

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique**  
**Université MOULOU D MAMMERE de Tizi-Ouzou**



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

**Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention de diplôme de master en Sciences de la Nature et de la Vie

Option : Microbiologie Appliquée

**Thème**

**Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts des feuilles de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea laperrinei*) et de l'oléastre (*Olea europaea sylvestris*) sur cinq souches bactérienne et l'étude de l'association extrait brut-antibiotique.**

**Travail réalisé par :**

**M<sup>elle</sup> : BOUSSADIA Dyhia**

**M<sup>elle</sup> : DJENOUNE Samra**

**Devant le jury :**

**Président : Mr HOUALI. K**

**Professeur à l'UMMTO**

**Promotrice : Mme LAHCENE. S**

**Maitre assistant A à l'UMMTO**

**Examinatrice : M<sup>me</sup> IRATNI AICHE. G**

**Maitre de conférences B à l'UMMTO**

**Examineur : Mr MOUALEK. I**

**Maître assistant A à l'UMMTO**

**Année universitaire : 2016-2017**

# ***Remercîments***

*Nous tenons à remercier en premier lieu le bon Dieu tout puissant de nous avoir donné la santé, la volonté, la foi et le courage pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier également toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus en particulier :*

*Notre promotrice : **Madame LAHCENE. S : Maitre Assistant A à l'UMMTO**, pour avoir accepté de diriger notre travail par ses conseils, sa disponibilité et ses orientations.*

***Monsieur HOUALI. K : Professeur à l'UMMTO**, de nous avoir accueillis dans son Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques et aussi pour avoir accepté de présider le jury.*

***Madame IRATNI-AICHE. G : Maitre de conférences B à l'UMMTO**, pour son encadrement très précieux, sa disponibilité, ses conseils, sa gentillesse, qu'elle trouve ici toute notre reconnaissance et notre respect et aussi pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

***Monsieur MOUALEK. I : Maitre assistant A à l'UMMTO**, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Enfin toute notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

✚ *A mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu durant toutes ces années.*

✚ *A mon très cher frère Takfarinas qui est toujours présent à mes cotés.*

✚ *A ma meilleure amie Dehbia.*

***Dyhia***



## *Dédicaces*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*A mes chères sœurs ..... pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,*

*A mes chers frères, ....., pour leur appui et leur encouragement,*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infaillible,*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

***à tous ceux et toutes celles  
qui m'ont accompagné et soutenu  
durant ces années de formation***

***Samra***



## Sommaire

|                        |   |
|------------------------|---|
| Résumé                 |   |
| Liste des abréviations |   |
| Liste des tableaux     |   |
| Liste des figures      |   |
| Introduction .....     | 1 |

### Première partie : Synthèse bibliographique

#### Chapitre I : Généralité sur l'olivier

|  |   |
|--|---|
| I.1. Historique .....  | 2 |
| I.2. Caractères de l'olivier .....   | 2 |
| I.3. Classification .....  | 4 |
| I.4. Répartition géographique .....  | 6 |
| I.4.1 Répartition géographique de l' <i>Olea europaea</i> subsp <i>sylvestris</i> .....  | 6 |
| I.4.2. Répartition géographique de l' <i>Olea europaea</i> subsp <i>laperrinei</i> ..... | 6 |

#### Chapitre II : feuilles d'olivier

|   |    |
|---|----|
| II.1. Description et caractéristiques des feuilles d'olivier .....              | 8  |
| II.2. Composition chimique .....  | 8  |
| II.2.1. Composition chimique globale de la feuille .....                        | 8  |
| II.2.2. Composés phénoliques des feuilles d'olivier .....                       | 10 |
| II.2.2.1. Généralités sur les composés phénoliques .....                        | 10 |
| II.2.2.1.1. Définition et localisation des composés phénoliques .....           | 10 |
| II.2.2.1.2. Classification des composés phénoliques .....                       | 10 |
| II.2.2.1.3. Principales voies de biosynthèse des composés phénoliques .....     | 12 |
| II.2.2.1.4. Extraction des polyphénols .....                                    | 12 |
| II.2.2.1.5. Les facteurs influençant l'efficacité du solvant d'extraction ..... | 13 |
| II.2.2.1.6. Activités biologiques des composés phénoliques .....                | 14 |

|  |    |
|--|----|
| II.3. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques .....                   | 14 |
| II.4. Les principales propriétés pharmacologiques des feuilles d'oliviers .....          | 16 |
| II.4.1. Propriétés anti-oxydantes .....  | 16 |
| II.4.2. Propriétés hypotensives .....  | 16 |
| II.4.3. Propriétés hypoglycémiantes .....  | 17 |
| II.4.4. Propriétés antimicrobiennes.....   | 17 |
| II.4.5. Propriétés hypocholestérolémiante .....  | 18 |
| II.5. Utilisation traditionnelle des feuilles d'olivier en médecine traditionnelle ..... | 18 |
| II.6. Domaines d'utilisation des feuilles d'olivier .....                                | 18 |

## **Deuxième partie : Partie expérimentale**

### **Chapitre I : Matériel et méthodes**

|   |    |
|---|----|
| I.1. Matériels.....   | 21 |
| I.1.1.. Matériel végétal.....   | 21 |
| I.1.2. Matériel bactérien utilisé.....  | 21 |
| I.2. Méthodes .....   | 22 |
| I.2.1. Préparation des extraits .....   | 22 |
| I.2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux (S <sub>1</sub> ) .....                          | 22 |
| I.2.1.2. Préparation de l'extrait éthanolique (S <sub>2</sub> ) .....                     | 22 |
| I.2.2. Confirmation des souches bactériennes .....  | 24 |
| I.2.2.1. Revivification.....  | 24 |
| I.2.2.2. Isolement .....  | 24 |
| I.2.2.3. Coloration et observation .....  | 24 |
| I.2.3. Détermination de l'activité antibactérienne .....                                  | 24 |
| I.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....                 | 26 |
| I.2.5. Détermination de l'effet antibactérien de l'association extrait-antibiotique ..... | 27 |
| I.2.6. Analyse statistique .....  | 29 |

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

|  |    |
|--|----|
| II.1. Test de confirmation des souches bactériennes .....                  | 30 |
| II.2. Détermination de l'activité antibactérienne .....                    | 33 |
| II.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....   | 39 |
| II.4. Détermination de l'effet de l'association extrait-antibiotique ..... | 42 |
| Conclusion .....   | 46 |

Références bibliographiques

Annexes

## Liste des abréviations

|              |   |
|--------------|---|
| <b>AMX</b>   | Amoxicilline                              |
| <b>ARN</b>   | Acide RiboNucléique                       |
| <b>ATB</b>   | Antibiotique                              |
| <b>ATCC</b>  | American Type Culture Collection          |
| <b>BCP</b>   | BromoCresol Puple                         |
| <b>BHIB</b>  | Bouillon Brain Heart Infusion Broth       |
| <b>BMH</b>   | Bouillon Muller-Hinton                    |
| <b>CMI</b>   | Concentration Minimale Inhibitrice        |
| <b>CN</b>    | Gentamycine                               |
| <b>CP</b>    | Composés Phénoliques                      |
| <b>DCLS</b>  | Désoxycholat-Citrate-Lactose              |
| <b>DNID</b>  | Diabete Non Insulinant Dépondan           |
| <b>DO</b>    | Densité Optique                           |
| <b>ELISA</b> | Enzyme Linked Immunosorbent Assay         |
| <b>FICI</b>  | Fractional Inhibitory Concentration Index |
| <b>MH</b>    | Muller-Hinton                             |
| <b>NaCl</b>  | Chlorure de Sodium                        |
| <b>PH</b>    | Potentiel d'hydrogène                     |
| <b>UFC</b>   | Unité Formant Colonie                     |
| <b>Ø</b>     | Diamètre                                  |

## LISTE DES TABLEAUX

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau I:</b> Composition chimique globale des feuilles d'olivier .....   | 9  |
| <b>Tableau II:</b> Les principales classes des composés phénoliques.....  | 11 |
| <b>Tableau III:</b> principales méthodes d'extraction des polyphénols .....   | 13 |
| <b>Tableau IV:</b> Effets bénéfiques de l'oleuropéine .....   | 16 |
| <b>Tableau V:</b> les souches bactériennes utilisées.....   | 22 |
| <b>Tableau VI :</b> Préparation de la gamme de concentration des extraits a testé tableau illustrant la préparation de la gamme de dilution des extraits de feuilles d'oliviers ..... | 26 |
| <b>Tableau VII :</b> Etude macroscopique et microscopique des bactéries testées.....  | 31 |
| <b>Tableau VIII:</b> diamètres des zones d'inhibition (mm) de chaque extrait des feuilles d'olivier .   | 33 |
| <b>Tableau IX:</b> valeurs des CMI obtenues avec les trois extraits bruts vis-à-vis de <i>S. aureus</i> .....   | 39 |
| <b>Tableau X :</b> valeurs des CMI obtenues avec les extraits bruts S <sub>1</sub> et S <sub>2</sub> vis-à-vis de <i>B.cereus</i> , <i>E.coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et BLSE..... | 40 |
| <b>Tableau XI:</b> activité antibactérienne de l'association S <sub>1</sub> -amoxicilline .....   | 42 |
| <b>Tableau XII:</b> activité antibactérienne de l'association N-amoxicilline .....  | 43 |
| <b>Tableau XIII:</b> activité antibactérienne de l'association S <sub>2</sub> -amoxicilline .....   | 44 |

## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Aspect buissonnant de l'Oléastre.....   | 3  |
| <b>Figure 2</b> : L'olivier de Laperrine.....   | 4  |
| <b>Figure 3</b> : Carte de distribution du genre <i>Olea</i> .....  | 4  |
| <b>Figure 4</b> : Répartition géographique de l'Olivier de laperrine .....  | 10 |
| <b>Figure 5</b> : Structure de l'oleuropéine.....   | 16 |
| <b>Figure 6</b> : Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction.....  | 23 |
| <b>Figure 7</b> : Schéma de la détermination des valeurs des CMI .....  | 27 |
| <b>Figure 8</b> : Démarche de l'étude de l'association extrait-antibiotique .....   | 29 |
| <b>Figure 9</b> : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm).....  | 34 |
| <b>Figure 10</b> : montrant les halos d'inhibitions provoquées par l'E.B (1: S1, 2: S2, 3: N) et les différentes combinaisons antibactériennes testées, réalisées par la méthode de diffusion sur gélose..... | 35 |
| <b>Figure 11</b> : Représentation graphique des valeurs des CMI's retenues sur <i>S. aureus</i> avec les trois extraits S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> et N .....  | 40 |
| <b>Figure 12</b> : Représentation graphique des valeurs des CMI's des extraits S <sub>1</sub> et S <sub>2</sub> .....   | 41 |
| <b>Figure 13</b> : La méthode du tableau à damier montre l'effet de la combinaison de S <sub>1</sub> et l'amoxicilline sur <i>S.aureus</i> .....  | 43 |
| <b>Figure 14</b> : la méthode du tableau à damier montre l'effet de la combinaison de N et l'amoxicilline sur <i>S.aureus</i> .....   | 44 |
| <b>Figure 15</b> : La méthode du tableau à damier montre l'effet de la combinaison de S <sub>2</sub> et l'amoxicilline sur <i>S. aureus</i> .....   | 44 |

# **Introduction**

L'olivier est considéré comme une plante aromatique et médicinale, réservoir de composé naturels aux effets bénéfiques. Certains composés identifiés dans les extraits de feuilles, tels que les composés phénoliques présentent des activités biologiques importantes (BISIGNANO *et al.*, 1999).

L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques (DJENANE *et al.*, 2012). Par ailleurs, les feuilles d'olivier sont connues par leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine, due à leurs richesses en composés phénoliques, notamment l'oleuropéine (BISIGNANO *et al.*, 1999 ; SUDJANAN *et al.*, 2009 ; AOUIDI, 2012). Ces composés possèdent entre autres un large éventail d'activités biologiques : antioxydante (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 2000; DEKANSKI *et al.*, 2011), antivirale (MICOL *et al.*, 2005), antimicrobienne (AZIZ *et al.*, 1998 ; SINGH *et al.*, 2008; LEE et LEE, 2010; SUSALIT *et al.*, 2011) qui les rendent très importants pour les domaines de la santé publique et l'industrie agroalimentaire.

COWAN, (1999) ; SUDJANA *et al.* (2009) ont démontré que les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis de nombreux microorganismes.

Notre travail a pour objectif de comparer l'effet antibactérien des deux extraits issus de l'olivier de Laperrine (aqueux et éthanolique) et de comparer aussi l'effet de deux extraits aqueux l'un est issu de l'olivier de Laperrine et l'autre est issu de l'oléastre, la détermination de leur concentration minimale inhibitrice vis-à-vis de cinq souches bactérienne testées et la détermination de l'effet de l'association extraits-antibiotique.

**Première partie :**

**Synthèse**

**bibliographique**

# **Chapitre I :**

## **Généralité sur l'olivier**

## I. Olivier

### I.1. Historique

L'olivier est antérieur à l'apparition de l'homme sur terre. Des fossiles de la feuilles d'olivier ont été trouvés dans les sites pliocènes de Mongardino (Italie), des vestiges fossilisés dans des strates du paléolithique supérieur dans l'élevage d'escargots de Relilai en Afrique du Nord ; des fragments d'olivier sauvage et des noyaux dans des sites de l'Enéolithique et de l'âge de bronze en Espagne. Et puis l'histoire suit son cours entraînant avec elle la diffusion de l'olivier dans tout le bassin méditerranéen (BLAZQUEZ, 1997 ; SIGUERDJIDJENE, 2010).

Depuis l'antiquité, l'olivier a été une essence des plus utiles pour toutes les populations du pourtour de la Méditerranée, qui utilisaient son bois, ses feuilles et ses fruits. La feuille d'olivier, qui a la propriété de faire baisser la tension artérielle, ainsi que le taux de sucre dans le sang, a été utilisée contre l'hypertension, l'angine de poitrine et le diabète ; fébrifuge et astringente, elle a même servi pour combattre les fièvres, en Espagne, pendant les guerres de l'empire (SCHUCHARDT, 1997 ; BROSSE, 2000).

### I.2. Caractéristique de l'olivier

L'olivier est un arbre de la famille des oléacées moyennement trapu (de 2 m) qui peut pour certain sujet atteindre les 15 mètres de hauteur et son tronc tourmenté et noueux. Son bois est brun clair veiné de marbrures sombres (MERAH, 2016).

Il présente une cime arrondie avec des rameaux étalés très nombreux, enchevêtrés les uns dans les autres, plus ou moins épineux ou internes. Dimensions et forme varient avec les conditions climatiques, l'exposition, la fertilité du sol et la variété (ARGENSON et *al.*, 1999).

L'olivier s'adapte aux conditions extrêmes de l'environnement, mais exige une intensité lumineuse importante et un sol aéré. L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans doute la production de l'huile d'olive qui est un composant essentiel du régime méditerranéen. Riche en acides gras insaturés, en vitamine et en polyphénols (AKROUR et *al.*, 2011).

➤ *Olea europaea subsp sylvestris*

L'oléastre est la forme sauvage de l'olivier (*Olea europaea subsp sylvestris*), c'est un arbuste buissonnant (Fig. 1) de 6 m de haut, avec un tronc lisse et gris, les branches régulières, il a la particularité de posséder des rameaux épineux, de petites feuilles et de petites fleurs blanc jaunâtre. Les fruits sont moins charnus et fournissent moins d'huile.

Il pousse dans le maquis de la zone littorale, sur des sols schisteux ou il forme des fourrés denses en compagnie d'autres arbustes, notamment le lentisque (POLESE, 2009).



**Figure 1** : Aspect buissonnant de l'Oléastre (ANONYME 1).

➤ *Olea europaea subsp laperrinei*

Olivier du sud est de taille moyenne, 2 à 3 m de haut, il prend l'allure soit d'un arbuste à rameaux intriqués, soit d'un arbre au tronc noueux. Les rameaux feuillus forment un enchevêtrement serré (Fig. 2), caractéristique des mutilations et des coupes dont il est l'objet pour procurer du fourrage aux animaux. Ses feuilles opposées, vert cendré, sont très allongées effilées à l'extrémité. Il fleurit rarement. Ses inflorescences peu fournies sont en grappes grêles à petites fleurs blanches et, par voie de conséquence, fructifie peu (BENCHELAH et al., 2006).

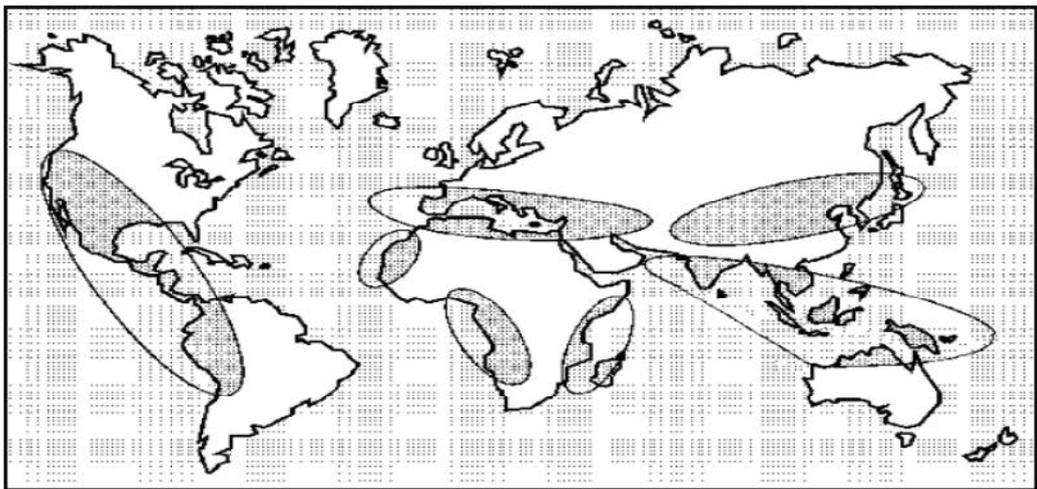
*Olea europaea subsp laperrinei* a été observé au Sahara dans le Hoggar et l'Air. Il croit dans les montagnes du Sahara dans les milieux caillouteux, les gorges et les falaises (BRETON et BERVILLE, 2012).



