapprochent de ceux trouvés par **Djenane et al. (2012)**, dans une étude de sur l'activité antibactérienne de l'extrait brut aqueux des feuilles de l'olivier sur *S.aureus*, ont obtenu une zone d'inhibition d'un diamètre de 16.33 ± 1.8 mm.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux de **Hussein et al., (2014)** qui a travaillé sur l'oléastre. Son travail a fait ressortir une absence de zones d'inhibitions avec *B.cereus* en utilisant l'extrait éthanolique dilué dans du DMSO. Ils se rapprochent par contre des résultats retrouvés par **Malik (2015)**.

Les extraits aqueux utilisés par cet auteur ont générés des zones d'inhibitions de 9.86 ± 0.24 mm similaires à celles obtenues avec l'extraction assisté par microonde et par l'éthanol.

Les différentes concentrations préparées avec du DMSO 1%, ont permis d'obtenir des zones de 9.5mm de diamètre pour *B.cerue.s* dans l'étude faite par **Reza K D arsanaki et al., (2012)** sur l'activité antimicrobienne des extraits aqueux des feuilles d'*Olea europaea* originaire du nord de l'Iran. Ces résultats rejoignent ceux qu'on a obtenus lors de nos tests.

En ce qui concerne les zones d'inhibitions obtenues par EAM, celles-ci présentent un diamètre important. En effet ce type d'extraction inhibe les polyphénols oxydase (PPO) et permet une meilleure action des polyphénols sur les souches.

Ce ci est expliqué dans les études faites sur l'extraction de la catéchine des feuilles de *Camilla sinensis* par **Seung-Cheol Lee et al. (2006)** ; **Sharma Vaishali et al (2004)** ; **Gulati Ashu et al.,(2003)** et **Mi-Ji Kim et al., (2002)**.

Ces auteur ont montré que le traitement du thé par micro-ondes permet d'obtenir une élévation rapide de la température à l'intérieure des feuilles et diminuer ou supprimer l'activité enzymatique des polyphénols oxydase (PPO) et ce ci tout en limitant les réactions de dégradation thermiques des catéchines à extraire.

Ils ont comparé par la suite ce nouveau procédé à celui par chauffage conventionnel et extraction par ultrason. Suite à cela ils ont constaté que l'extraction assistée par micro-onde est plus rapide (4 min) que le chauffage conventionnel (45 min) et l'ultrason (90 min). Ils ont conclu à la fin que l'extraction des polyphénols du thé vert assistée par micro-ondes est plus rapide et plus efficace.

Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans la variation de la zone d'inhibition telle que la quantité et le temps de diffusion de l'extrait.

Selon **Benhammou et al, (2008)**, le diamètre des zones d'inhibitions est proportionnel au volume de l'extrait.

Bourdon et Marchal (1973) ont indiqué que le diamètre d'inhibition est important si l'extrait est laissé diffuser plus longtemps avant incubation. D'après les mêmes auteurs, la composition du milieu joue un rôle important dans la diffusion, notamment en ce qui concerne la teneur en agar.

Selon **Baccouri et al., (2007)**, les facteurs environnementaux, tels que la zone géographique, la température, le profil variétal, la longueur du jour, les éléments nutritifs, etc., jouent un rôle clé dans la composition chimique des extraits obtenus à partir des feuilles d'oliviers.

Ces facteurs influent sur les voies de biosynthèse de la plante et par conséquent sur la proportion relative des principaux composés caractéristiques.

II.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice :

D'après les résultats obtenus précédemment nous nous sommes intéressés à déterminer la concentration minimale inhibitrice des extraits brut de *olea europaea* sub *sylvestris*,

obtenus par extraction assisté pas microonde et à l'éthanol, sur les deux souches bactériennes: *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* en milieu solide.

Les différents diamètres générés par les de souches vis-à-vis des variations de concentration des extraits sont illustrés dans les figure 15 et 16.

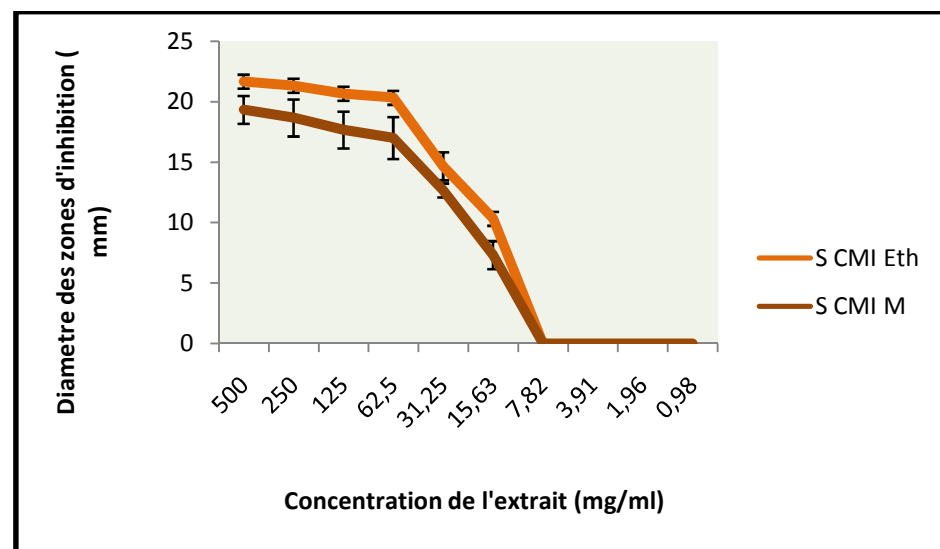


Figure 15 : Variation des diamètres d'inhibition en fonction de la concentration des extraits vis-à-vis de *S.aureus*.