**Figure 2 :** L'olivier de Laperrine (BAALI-CHERIF, 2007).

### I.3. classification

D'après LOUSSERT et BROUSSE (1978) et ARGENSON et ses collaborateurs (1999), le genre *Olea* est composé de 30 espèces différentes réparties sur les cinq continents: Afrique, Asie, Amérique, Europe, Océanie (Fig. 3). Entre celles-là il faut souligner *l'Olea europaea* qui correspond à l'olivier, avec des nombreuses sous espèces, séries et variétés.



**Figure 3 :** Carte de distribution du genre *Olea* (LOUSSERT et BROUSSE, 1978).

Classification botanique de l'arbre de l'olivier sauvage (GHEDIRA, 2008) :

|                    |  |
|--------------------|--|
| Règne              | : Plantae  |
| Embranchement      | : Magnoliophyta  |
| Sous embranchement | : Magnoliophytina  |
| Classe             | : Magnoliopsida  |
| Sous classe        | : Asteridae  |
| Ordre              | : Scrophulariales  |
| Famille            | : Oleaceae   |
| Genre              | : <i>Olea</i>  |
| Espèce             | : <i>Olea europaea</i> L                                       |
| Sous espèce        | : <i>Olea europaea</i> L. ssp. <i>Sylvestris</i> (MILL, 2002). |

Selon CRONQUIST (1981), l'olivier de Laperrine se classe comme suit :

|             |   |
|-------------|---|
| Règne       | : Plantae   |
| Sous Règne  | : Tracheobionta   |
| Division    | : Magnoliophyta   |
| Classe      | : Magnoliopsida   |
| Sous classe | : Asteridae   |
| Ordre       | : Scrophulariales   |
| Famille     | : Oleaceae  |
| Genre       | : <i>Olea</i>   |
| Espèce      | : <i>Olea europaea</i>  |
| Sous espèce | : <i>Olea europaea subsp laperrinei</i> (BATT et TRAB, 1912). |

## I. 4. Répartition géographique

### I. 4.1. Répartition géographique de l'*Olea europaea* subsp *sylvestris*

L'olivier sauvage, ou oléastre, est un élément caractéristique de la végétation méditerranéenne. On le rencontre, souvent en mélange avec de nombreux individus féraux, dans les matorrals et boisements des zones méditerranéennes xérophiiles. Son extension géographique est donc plus réduite que celle de l'olivier cultivé. Il est actuellement présent dans le Maghreb, le sud de la péninsule ibérique, les îles de la Méditerranée, le sud de l'Italie, le Péloponnèse, les côtes de Grèce, de Turquie, du Levant et du nord de la Lybie, beaucoup plus sporadiquement sur le littoral nord méditerranéen (ZOHARY *et al.*, 2012).

### I.4.2. Répartition géographique de l'*Olea europaea* subsp *laperrinei*

L'*Olea europaea* subsp *laperrinei* se rencontre en Afrique Septentrionale de l'atlas Marocain à la Libye en passant par le massif du Hoggar et le Tassili des Adjers. On le trouve à l'état spontané jusqu'à 2700 m d'altitude (LOUSSERT et BROUSSE, 1978).

Espèce endémique du Sahara central, l'olivier de Laperrine se rencontre principalement dans les massifs à partir de 1400 m d'altitude. Il se rencontre aussi dans les ravins de l'étage supérieur de l'Ahaggar, ou il est signalé à 2600 m d'altitude. Il pousse dans les amonts pierreux des oueds, les fissures des roches. Il présente dans la Tefedest en Ahaggar, le plateau du tassili et dans le massif de l'Air (BENCHELAH *et al.*, 2006).

Cet arbre se rencontre dans trois régions (Fig. 4) :

- Le Sahara central (Algérie), dans toutes les régions montagneuses situées au-dessus de 1500 m d'altitude, il est fréquent dans le massif du Hoggar surtout dans les massifs granitiques (Taessa, Aheleheg), il est abondant sur le sommet du tafedest et il est rare dans le mouydir ;
- Les massifs de l'air (Niger) ou il a été indiqué principalement dans les massifs du Greboun, du Bagzane et du Tamgak ;
- Soudan dans le Djebel Marra et le Gorgeil (BAALI-CHERIF, 2007).

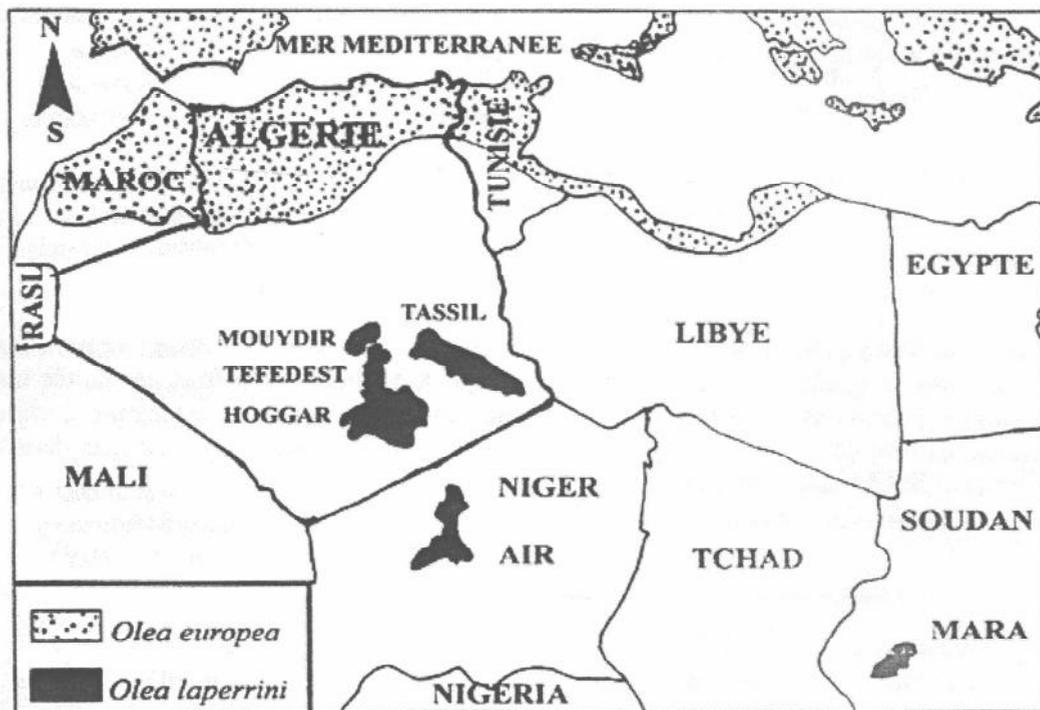


Figure 4 : Répartition géographique de l'Olivier de Laperrine (BENICHOU, 1962).

# **Chapitre II :**

## **Feuilles d'olivier**

## II. Feuilles d'olivier

### II.1. Description et caractéristiques des feuilles d'olivier

Les feuilles sont simple, épaisse et coriace, lancéolée à obovale ; elle possède un apex mucroné et se rétrécit à la base en un court pétiole ; les bords sont entiers et réfléchis sur la face abaxiale. Elles sont étroites, allongées avec des dimensions variable selon la variété de 3 à 5 centimètre de long et de 1 à 1,5 centimètre de large (POLESE, 2009; ROMBI *et al.*, 2015).

Les feuilles sont opposées sur les branches et les rameaux. Elles sont inodores, amères et acerbes, elles se renouvellent par tiers tous les trois ans, jaunissent et tombent principalement en été (ANGINOT et ISLER, 2003).

La face supérieure est de couleur vert foncé ou vert-gris lisse et luisante, est recouverte d'une épaisse cuticule; la face inférieure est plus claire; de couleur argentée et est recouverte surtout le long de la nervure médiane et des principale nervures latérales d'un fin duvet de petits poils qui peuvent retenir la plus infime quantité d'humidité ce dernier est détachable par grattage (POLESE., 2009; ROMBI *et al.*, 2015).

La feuille de l'olivier a son propre système de protection contre la chaleur de l'été. L'évaporation se fait par la face inferieure où se trouvent les stromates, organes constitués d'orifices microscopiques, qui composent l'épiderme de la feuille et les minuscules poils qui les recouvrent. Lorsque l'air est humide, les poils se soulèvent et libèrent de la vapeur d'eau. Lorsque l'air est sec, les poils se plaquent, bouchant l'ouverture des stromates, empêchant ainsi toute transpiration (BOLMONT *et al.*, 2015).

### II.2. Composition chimique

Les feuilles d'olivier contiennent des quantités variables d'oligo- élément dont la concentration est en fonction de plusieurs facteurs : la physiologie de la plante, les conditions environnementales (principalement, les éléments disponibles dans le sol) et l'âge de la feuille (BOUABDALLAH, 2014).

#### II.2.1. Composition chimique globale de la feuille

Les différents composés chimiques sont regroupés dans le tableau1 ci-dessous.