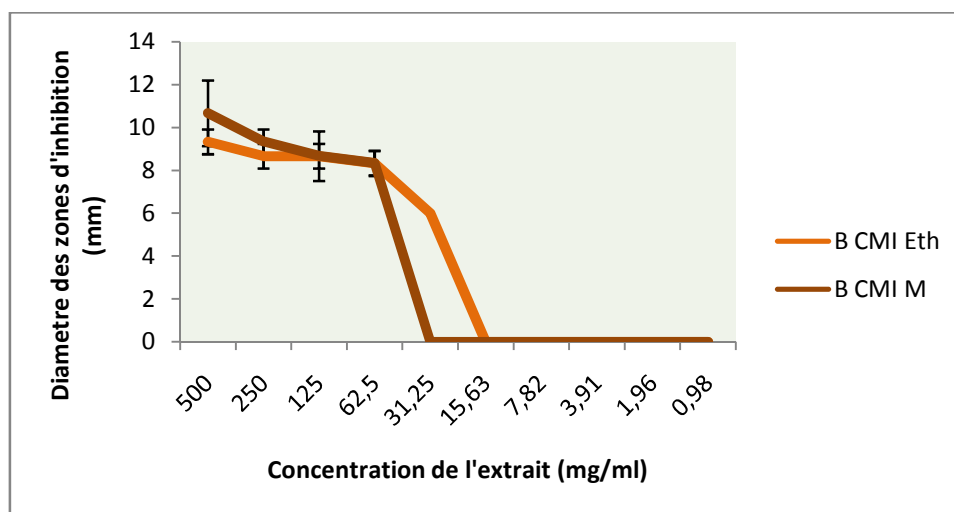


Figure 16 : Variation des diamètres d'inhibition engendrés par *B.cereus* en fonction de la concentration des extraits.

D'après les graphes illustrés dans les figures (17 ; 18) les diamètres des zones d'inhibitions générés par les deux extraits testés sur *B.cereus* et *S.aureus* diminuent jusqu'à ce qu'ils s'annulent à certaines concentrations

Les résultats des deux courbes nous ont permis d'établir les résultats de la CMI des extraits bruts indiqués dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XIV : valeur de la CMI des extraits obtenus par EE et MAE vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Cc mg/ml	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.82	3.91	1.96	0.98
ETH	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

⚡ (-) pas de développement ; (+) développement.

Tableau XV : valeur de la CMI des extraits obtenus par EE et MAE vis-à-vis *Bacillus cereus*.

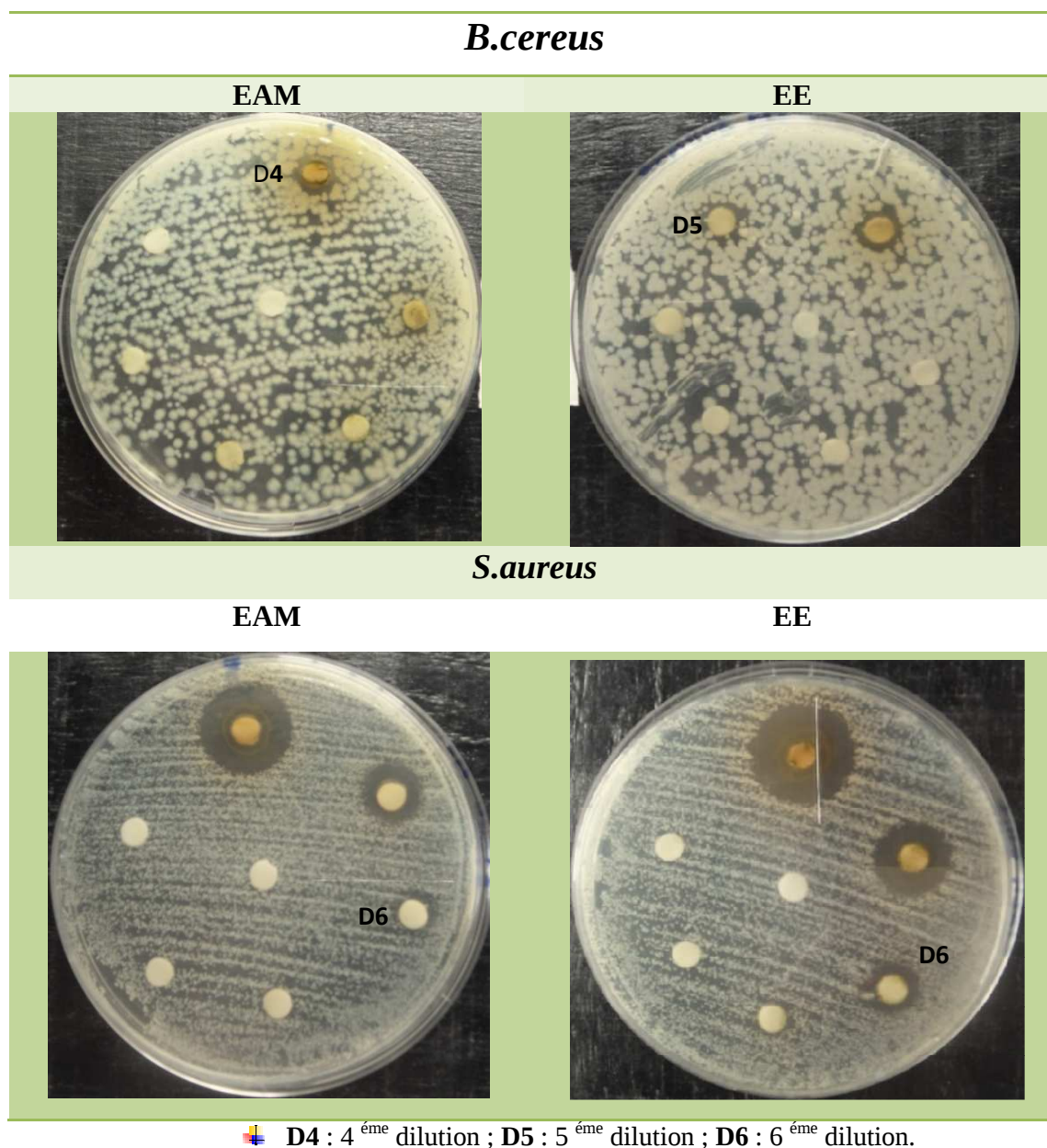
Cc mg/ml	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.82	3.91	1.96	0.98
ETH	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
M	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

D'après les résultats illustrés dans les tableaux (XIV ; XV), nous pouvons constater que les concentrations minimales inhibitrices enregistrées pour l'extrait éthanolique vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* sont respectivement de 15.63 mg/ml (6^{ème} Dilution) soit 3.12% et de 31.25 mg/ml (5^{ème} Dilution) soit 6.25%.

Alors que celles obtenues par extraction assistée par microonde vis-à-vis des mêmes souches sont respectivement de 15.63 mg/ml (6^{ème} Dilution) soit 3.12% et 62.5 mg/ml (4^{ème} Dilution) soit 12.5%.

L'absence/ présence de développement vis-à-vis de chaque concentrations est illustrée sur le tableau XVI.

Tableau XVI : Illustration des résultats de la CMI des extraits obtenus par EAM et EE vis-à-vis de *S.aureus* et *B.cereus*



En confrontant nos résultats a ceux trouvés par **Mukadderat Gökmen et al., (2015)**, lors de leur étude faite sur l'activité antimicrobiennes des extrais aqueux des feuilles d'*Olea europaea*. Nous constatons que les valeurs de nos CMI sont inferieurs à celle trouvées par ces auteurs, dont les CMI obtenues étaient de l'ordre de 64mg/ml pour *B.cereus* et de 32mg/ml pour *S.aureus*.

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

Les valeurs des CMI retrouvées étaient comprises entre 0.31-0.78% pour ces trois souches cependant pour le reste des microorganismes, entre autre *P aeruginosa*, *B.cereus*, elles étaient comprises entre 6.25 et 50%.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'effet antibactérien des différents extraits bruts d'*Olea europaea sylvestris*.

Notre étude s'est focalisée sur l'analyse qualitative et quantitative de nos extraits bruts, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux par spectrophotométrie et de l'activité antibactérienne des extraits de cette Oléacée sur *P.aeruginosa*, *B.cereus*, *S.aureus*, *E.coli*

L'extraction à partir de poudre de feuilles de l'oléastre par différentes techniques à donné différents rendement. Les résultats obtenus montre que l'extrait obtenu par extraction assistée par microonde a présenté le meilleur rendement (16.70%), tandis que l'extrait éthanolique a donné (11.30%) suivit de l'extrait obtenu par extraction assistée par ultrasons (9.83%).

L'analyse quantitative des extraits, a montré lors du dosage des polyphénols totaux que l'extrait obtenu par extraction éthanolique s'est révélé plus riche 20.7 ± 0.5 mg EAG/g que l'extrait obtenu par extraction assistée par microonde 20.1 ± 0.9 mg EAG/g.

Selon les résultats obtenus, sur les souches testées, nous avons remarqué que nos différents extrait brut des feuilles d'*O.e sylvestris* semble avoir des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis des deux Gram positifs testés : *B.cereus* et de *S.aureus*.