**Tableau I :** Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimé en g/100 g de matière fraîche).

| <b>Composition en %</b>   | <b>GARCIA-GOMEZ et al., 2003</b> | <b>MARTIN-GARCIA et al., 2006</b> | <b>BOUDHRIOUA et al., 2009</b> | <b>ERBAY et ICIER., 2009</b> |
|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b>Eau</b>                | nd                               | 41,4                              | 46,2 – 49,7 a                  | 49,8 a                       |
| <b>Protéines</b>          | nd                               | nd                                | 5,0 – 7,6 a                    | 7,0 b                        |
| <b>Lipides</b>            | 6,2 b                            | 3,2 b                             | 1,0 – 1,3 a                    | 6,5 a                        |
| <b>Minéraux</b>           | 26,6 b                           | 16,2 b                            | 2,8 – 4,4 a                    | 3,6 b                        |
| <b>Glucides</b>           | nd                               | nd                                | 37,1 – 42,5 a                  | 27,5 a                       |
| <b>Fibres brutes</b>      | nd                               | nd                                | nd                             | 7,0 a                        |
| <b>Cellulose</b>          | 19,03 b                          | nd                                | nd                             | Nd                           |
| <b>Hémicellulose</b>      | 25,4 b                           | nd                                | nd                             | Nd                           |
| <b>Lignine</b>            | 30,4 b                           | nd                                | nd                             | Nd                           |
| <b>Polyphénols totaux</b> | nd                               | 2,5 b                             | 1,3 – 2,3 b                    | Nd                           |
| <b>Tannins solubles</b>   | nd                               | nd                                | nd                             | Nd                           |
| <b>Tannins condensés</b>  | nd                               | 0,8 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.2.2. Composés phénoliques des feuilles d'olivier

### II.2.2.1. Généralités sur les composés phénoliques

#### II.2.2.1.1. Définition et localisation des composés phénoliques

Les composés phénoliques (CP), sont des molécules résultant du métabolisme secondaires spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (BRUNETON, 2009; MACHEIX *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle, plus de 10 000 molécules sont isolées et identifiées (TAO et LAMBERT, 2014). L'élément structural de base qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzoïque à 6 carbones (Fig. 5), auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH) libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (MACHEIX *et al.*, 2006).

La désignation «polyphénols» est fréquemment utilisée dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, elle devrait être réservée aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale CP concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (COLLIN *et al.*, 2011).

Dans la cellule, les composés phénoliques sont essentiellement localisés sous forme soluble dans les vacuoles. Ils peuvent également s'accumuler dans les parois végétales : c'est le cas de la lignine (hétéropolymère d'alcools coniférylique, p-coumarylique et sinapylique) ou de certains flavonoïdes (ROBARD *et al.*, 1999; MACHEIX *et al.*, 2003).

#### II.2.2.1.2. Classification des composés phénoliques

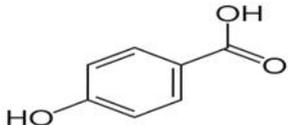
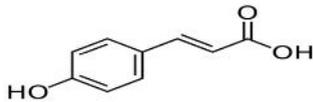
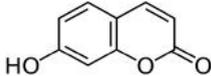
D'après MOTILVA *et al.* (2013), il n'existe pas de classification universelle des polyphénols. De nombreux auteurs ont cependant proposé leur propre classification, ainsi ;

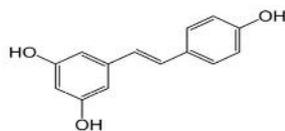
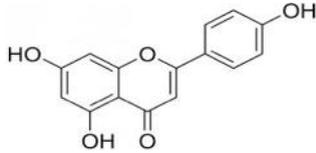
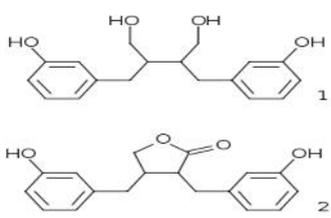
- CROZIER *et al.* (2010) ont séparé ces composés en deux catégories : les flavonoïdes et les non flavonoïdes.
- MANACH *et al.* (2004) distinguent six sous classes de flavonoïdes.

- HARBONE et SIMMONDS (1964) ont classifié les composés phénoliques en groupes en se basant sur le nombre du carbone dans la molécule.

La classification des CP est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux (Tab. II).

**Tableau II :** Les principales classes des composés phénoliques (BRUNETON, 2009).

| Nombre d'atome de carbone | Squelette de base                              | Classe                    | Exemples   | Structure de base   |
|---------------------------|--|---------------------------|--|---|
| 6                         | C <sub>6</sub>                                 | Phénols simples           | Catéchol,<br>hydroquinone                                |    |
| 7                         | C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>                 | Acides Phénols benzoïques | Acide gallique,<br>Acide salysalique,<br>Vanilline       |    |
| 8                         | C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>                 | Acétophénones             | 3-acétyl-<br>Méthoxybenzalde<br>hyde<br>Gallacetophénone | /   |
| 8                         | C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>                 | Acide phénylacétique      | Acide p-<br>hydroxyphenylac<br>étique                    | /   |
| 9                         | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                 | Acide hydroxycinamique    | Acide coumarique,<br>Acide caféique                      |  |
| 9                         | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                 | Coumarines                | Esculétine   |  |
| 10                        | C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>                 | Naphtoquinones            | Shikonine  |  |
| 13                        | C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> | Xanthones                 | Bellidifoline,   | /   |

|    |                   |  |                                |   |
|----|-------------------|--|--------------------------------|---|
|    |                   |  | Mangocitine                    |   |
| 14 | $C_6-C_2-C_6$     | Stilbènes                                    | Hydrangénol,<br>Pinosylvine    |  |
| 15 | $C_6-C_3-C_6$     | Flavonoides<br>Isoflavonoides                | Quercétine<br>Roténoïde        |  |
| 18 | $(C_6-C_3)_2$     | Lignanes                                     | Matairésinol                   |  |
| 30 | $(C_6-C_3-C_6)_2$ | Bi flavonoides                               | Amentoflavone<br>Hinokiflavone | /   |
| N  | $(C_6-C_3-C_6)_n$ | Tanins<br>condensés<br>proanthocyanido<br>ls | Aesculitanins                  | /   |

### II.2.2.1.3.Principales voies de biosynthese des composés phénoliques

D'après BRUNETON (2009), les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

- a) **La voie de l'acide shikimique**, conduit des oses aux amino-acides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers aux acides cinnamiques et à leurs dérivés.
- b) **La voie de l'acide acétique**, conduit à des poly- $\beta$ -cétosters (polyacétates) de longueur variable, qui engendrent par cyclisation ou condensation, des composés souvent polycycliques : les flavonoïdes et les tannins condensés.

### II.2.2.1.4.Extraction des polyphénols

D'après VERCAUTEREN et CHEZE (1998), les solvants d'extraction jouent un rôle capital en assurant le transfert de phase du produit à extraire. Au départ, la matière première qui est un mélange hétérogène (solide végétal ou liquide de fermentation), est soumise au

contact d'un solvant (liquide) afin d'obtenir un extrait primaire complexe utilisable directement.

Il peut être également soumis à des échanges liquide-liquide, dans ce cas il s'agit principalement d'interactions moléculaires entre le solvant et le soluté.

L'extraction des composés phénoliques se fait selon plusieurs méthodes, les plus utilisées et employées sont résumées dans le tableau III.

**Tableau III** : principales méthodes d'extraction des polyphénols.

| Techniques  | Principe   | Référence                      |
|---|--|--------------------------------|
| <b>Extraction par les solvants (macération)</b>   | Le contact entre le solvant (liquide) et la matière végétale (solide) a pour but de libérer les polyphénols dans les cellules par rupture du tissu végétal et par diffusion.   | OWEN et JOHNS, (1999)          |
| <b>Extraction par chromatographie sur colonne</b> | Elle consiste à absorber sur une résine du type C18 pour les polyphénols des extraits végétaux puis à éluer sélectivement les substances polyphénoliques au moyen d'éthanol ou méthanol aqueux.  | HAYOUNI et <i>al.</i> , (2007) |
| <b>Extraction supercritique (SFE)</b>             | Le CO <sub>2</sub> supercritique, utilisé comme solvant d'extraction, du fait de sa faible viscosité, lui conférant une grande capacité de diffusion et lui permettant ainsi d'avoir accès à des composés phénoliques liés à la paroi cellulaire.<br><br>Sa densité relativement élevée lui confère un pouvoir de solvatation, ce qui permet un meilleur taux d'extraction (procédé non dénaturant et le temps d'extraction est réduit). | CHAN et MAZNAH, (2009)         |

#### II.2.2.1.5. Les facteurs influençant l'efficacité du solvant d'extraction

- **La nature du solvant** : les solvants les plus utilisés pour l'extraction des composés phénoliques sont : le méthanol, le mélange méthanol/eau, l'acétone, l'acétate d'éthyle et le chloroforme.
- **Le pH d'extraction** : détermine le degré de solubilité des composés, et influence la solubilisation de la fraction hydrolysable.

- **La température :** améliore l'efficacité d'extraction, augmente la solubilité et les coefficients de diffusion des composés à extraire et diminue la viscosité des solvants. Par ailleurs, les températures excessives peuvent dégrader les composés phénoliques.
- **Le nombre des échelons d'extraction et volume :** l'efficacité de l'extraction augmente avec le nombre d'étapes d'extraction. Il est plus efficace par exemple, pour mener quatre (04) extractions avec 50 ml de solvant qu'une extraction avec 200 ml. Les rendements quantitatifs sont obtenus uniquement quand 3 à 5 extractions consécutives du matériel végétal d'origine sont menées (DERRICHE et BOUARAB, 2010).
- **La taille des particules:** Tous les auteurs s'accordent sur l'effet généralement positif du broyage sur les opérations d'extraction. Le broyage du solide permet d'intensifier les phénomènes de transfert du solvant à travers l'augmentation de la surface spécifique (surface d'échange entre le solvant et le solide) (MOHAMMAD MOUNIR, 2007).
- **L'agitation :** elle permet le maintien des particules dans le solvant en suspension et l'homogénéisation du milieu. Si l'agitation est maintenue durant une longue période, elle va favoriser les chocs entre les différentes particules et permettre ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans le milieu (DIBERT 1989; LEYBROS et FREMEAUX 1990).