Les tests effectués ont donné des résultats positifs avec un diamètre d'inhibition atteignant les 22 mm pour *S.aureus*.

Une CMI de l'ordre de 15.63mg/ml et de 31.25 mg/ml a été obtenue pour l'extrait éthanolique vis-a-vis de *S.aureus* et de *B.cereus*.

Pour les extraits obtenus par EAM, elle a été de l'ordre de 15.63 mg/ml pour *S.aureus* et de 62.5mg/ml pour *B.cereus*.

Vu les résultats obtenus, il serait fort intéressant d'approfondir ces études et d'envisager :

Une Optimisation des différentes extractions ;

Une Evaluation de l'activité antioxydants et préciser les molécules responsables ;

Approfondir l'étude phytochimiques afin de déterminer qualitativement et quantitativement les molécules biactives présentes ;

Conclusion

Elargir l'étude de l'activité antimicrobienne sue d'autres souches bactériennes pathogènes et d'autre microorganismes notamment les champignons et les parasites ;

Et enfin, évaluer d'autres activités comme : antidiabétiques, anticancéreuses Et autres ;

A

Abad-García .,Garmón-Lobato L ., Berruita A . et Vicente F .(2007). New features on the fragmentation and differentiation of C-glycoside flavones isomers by positive electrospray ionisation and triple quadrupole mass spectrometry Rapid Commun. Mass Spectrom . pp. 1834–1842.

Abdel-Masih R., Abdou E., Baydoun E. et Daoud Z . (2010). Antibacterial activity of the extract obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana* and *Trigonella foenum graecum* on high drug- resistant Gram negative bacilli. Journl of Botany. Vol. 10. pp : 1155-4087.

AFSSA (Association Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), (2006). Hygiène domestique. CHU Bordeaux .France .

Al-Azzawie HF., Alhamdani MS. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. Rev Life Sci. Vol 78(12). pp : 1371-1380.

Almajano, M.P., Carbo, R., Jimenez. et Gordon.(2008).Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. Food Chemistry .108 , pp : 55–63.

Altat H., Iqbal A., Rabia L., Saeed A., Irum A., Akram A. et Zabta K.(2014). Antimicrobial potential of leaf and fruit extracts and oils of wild and cultivated edible olive . Jordan Journal of Biological Sciences. Volume7. ISSN 1995-6673 . pp : 233 - 244

Ammar A ., Mohsen S.(2009).Total phenolic contents and antioxidant activity of corntassel extracts. Food Chem . Vol. 112 , pp : 595-598.

Amouretti M.C., CometC. (2000).Le livre de l'olivier, Aix en Provence, Edisud . 97 p .

Anderson, O.M., Markham. et K.R. FLAVONOIDS. (2006). Chemistry, Biochemistry and Applications, Ed Taylor & Francis. pp : 01-32-397-425.

Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Khebri S. et Laroui S.(2010).Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* l. Lebanese Science Journal . Vol.11. 13p.

Avenard V., (2008). L'olivier et les vertus thérapeutiques de ses feuilles. Edi sci .pp :70-89 .

Avril J.L. (2000). Bactériologie clinique. 3^{ème} Edition .

Aziz N.H., Farag S.F., Mousa L.A. et Abou-Zaid. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Journal of Microbios. Vol 93. pp : 43-54.

B

Baccouri B., Ben Temime S., Campeol E., Cioni P. L., Daoud D. et Zarrouk M. (2007). Application of solid-phase micro extraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils from five new cultivars. *Food Chemistry* .102(3) . pp : 850–856 .

Belekki. N ., Bendimerad N. (2001). Antioxidant activity and phenolic content in methanol crude extracts from three Lamiaceae grown in south western Algeria. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* Vol 2 (1). pp : 175-181.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A. et Del Rio J.A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* Vol 68. pp : 457-462.

Ben Salah M., Abdelmelek H . et AbderrabaA .(2012) . Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia. *Medicinal chemistry.* Volume 2(5). Pp: 107-111.

Bisignano G., Tomaino A. et Lo Cascio R. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharmacol.* Vol 5. pp : 971-974.

Bouakaz, I. (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Université de Hadj Lakhdar .Algérie . pp 81-90.

Bouaziz M., Grayer R.J., Simmonds M.S., Damak M. et Sayadi S.(2005). Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53, pp : 236-241.

Boudhrioua, N., Bahloul, N., Kouhila, M. et Nabil, K. (2008) . Sorptions isotherms and isosteric heats of sorption of olive leaves (Chemlali variety) .Experimental and mathematical investigations. *Food and Bioproducts Processing* .86, pp : 167-175.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie. Technique et documentation-Lavoisier. France .278 p.

C

Carrion Y., Tinou M. et Badal ,E .(2010) . *Olea europaea* L . in North Mediterranean Basin during the pleniglacial and the Early-Middle Holocene .*Quaternary Science Reviews* . pp :29 :952-968.