#### II.2.2.1.6. Activités biologiques des composés phénoliques

Les activités biologiques relatives à ce type de composés sont diversifiées. Chaque classe chimique de polyphénols semble être utilisée pour ses vertus spécifiques (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002). Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur activité antimicrobienne et antioxydante (KARAKAYA, 2004).

En phytothérapie, l'effet de nombreuses plantes médicinales est attribué en tout ou en partie aux composés phénoliques. Ces substances possèdent des activités biologiques qui les rendent bénéfiques à la santé humaine. Beaucoup d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (LEONG et SHUI, 2002).

Les composés phénoliques sont connus par leurs rôles physiologiques très importants, ils sont capables de se fixer sur certaines enzymes et protéines, et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques : ils joueraient un rôle dans les chaînes d'oxydo-réduction et modifieraient certaines réactions concernant la croissance, la respiration et la morphogenèse.

### II.3.Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques

Les feuilles d'olivier contiennent plusieurs classes de CP comme les flavonoides, secoiridoïdes, hydroxytyrosol (TALHAOUI et *al.*, 2015). Elles présentent une teneur en composés phénoliques variant de 2,8 mg/g MS (ALTIOK et *al.*, 2008) à 250 mg/g MS selon les variétés (MYLONAKI et *al.*, 2008).

Les composés phénoliques dans les feuilles d'olivier sont très divers et leurs structures sont très variables :

#### a) Monomères phénoliques

Selon ALTIOK et *al.* (2008) les monomères phénoliques sont représenté par :

- Acides phénoliques : acide caféique, acide vanillique et acide syringique.
- Alcools phénoliques : tyrosol et hydroxytyrosol.
- Des flavonoïdes : apigénine, lutéoline, rutine.

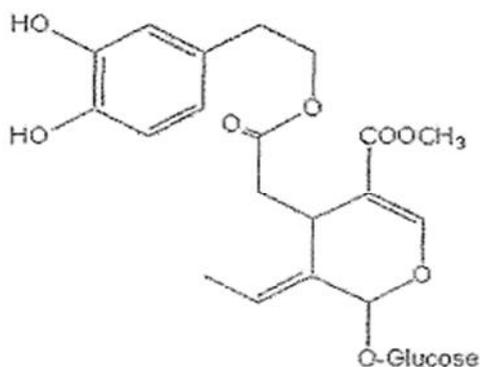
#### b) Polymères phénoliques

Les polymères phénoliques sont représentés par :

- Les tannins : composés naturels des végétaux, ayant une capacité de se complexer fortement avec les hydrocarbures et les protéines. Les tannins sont classés en deux groupes majeurs : les tannins solubles et les tannins condensés (GARRO-GALVEZ et *al.*, 1997).
- La lignine.

#### c) L'oleuropéine

L'oleuropéine ou oleuropéoside (Fig. 6), un hétéroside sécoiridoïde, est présent dans l'olivier et ses produits dérivés (huile d'olive, margines et grignons). C'est le composé bioactif le plus abondant et majeur dans les feuilles d'olivier la teneur moyenne varie de (60-90 mg/g) (ARAQAS, 2013 ; TALHAOUI et *al.*, 2015).



**Figure 5:** Structure de l'oleuropéine (LOMENECH, 2010).

L'oleuropéine possède de nombreux effets bénéfiques (Tab. IV). Ces derniers sont résumés ainsi ;

**Tableau IV** : Effets bénéfiques de l'oleuropéine.

| Effets bénéfiques de l'oleuropéine                       | Références bibliographiques           |
|--|---------------------------------------|
| Antioxydant  | BENAVENTE-GARCIA et <i>al.</i> , 2000 |
| Antimicrobien  | PEREIRA et <i>al.</i> , 2007          |
| Antiviral  | MICOL et <i>al.</i> , 2005            |
| Anti- inflammatoire                                      | VISIOLI et <i>al.</i> , 1998          |
| Cardioprotecteur   | ANDREADOU et <i>al.</i> , 2006        |
| Neuroprotecteur  | OMAR S.H., 2010                       |
| Anti-tumoral   | HAMDI et CASTELLON, 2005              |
| Inhibe l'activité du facteur d'activation des plaquettes | ANDRIKOPOULOS et <i>al.</i> , 2002    |
| Amélioration du métabolisme des lipides                  | POLZONETTI et <i>al.</i> , 2004       |
| L'auto-défense de l'olivier                              | MALIK et BRADFORD, 2006               |

#### II.4. Les principales propriétés pharmacologiques des feuilles d'oliviers

##### II.4.1. Propriétés anti-oxydantes

Les propriétés antioxydantes de la feuille d'olivier ont clairement été mises en évidence. Elles sont attribuées aux phénols, plus particulièrement à l'acide maslinique, à l'oleuropéoside et à l'hydroxytyrosol (ROMBI et *al.*, 2015). Les propriétés antioxydantes sont référées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH•) et superoxydes (O<sub>2</sub>•) (RICE-EVANS et *al.*, 1995; BARTOSZ, 2003).

#### II.4.2. Propriétés hypotensives

Les propriétés hypotensives seraient dues en grande partie à l'oleuropéine (ZARZUELO *et al.*, 1991). Cette action est également due à l'oléacine et l'acide oléanolique (HANSEN *et al.*, 1996 ; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

D'après les travaux de HANSEN *et al.* (1996) et SOMOVA *et al.* (2002), la pression artérielle baisse d'une manière statistiquement significative après trois mois de traitement. Cette évaluation chimique a été réalisée à l'aide d'un extrait aqueux de feuilles d'olivier, elle a été menée dans le service de cardiologie de l'Hôpital Militaire de Tunis en 1996.

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

#### II.4.3. Propriétés hypoglycémiantes

Les propriétés hypoglycémiantes peuvent être expliquée par deux mécanismes d'action de l'oleuropéine ;

- Augmentation de la libération d'insuline induite par un 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. (AL-AZZAWIE *et al.*, 2006).

L'acide oléanolique aurait aussi des propriétés hypoglycémiantes, cette molécule ralentit la prise du poids induit par une forte consommation de graisse et dispose d'un puissant potentiel contre l'hyperglycémie, et donc une forte action contre le DNID (diabète non insulino-dépendant) (SATO *et al.*, 2007).

#### II.4.4. Propriétés antimicrobiennes

L'extrait de feuille d'olivier renforcerait le système immunitaire et permettrait de lutter contre de nombreux agents infectieux; bactéries, parasites, virus et certains champignons. (WALKER, 2000; LEE-HUANG *et al.*, 2003; MARKIN *et al.*, 2003; SUDJANA *et al.*, 2009).

- L'extrait de feuilles d'olivier interfère avec les infections virales et leur diffusion en désactivant les cellules virales spécifiques, ou en inhibant leur prolifération et leur croissance à la membrane cellulaire.
- L'extrait de feuilles d'olivier interfère avec la production d'acides aminés, essentiels à la survie des microbes spécifiques, qu'ils soient virus, bactéries, parasites ou champignons.
- Il neutralise également la protéase nécessaire au retrovirus pour modifier l'ARN d'une cellule saine.
- L'extrait de feuilles d'olivier peut entrer dans les cellules humaines altérées, et inhiber la reproduction microbienne.
- L'extrait de feuilles d'olivier peut directement stimuler la formation de cellules immunitaires pour combattre de nombreux types de microbes (ANONYME 2).

#### II.4.5. Propriétés hypocholestérolémiantes

Cette action hypocholestérolémiantes est associée à une diminution du LDL-C, des LDL oxydées et des triglycérides (BENNANI-KABCHI *et al.*, 1999 ; SOMOVA *et al.*, 2002).

Il est connu qu'une augmentation des taux d'hormones thyroïdiennes circulantes abaisse la concentration plasmatique de lipides et notamment celle du cholestérol. Ainsi, une étude récente a mis en évidence qu'un extrait de feuilles d'olivier (extrait aqueux) diminue le taux de TSH sanguin avec une augmentation de la T3 probablement due à une stimulation de la 5'-désiodinase qui convertit la T4 en T3 (AL-QARAWI *et al.*, 2002).

#### II.5. Utilisation traditionnelle des feuilles d'olivier en médecine traditionnelle

Depuis l'antiquité les feuilles sont employées pour désinfecter les blessures cutanées. Les Anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections (MICOL *et al.*, 2005).

#### II.6. Domaines d'utilisation des feuilles d'olivier

##### ✓ **Domaine de l'alimentation animale**

Les feuilles sont utilisées dans l'alimentation des moutons et chèvres (DELGADO-PERTINEZ *et al.*, 2000 ; MARTIN-GARCIA *et al.*, 2003). Elles sont également utilisées dans l'alimentation des cailles pour améliorer la qualité de leurs œufs (BOTSOGLOU *et al.*, 2010).

**✓ Domaine thérapeutique**

Les feuilles d'olivier ont un pouvoir anti-inflammatoire, antifongique et antimicrobien (TALHAOUI et *al.*, 2015). La consommation humaine d'infusion des feuilles d'olivier est bénéfique pour la santé (GIAO et *al.*, 2007).

**✓ Domaine pharmaceutique**

La valorisation concerne l'extraction des tocophérols et de l'oleuropéine, ainsi que la production de l'hydroxytyrosol (DE LUCAS et *al.*, 2002; BOUAZIZ et SAYADI, 2003).

Le spectre d'action de l'hydroxytyrosol est comparable à ceux de l'ampicilline et de l'érythromycine (BISIGNANO et *al.*, 1999).

**✓ Domaine cosmétologique**

Les feuilles sont utilisées dans la formulation des produits cosmétiques (TADASHI, 2006; THOMAS et *al.*, 2006).

L'acide oléanolique possède une activité antibactérienne contre *Propionebacterium acnes*. En conséquence, il peut constituer un élément important dans la lutte contre les symptômes de la peau acnéique. Ainsi, l'acide oléanolique est utilisé dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques pour tous les soins de la peau (AVENARD, 2008)

**✓ Industries Alimentaires**

Les feuilles peuvent être utilisées comme ingrédients dans la formulation d'aliments pour les hyper-glycémiques (KOMAKI, 2003). Stabilisant des huiles végétales (FARAG et *al.*, 2007 ; BOUAZIZ et *al.*, 2008); les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés. Elles peuvent être aussi utilisées pour la conservation de la viande fraîche de dinde (DJENANE et *al.*, 2012).

**Deuxième partie :**

**Partie expérimentale**

# **Chapitre I :**

## **Matériel et méthodes**

Notre étude expérimentale est réalisée au sein du laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) du département Biochimie-Microbiologie, faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, durant la période allant du mois de mars au mois de Septembre de l'année 2017. Elle consiste à :

- ✓ L'extraction de l'extrait brut des feuilles d'olivier.
- ✓ L'évaluation de l'activité antibactérienne de ces extraits.
- ✓ La détermination de la concentration minimale inhibitrice.
- ✓ L'évaluation de l'effet synergique des extraits.

### **I.1. Matériels**

#### **I.1.1. Matériel végétal**

Le matériel végétal utilisé au cours de l'expérimentation est représenté par des feuilles prélevés sur des pieds mère adultes de la station de Tamanrasset en été 2015 pour l'olivier de Laperrine, et de la région de Tizi-Ouzou en automne 2015 pour l'oléastre. Les feuilles récoltés sont séchés à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité elles sont par la suite coupé finement et broyé au moulin électromécanique ; la poudre qui en résulte sert de support à nos extractions.

#### **I.1.2. Matériel bactérien utilisé**

Pour tester l'activité antibactérienne des extraits des feuilles d'olivier, nous avons opté pour cinq souches bactériennes de référence obtenues (Tab. V) ; (ATCC), (MU) et (E).

**Tableau V** : Les souches bactériennes utilisées

|                            |   |              |
|----------------------------|---|--------------|
| <b>Souches bactérienne</b> | <i>Staphylococcus aureus</i> (Mu50)       | Gam positif  |
|                            | <i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)       | Gram négatif |
|                            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853) | Gram négatif |
|                            | <i>Bacillus cereus</i> (ATCC10876)        | Gram positif |
|                            | BLSE(E88)                                 | Gram négatif |

Les souches utilisées (Tab.V) sont revivifiées pendant 24 heures à 37 °C dans le bouillon Brain Heart Infusion Broth (BHIB), la composition des différents milieux au cours de notre expérimentation est résumée dans l'Annexe 1 et activées par repiquage sur milieu gélosé Muller-Hinton (MH).

Les souches bactériennes sur lesquelles porte notre étude, connues pour leur pathogénicité et leurs résistances aux antibiotiques, il s'agit de germes capables d'infecter un large spectre d'hôtes et de causer diverses pathologies.

## **I.2.Méthodes**

### **I.2.1.Préparation des extraits**

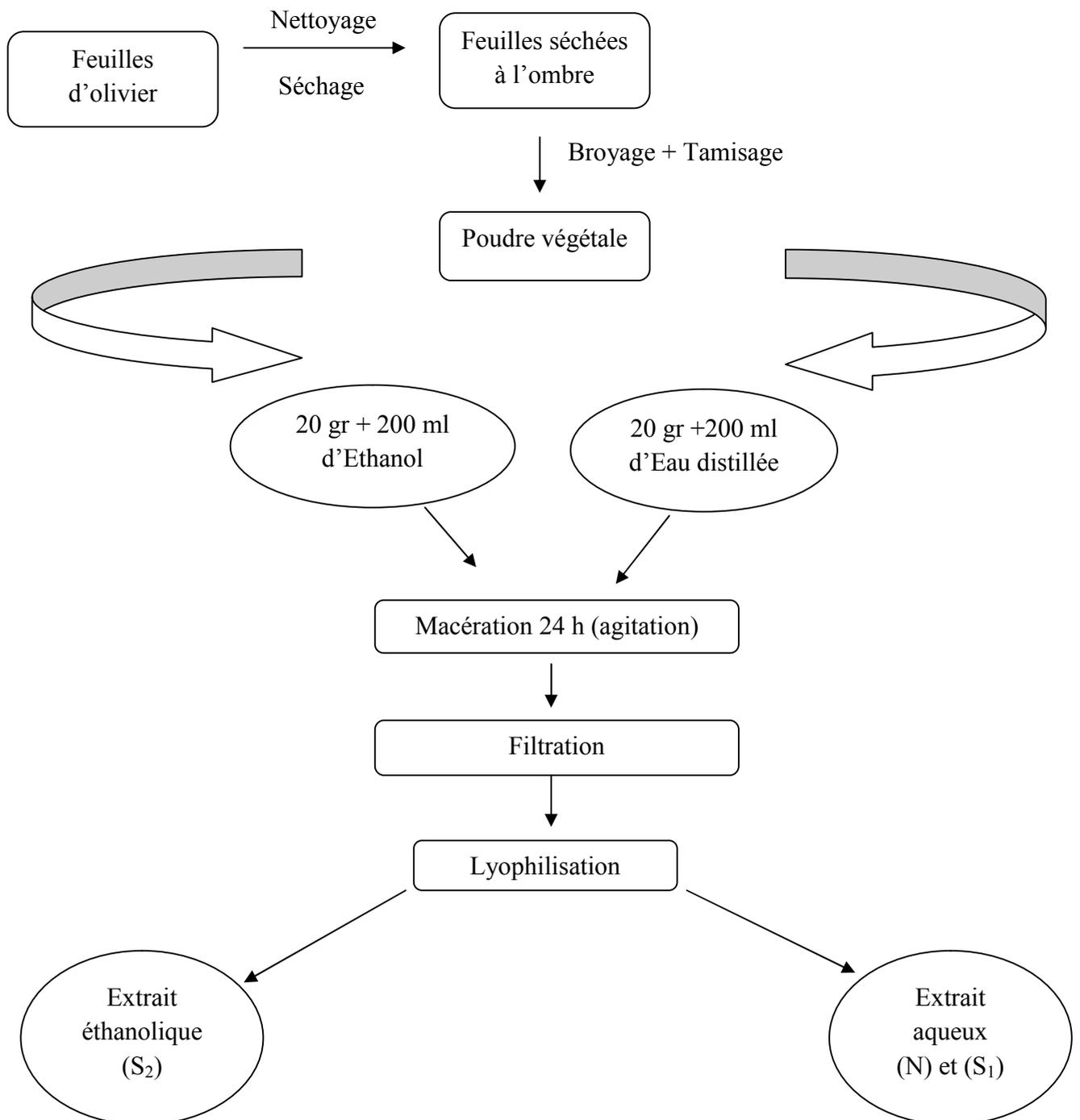
#### **I.2.1.1.Préparation de l'extrait aqueux (S<sub>1</sub>)**

Vingtgr de poudre fine dans 200 ml d'eau distillée sont soumis à une macération à l'obscurité à température ambiante pendant 24 heures.

#### **I.2.1.2.Préparation de l'extrait éthanolique (S<sub>2</sub>)**

Vingtgr de poudre végétale sont ajoutés à 200 ml du solvant complet d'éthanol, le mélange est suivi d'une macération à température ambiante pendant 24 heures.

La figure ci-après représente le schéma qui résume le protocole d'extraction suivi :



**Figure 6:** Schéma récapitulatif des étapes de l'extraction.

N (extrait aqueux issu d'*Olea europaea subsp. sylvestris*), S<sub>1</sub> (l'extrait aqueux issu d'*Olea europaea subsp. laperrinei*) et S<sub>2</sub> (l'extrait éthanologique issu d'*Olea europaea subsp. laperrinei*).

## I.2.2. Confirmation des souches bactériennes

Les bactéries testées sont représentées par des souches de références conservées dans des cryotubes et sont soumises à une identification préalable sur des milieux sélectifs suivis d'une coloration Gram

### I.2.2.1. Revivification

A partir des tubes de conservation, les souches sont prélevées à l'aide d'un écouvillon dans des tubes contenant le milieu BHIB (Annexe 1) préalablement étiqueté.