Chavan U-D ., Shahidi F. et Nacz M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry* .75, pp : 509-512.

Crank, J. (1975). The mathematics of diffusion. Oxford Science Publication, Londre. Angleterre . pp : 68-73.

D

Delarras C. (2007). Microbiologie Pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Tec & Doc, Lavoisier .Paris . pp : 215-223.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A. et Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Rev Life Sci. Vol 65. pp : 337-553.

Djenane , D., Javier Yangüela., FarizaDerriche., Lydia Bouarab. Et Pedro Roncales.(2012). Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. Nature & Technologie.n° 07. pp : 53-61.

Doveri S., Gil F ., Diaz A., Reale S., Busconi M., Camara Machado A., Martin,A.,Fogher,C., Donini P. et Lee D., (2008). Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea L.*). Scientia Horticulturae .116, pp : 367-373.

E

Erbay Z., Icie F.(2009). Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. Journal of Food Engineering, 91. pp : 533-541.

Et Knez Z., Kerget M.S.et Majhenic L.(2007).Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seedextracts. Food Chemistry, Vol .104 , pp : 1258–1268.

Euzeby J.P. (2008). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.

EZGİ D. (2012).Microwave extraction of phenolic compounds from caper and oleaster .Thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences.ankara university .Turkey.

G

Garcia-Gomez A., Roig A., Bernal M. (2003).Composting of the solid fraction of olive millwastewaterwith olive leaves: organic matter degradation and biological activity. Bioresource Technology. 86, pp : 59-64.

Gaussorgues ,R . (2009) .L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. un risque allergique ? , Revue française d'Allergologie. 49 p.

Ghazi F., Sahraoui S. (2005). Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes *Tantboucht* et *hamraia*, Mémoire d'ingéniorat en agronomie. Université Djillali Liabes.Algérie .pp70-79.

Ghedira, K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie*, vol 6 (2). pp : 83–89.

Ghedira, K.(2010). Phytothérapie 4. Les flavonoïdes et propriétés . pp : 162

Guignard J.L., (1996). Biochimie végétale. Ed Lavoisier. Paris, pp : 175-192.

Gulati A. (2003). J. Agric Food Chem. Vol 51. pp : 4764-4768.

H

Hagerman A-E ., Muller-Harvey I .et Makkar H-P-S. (2000). Quantification of tannins in tree foliage.Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture .Vienna. pp:26.

Hannachi H ., Sommerlatte H ., Breton C ., Msallem M .et El Gazzah M. (2009) .*Oleaster (var. sylvestris)* and *subsp. cuspidata* are suitable genetic resources for improvement of the *olive (Olea europaea subsp. europaea var. europaea)*. Genet ResourCropEvol.56. pp :393–403.

Hartmann Thomas. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry Volume 68, Issues 22–24, pp :2831–2846.

Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothér, 1. pp : 3-6.

J

Joly B. et Reynaud A. (2002). Entérobactéries : Systématique et Méthode de diagnostic. Tec & Doc, Lavoisier . pp 125-147.

K

Khoumeri L .(2009) . Influence de la photopériode, des milieux de culture et des hormones de croissance sur le développement in-vitro des embryons et des micro boutures de l’olivier (*Olea europaea* L.) Var Chemlal. Thèse. Ing . pp :100.

King E.O., Ward M.k .et Raney D.E .(1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. lab clin.Med. Vol 44. pp : 301-307.

L

Larocca L.M., Giustacchini M., Maggiano N., Ranelletti F.O., Piantelli M., Alcini E. et Capelli A. (1994). Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas. *Rev J Urol*. Vol 152. pp :1029-1033.

Larpent J.P. (1997). Microbiologie Alimentaire, Techniques de laboratoire. Tec & Doc, Lavoisier. 1074 p.

Loumou A. (2003) . Olive groves : « the life and the identity of the Mediterranean », Agriculture and Human Value . 20 p .

M

Mukadderat G., Recep K., Levent A., Emrah T . et Adem Ö. (2014). Evaluation of antimicrobial activity in olive (*olea europaea*) leaf extract

Ma Y.Q., Chen J.C., Liu D.H. et Ye X.Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. Vol 16(1). pp : 57-62.

Macheix J.J., Fleuriet A. et Sarni-Manchado P. (2006). Les Polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, pp : 1-28.

Manach C., Mazur A. et Scalbert A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*. Vol 16. pp : 1-8.

Martin-Garcia, A.I., Molina-Alcaide, E. (2008).Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* .142, pp : 317-329.

Merens A. (2008). Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*. Saint-Mandé, Lyon

Morteza A A., Reza K D., Mahdihyeh L R ., Maryam N. et Golnaz R .(2012) . Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract.*Annals of Biological Research*. 3 (8) , pp : 4189-4191 .

Mukadderat G., Recep K., Levent A., Emrah T.et Adem Ö .(2014). Evaluation of antimicrobial activity in olive (*olea europaea*) leaf extract. *American Journal of Microbiology*. pp: 37-40 .

Moreaux S. (2007).L'olivier. Actes sud .A. pp : 15-19 .