### I.2.2.2. Isolement

La purification pour chacune des souches se fait par ensemencement en stries sur des milieux sélectifs (Annexe 1), suivi d'une incubation de 24 h à 37 °C. Ainsi, nous avons utilisé :

Le milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus*, le milieu DCLS pour BLSE, la gélose lactosée au BCP pour *Escherichia coli*, la gélose Héктоen pour *Bacillus cereus* et le milieu King B pour *Pseudomonas aeruginosa*.

### I.2.2.3. Coloration et observation

A partir de chaque milieux sélectifs, préalablement ensemencés et incubés, on réalise un frottis en vue d'effectuer une coloration Gram (annexe 2); celle-ci permet de diviser le monde bactérien en deux groupes distincts et d'apprécier la pureté des souches bactériennes, sous microscope optique, avant toute identification (DELARRAS., 2007).

## I.2.3. Détermination de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits est déterminée par la méthode de diffusion sur gélose. Des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu MH sont solidifiées et séchées à une température de 25 °C pendant 30 min. Par la suite ils sont ensemencés uniformément à l'aide d'un écouvillon trempé dans la solution standardisée de l'inoculum ( $10^6$ - $10^8$  UFC/ml) selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM 2017). Au bout de 5 min des disques stériles de 6 mm de diamètre préparé à partir du papier wattman sont imbibés avec 15 µl de chaque extrait et sont déposés sur le milieu de culture.

**a) Préparation et standardisation de l'inoculum**

Les tests antimicrobiens doivent être réalisés sur des cultures jeunes de 12 à 18 heures en phase de croissance exponentielle.

Après incubation, les suspensions bactériennes sont préparées dans de l'eau physiologique stérile, le mélange bien homogénéisé est ajusté à  $10^8$  UFC/ml, fixée par la mesure de la densité optique (DO) entre 0,08 et 0.10 lue à une longueur d'onde de 625 nm (HERNANDEZ *et al.*, 2000; GREISIELE *et al.*, 2003) puis diluées à  $1/100^{\text{ème}}$ .

L'ensemencement se fait dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

**b) Préparation des extraits à tester**

Un gramme de chaque extrait de feuilles d'olivier est dissous dans 1 ml d'eau distillée.

**c) Aromatogramme (test de sensibilité)**

Pour déterminer l'efficacité antibactérienne des extraits de feuilles d'oliviers à l'égard des souches ciblées, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé : qui consiste en la détermination des diamètres des zones d'inhibition (GUPTA *et al.*, 2010 ; GULLUCE *et al.*, 2003).

Une suspension bactérienne âgée 18 à 24 heures de concentration cellulaire de  $10^7$  de chaque souche bactérienne est préparée avec de l'eau physiologique. Cette suspension est utilisée pour inoculer des boîtes de pétri contenant du milieu MH. Des disques stériles sont imprégnés de 15  $\mu$ l de chaque extrait, puis déposés délicatement sur le milieu de culture.

Le témoin négatif est représenté par de l'eau physiologique et le témoin positif est représenté par l'antibiotique CN. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition, formées autour des disques sont observées et mesurées à l'aide d'une règle. Chaque test est répété trois fois dans les mêmes conditions d'expérimentation et on procède à la moyenne.

**d) Lecture des résultats**

L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure des diamètres des zones claires (en millimètres) qui se forment autour des disques. Le diamètre de ces zones d'inhibition inclut le diamètre du disque.

### I.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La méthode de dilution en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice. La CMI est la plus faible concentration de l'extrait pour laquelle le micro-organisme testé ne montre aucune croissance.

Lors de notre travail, nous avons déterminé la CMI pour les extraits de feuilles d'oliviers vis-à-vis des souches qui ont montrés une sensibilité importante (diamètre d'inhibition important). Les CMI sont déterminées par la méthode de microdilutions en puits, en utilisant des microplaques contenant 96 puits selon ORHAN et *al.* (2005).

#### ▪ Préparation de la gamme de dilution

Nous avons réalisé une gamme de concentration allant de 31.25 mg/ml à 1000 mg/ml de progression géométrique de raison de 2 (Tab. 2). Les différentes dilutions de nos extraits sont réalisées dans du BMH (bouillon MH) stérile. L'étape de préparation de la gamme de dilution est illustrée dans le tableau VII qui suit :

**Tableau VI:** Préparation de la gamme de concentration des extraits a testé tableau illustrant la préparation de la gamme de dilution des extraits de feuilles d'oliviers.

| Série de puits                     | 1<br>(T-) | 2<br>(T+) | 3    | 4   | 5   | 6   | 7    | 8     |
|------------------------------------|-----------|-----------|------|-----|-----|-----|------|-------|
| Volume en BMH (µl)                 | 200       | 100       | 0    | 100 | 100 | 100 | 100  | 100   |
| Volume de l'échantillon (µl)       | 0         | 0         | 100  | 100 | 100 | 100 | 100  | 100   |
| Concentration de l'extrait (mg/ml) | 0         | 0         | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62.5 | 31.25 |

T- : témoin négatif et T+ : témoin positif.

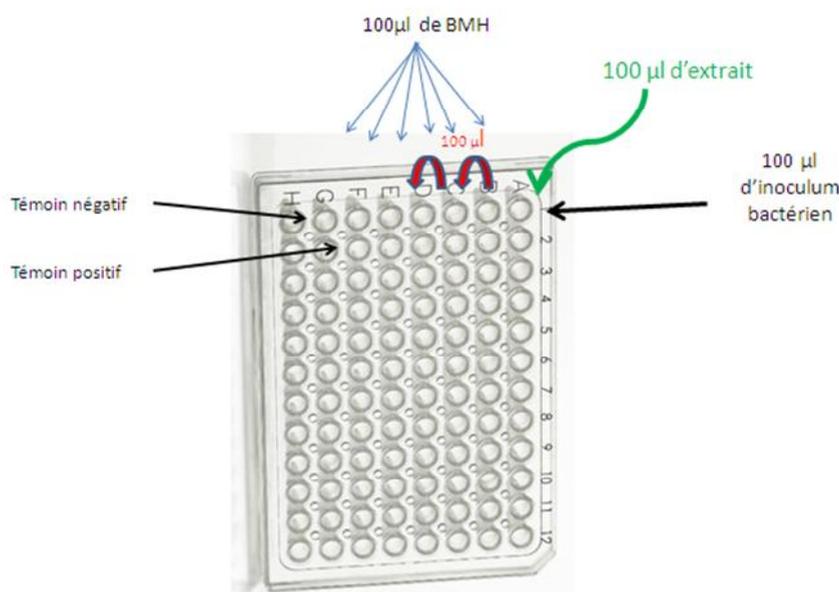
Dans la méthode de dilution en bouillon on distribue dans un premier temps 100 µl de BMH dans une série de puits allant du puits B jusqu'au G puis on rajoute dans un second temps 100µl d'extrait dans la première cupule (de A jusqu'au F) à partir de laquelle une série de dilution décroissante en demi a été réalisée dans le BMH (Tab. IV), ensuite chaque puits estensemencé avec 100 µl de l'inoculum bactérien ( $10^6$  UFC/ml) pour un volume total de 200µl. la série de dilution a été répétée 3 fois pour chaque extrait.

Les puits de la colonne H ont servi à contrôler d'une part la présence d'une éventuelle contamination du milieu de culture en déposant 200 µl de BMH (témoin négatif). Et les puits de

la colonne G ont servi à contrôler la qualité de croissance de la souche en ensemençant un puits comportant 100  $\mu$ l de BMH par 100  $\mu$ l de l'inoculum bactérien à 10<sup>6</sup> UFC/ml (témoin positif). Après 24 heures d'incubation à 37°C la plaque est portée sous agitation et les résultats des CMI sont appréciés avec un lecteur ELISA à une longueur d'onde de 560-630 nm.

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

- Forte inhibition : CMI inférieure à 500  $\mu$ g/ml
- Inhibition modérée : CMI varie de 600  $\mu$ g/ml à 1500  $\mu$ g/ml
- Faible inhibition : CMI supérieur à 1600  $\mu$ g/ml.



**Figure 7:** Schéma de la détermination des valeurs des CMI

### I.2.5. Détermination de l'effet antibactérien de l'association extrait-antibiotique

Des combinaisons d'extraits de plantes et d'antibiotiques sont testées selon la méthode du damier (ORHAN et *al.*, 2005). Nous avons utilisé des concentrations allant de 0  $\mu$ g/ml jusqu'à 1000  $\mu$ g/ml pour l'extrait de feuilles d'olivier et de 0  $\mu$ g/ml jusqu'à 200  $\mu$ g/ml pour la solution d'amoxicilline (AMX). On introduit verticalement 50  $\mu$ l des concentrations décroissantes en demi de l'extrait des feuilles et 50  $\mu$ l des concentrations décroissantes en demi de la solution d'antibiotique de façon que chaque puits contienne une combinaison de 50  $\mu$ l d'une concentration de la gamme de dilution de l'extrait et 50  $\mu$ l d'une concentration de la

gamme de dilution de l'antibiotique, ensuite 100 µl de l'inoculum bactérien à 10<sup>6</sup> UFC/ml a été apporté à tous les puits.