N

Nassrullah M. (2015).Antibacterial Activity of Olive (*Olea europaea*) Leaves and Arugula(*Eruca sativa*)Seeds Extract. Radio therapy Department, Institute of Medical Technology. Iraq.

Nefzaoui A .(1995).Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course. Syria. pp : 12-23.

P

Palleronin.J. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula.

Paolini V., Dorchies Ph. et Hoste H. (2003). Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton, et la chèvre. Alter agri. pp:17-19.

Paquereau J .(2013).Au jardin des plantes de la Bible. Catalogue de l'institut pour le développement forestier .France . pp : 122-124.

Pétrier, C., Gondrexon N.et Boldo P. (2008). Ultrasons et sonochimie. Techniques de l'ingénieur AF. 6310. pp : 1-14.

Polese J.,M.(2007).La culture des olivier .Artemis . A p10-14, pp : 32-36

Q

Quezel P., Santa S. (1962) .Nouvelle flore de l'Algérie et de la région désertique méridionale. Edi Centre national de la recherche scientifique. France. Tome 1.p739.

R

RafieeZ .,Jafari S., Alami M. et Khomeiri M .(2012). Antioxidant effect of Microwave-assisted extracts of Olive Leaves on Sun flower Oil . Journal of Animal Science and Technology .Vol. 14: 1497-1509 .

Rauwald H.W., Brehm O. et Odenthal K.P. (1994). Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity. Strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*. Phytother Res. Vol 8. pp : 135-40.

Rayan S., Monaco P., Pinto G., Pollio A., Previtera L. et Temussi F.(2001). Phytotoxicity of low molecular weight phenols from olive millwaste waters. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology .Volume 67. Issue 3. pp 0352-0359.

Ribereau-Gayon P., Gautheret R.J. (1968). Les composés phénoliques des végétaux, Edition Dunod. Paris. 273 p.

S

Scutt A., Meghji S., Canniff J.P. et Harvey W. (1987). Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. Experientia. Vol 43. pp : 391-393.

Shan L., He P., Sheen J. (2007). Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. *Cell Host Microbe* .1 .pp : 167–174.

Singleton V.L., Othofer R. et Lamuela R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods enzymol*, pp : 152-157.

Sujana A.N., Ryan V., Rasool N. et Islem N. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* leaf extract. *Vol 33*. pp : 461-463.

T

Tasiola M., Okokerio. (2001). Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and U.V detection. *Food chemistry* . pp: 144-151.

Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissiou M. et Sokmen A. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chem. March*. 84(4) , pp : 519-525.

V

Ventoso L. (2013). *olea europaea* .(www.academia.edu)

V-G de Billerbeck. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques, *Phytothérapie*. Vol 5. pp : 249-253.

Vinod KG ., Amit R ., Vikas KN. et Kalishankar M. (2010). Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin .*Journal of Medicinal Plants Research*. Vol 4(16). p : 1656-1661.

Visioli F., Poli A. et Galli C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*: 22. p 65–75.

W

Warda K., Markouk M., Bekkouche K., Larhsini M., Abbad A., Romane A. et Bouskraoui M. (2009). Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumonia*. *Afr J Pharmacy and Pharmacology*. Vol 3(3). pp : 101-104.

Z

Zirih GN., Kra AKM. et Dibié T. (2007). Etude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* et *Spermacoce verticillata* sur la croissance in vitro de *A. fumigatus* . *Rev Med Pharm Afr*. pp : 9-17.

Sites Internet:

André Bervillé, 2003 : (www.inra.fr/presse/juillet03/nb3.html)

Inconnu, (www.google.fr/maps)

Inconnu, (www.vasculaire.com)

Inconnu, (www.mdidea.com)

Annexes

Annexe 01 : Matériel et réactif chimiques.

- **Matériel**

Verrerie	Matériels en plastique	Autres	Appareillage
Entonnoir Pipettes Pasteur. Tubes à essai. Fioles. Becher. Erlenmeyer.	Ependorfs Embouts. Tube à hémolyse. Cuve de spectrophotomètre.	Fibre de verre. Pincés. Micropipettes. Anses. Seringues.	Balance. Agitateur. Bain marie. Autoclave. Spectrophotomètre. Etuve Microonde. Sonicateur.

- **Réactifs chimiques**

Ethanol.
Carbonate de sodium.
Folin Ciocalteu.
Acide gallique.
DMSO.
Violet de gentiane.
Lugol.
Fushine

Annexe 02 : Composition des milieux de cultures.

Gélose Muller Hinton	
Infusion de viande bovine	3g
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Amidon soluble	1.5g
Agar	15.0g
Eau distillée	1000ml

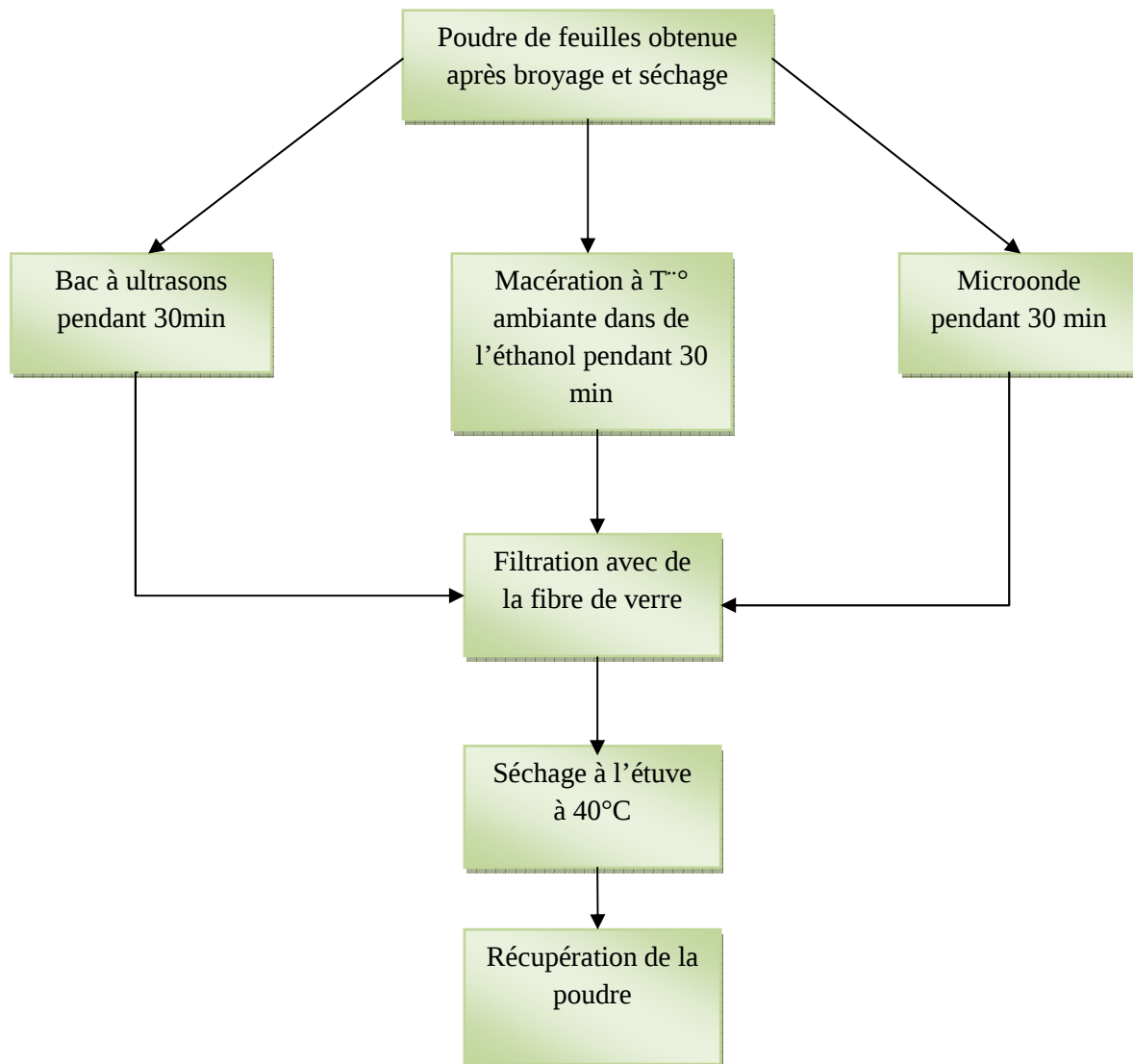
Gélose King A	
Peptone bactériologique « A »	20g
Glycerol	10g
K ₂ SO ₄	10g
MgCl ₂	1.4g
Agar purifié	12g
Eau distillée	1000ml

BHIB	
Extrait cœur-cervelle	17.5g
Peptone pancréatique de gélatine	10.0g
Chlorure de sodium	05.0g
Phosphate di sodique	02.5g
Glucose	0.2.0g
Eau distillée	1000ml

Milieu Mevag	
Dihydrogénophosphate d'ammonium	01.0g
Chlorure de potassium	0.20g
Sulfate de magnésium	0.20g
Extrait de levure	01.0g
Glucose	10.0g
Agar	03.2g
Solution de pourpre de bromocrésol	7.5ml
Eau distillée	1000ml

Eau physiologique	
NaCl	09.00g
Eau distillée	1000ml

Annexe 03 : Schéma illustrant les étapes d'obtention des extraits brut



Annexe 04 : Photos illustratives des résultats des tests de caractérisation chimiques après manipulation.

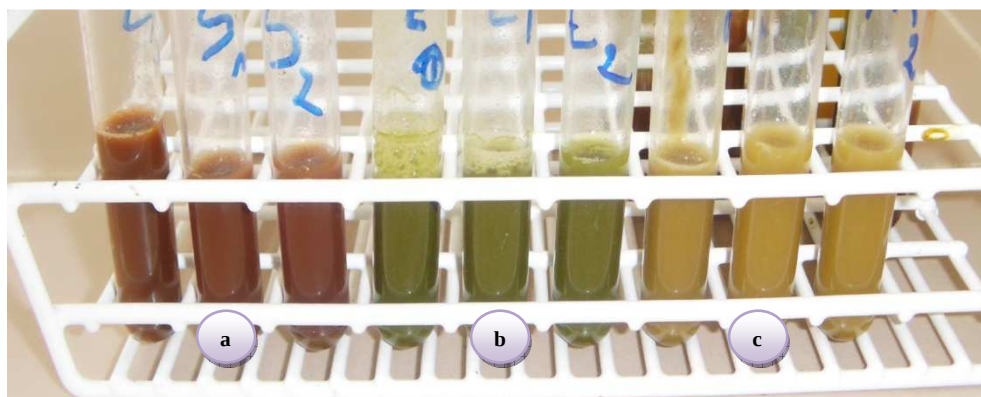


Figure A : Couleur des différents extraits brut abstenus après dilution. **(a)** Après extraction assistée par ultrasons ; **(b)** Après extraction par l'éthanol ; **(c)** Après extraction assistée par microonde.

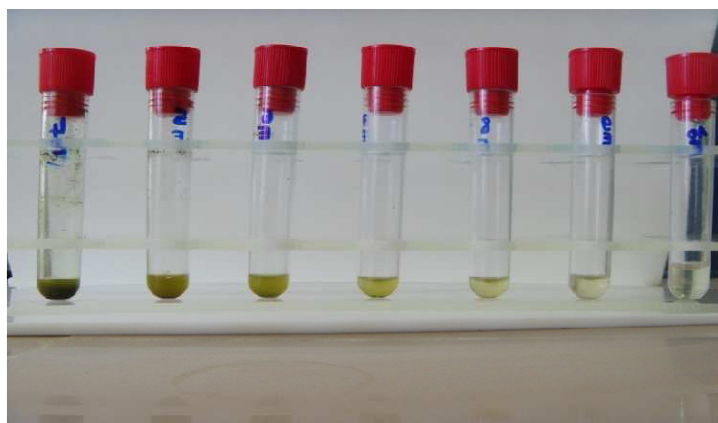


Figure B : Extraits éthanoliques servant à la détermination de CMI.



Figure C : Extraits microonde servants é la détermination de la CMI.



Figure D : Résultats des tests de dosage des polyphénols.
(a) Extraits microonde ; (b) Extraits éthanoliques.

Annexe 05 : Caractéristiques des souches testées.

▪ ***Escherichia coli* ATCC 25922 :**

Bacille à Gram négatif apparentant à la famille des Entérobactériaceae, hôte normale du tube digestif de l'homme et des animaux.

Cette souche est responsable des infections urinaires, septicémie, méningite du nourrisson, de plaies opératoires et de gastro-entérites.

▪ ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 :**

P. aeruginosa est une espèce bactérienne ubiquitaire. Elle vit à l'état saprophyte dans l'eau et les sols humides. Elle vit également à l'état commensal dans l'intestin de l'homme et des animaux.

P. aeruginosa constitue une cause majeure d'infections nosocomiales. Elle colonise souvent le tube digestif humain, et engendre des infections urinaires, oculaires ou pulmonaires et infecte des plaies profondes en entraînant un choc septique.

▪ ***Staphylococcus aureus* ATCC 43300 :**

Staphylococcus aureus appartient à la famille des *Micrococcaceae*. C'est un cocci à Gram+ de 0,5 à 1 mm de diamètre, non sporulé, ubiquitaire présente dans tous les milieux naturels (air, poussière, sol, eau, égouts, vêtements) mais également chez les animaux et chez les hommes.

La présence de *S. aureus* dans les aliments constitue un risque pour la santé humaine parce que certaines souches sont capables de produire des entérotoxines, dont l'ingestion provoque une intoxication. Les entérotoxines agissent au niveau des nerfs du tube digestif qui stimulent le centre des vomissements; douleurs abdominales; diarrhées; crampes.

▪ ***Bacillus cereus* ATCC 10876 :**

Bacilles Gram+, à spore terminale, sub terminale ou centrale, appartenant à la famille des *Bacillaceae*, ce sont des aéro-anaérobies facultatifs ou parfois aérobies stricts.

Les colonies ont un diamètre compris entre 2 et 7 mm, elles sont soit circulaires soit de forme irrégulière avec des bords ondulés ou filamenteux, leur aspect est crémeux lisse, mat ou granuleux.

B.cereus est responsable d'intoxications alimentaires qui peuvent se manifester sous deux formes :

- La forme émétique, accompagnée de nausées et de vomissements dont la durée d'incubation est de 1 à 5 heures.
- La forme diarrhéique, accompagnée de douleurs abdominales et d'une diarrhée dont la durée d'incubation est de 6 à 24 heures.

Annexe 06 : Courbe étalon de l'acide gallique.