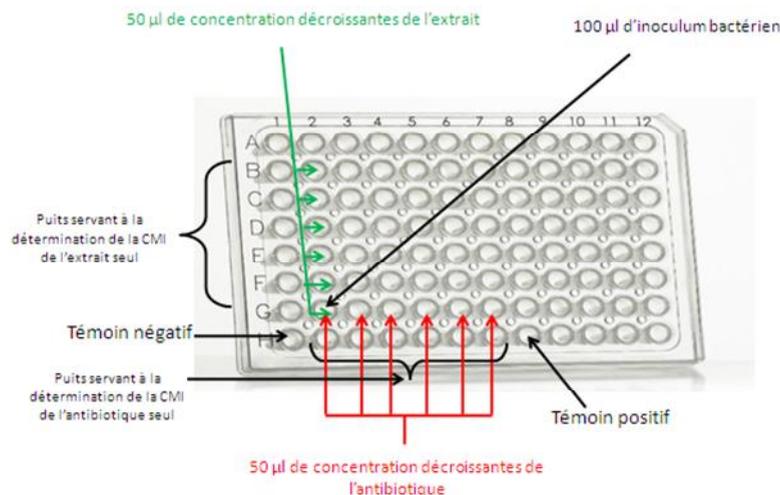
Après 24 heures d'incubation à 37°C la plaque est portée sous agitation et les résultats de la combinaison vis-à-vis de la souche sont appréciés avec un lecteur ELISA à une longueur d'onde de 560-630nm.

Les effets antimicrobiens résultant de l'association entre les extraits avec l'antibiotique, sont définis en réponse aux interactions entre les deux; en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FICI) ainsi ;

$$FICI = FIC A + FIC B$$

(FIC A= CMI de l'extrait dans la combinaison / la CMI de l'extrait seul. Cependant, FIC B= CMI de l'antibiotique dans la combinaison / la CMI de l'antibiotique seul).

- **Pas d'interaction** : l'activité de l'extrait n'est pas affectée par l'antibiotique : ( $0.5 < FICI < 4$ ).
- **Synergie**: l'effet est significativement supérieur à celui de l'extrait et de l'antibiotique étudiée isolément : ( $FICI \leq 0.5$ )
- **Antagoniste** : l'association diminue l'activité.  $FICI \geq 4$ .



**Figure 8:** Démarche de l'étude de l'association extrait-antibiotique.

### **I.2.6. Analyse statistique**

L'analyse statistique est réalisée par le logiciel Statistica version 7.1 en utilisant le test de l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur. Ce test nous permet de vérifier si les échantillons présentent des différences significatives.

S'il existe une différence significative, le test de l'ANOVA est suivi par le test complémentaire de Newman-Keuls afin d'établir les différents groupes homogènes. Le niveau de signification était de 5%.

# **Chapitre II :**

## **Résultats et discussion**

## II. Résultats et discussion

La méthode d'extraction la plus utilisée pour les composés phénolique 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, permet d'extraire le maximum de composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou leur modification; en effet une température peut provoqué l'inactivation des composants phénolique, leur rétractibilité dans le solvant, ainsi affecte leur quantification (HAGERMANN et *al.*, 2000).

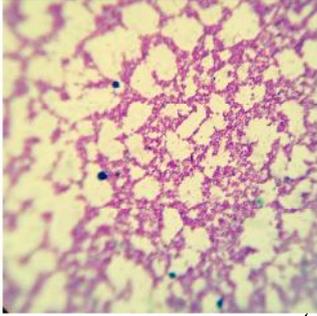
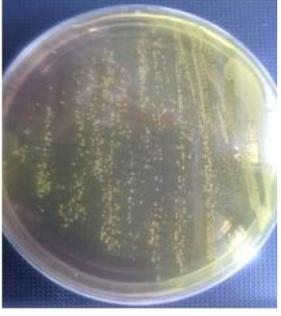
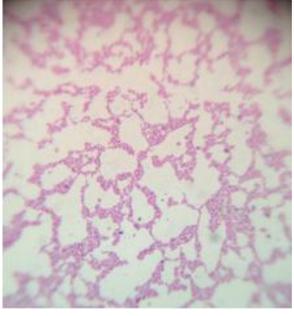
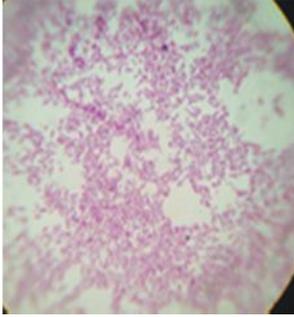
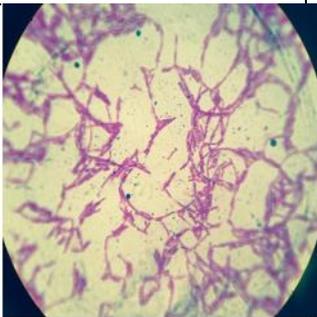
TEASIOLA-MARGARI et OKOGERI, (2001), ont démontré que la concentration des polyphénols dépend du solvant d'extraction et de la classe des polyphénols présents dans le matériel végétal.

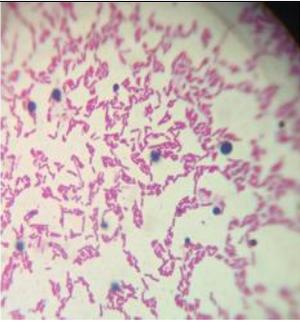
Notre extraction nous a permis d'obtenir trois extraits; l'extrait aqueux issu d'*Olea europaea subsp. sylvestris* (N), l'extrait aqueux issu d'*Olea europaea subsp. laperrinei* (S<sub>1</sub>) et l'extrait éthanolique issu d'*Olea europaea subsp. laperrinei* (S<sub>2</sub>).

### II.1. Test de confirmation des souches bactériennes

Le contrôle de la pureté des souches est fait par ré-isolément de chacune d'elles sur le milieu sélectif. Dans le but de vérifier les caractères bactériologiques des différentes souches bactériennes, des colorations Gram sont réalisés. Les résultats de l'aspect morphologique des cultures bactériennes et ceux de la coloration Gram sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau VII: Résultat de l'aspect morphologique des bactéries testées.

| Espèces utilisées    | Aspect macroscopique  | Aspect microscopique (GX1000)   | Gram | L'aspect morphologique   |
|----------------------|---|---|------|--|
| <i>S. aureus</i>     |    |    | +    | Ils apparaissent le plus souvent en amas « grappes de raisin ». cependant il peuvent également être isolés, par paires ou en très courte chaîne. |
| <i>E. coli</i>       |   |   | -    | Ce sont des Coccobacilles  |
| <i>P. aeruginosa</i> |  |  | -    | Ils apparaissent sous forme de bacilles souvent isolés   |
| <i>B. cereus</i>     |  |  | +    | Ce sont des bacilles habituellement observés en paires ou en chaînettes  |

|      |   |   |   |   |
|------|---|---|---|---|
| BLSE |  |  | - | Ils apparaissent sous forme de cocobacilles |
|------|---|---|---|---|

Les bactéries à Gram positif et négatif sont mises en évidence par la technique de coloration Gram qui nous a permis d'obtenir une couleur violet avec *S. aureus* et *B. cereus* (Gram +) et une coloration rose pour *E. coli*, *P. aeruginosa* et BLSE (Gram -). La différence de coloration selon EUZEBY (2007), repose sur les caractéristiques membranaires de la paroi : chez les bactéries à Gram négatif, la paroi riche en lipides, laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

Les résultats obtenus avec l'identification macroscopique nous a permis de constater que :

La culture de *S. aureus* sur milieu Chapman subit un virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune qui révèle l'acidification du milieu suite à la fermentation du mannitol par la bactérie ce qui confirme que la souche est bien *S. aureus* (NIEPCERON, 2013), la culture d'*E. coli* sur la gélose lactosée au BCP subit aussi un virage de l'indicateur de pH (le pourpre de bromocrésol) du bleu violacé au jaune qui révèle l'acidification du milieu suite à la fermentation du lactose ce qui confirme que la souche est bien ré-isolée (ANONYME 3) et la culture de *B. cereus* sur milieu Hektoen subit un virage l'indicateur (le bleu de bromothymol) du bleu vert au saumon qui révèle l'acidification du milieu suite à la fermentation des trois types de glucides (la salicine, le saccharose et le lactose). Cependant la culture de la BLSE sur milieu DCLS révèle l'observation de colonies pales, translucides ce qui confirme que le milieu utilisé nous a permis une meilleure mise en évidence de la BLSE.

L'observation d'une couleur vert sur le milieu King Brévèle la production de la pyoverdine du spécifiquement à *P. aeruginosa* cela confirme que notre souche a été bien ré-isolé (ANONYME 4).

## II.2.Détermination de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits des feuilles d'olivier vis-à-vis des souches bactériennes testées à savoir les Gram positifs (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), et les Gram négatifs (*Escherichia coli*, BLSE et *Pseudomonas aeruginosa*) se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné d'extraits de feuille d'olivier. Cette dernière est appréciée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle.

Ce travail vise à montrer la présence ou l'absence d'une activité antibactérienne des différents extraits utilisés, ensuite de comparer l'activité des deux extraits issus de la même espèce (S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>) et aussi les extraits aqueux issus de deux espèces différentes (S<sub>1</sub> et N).

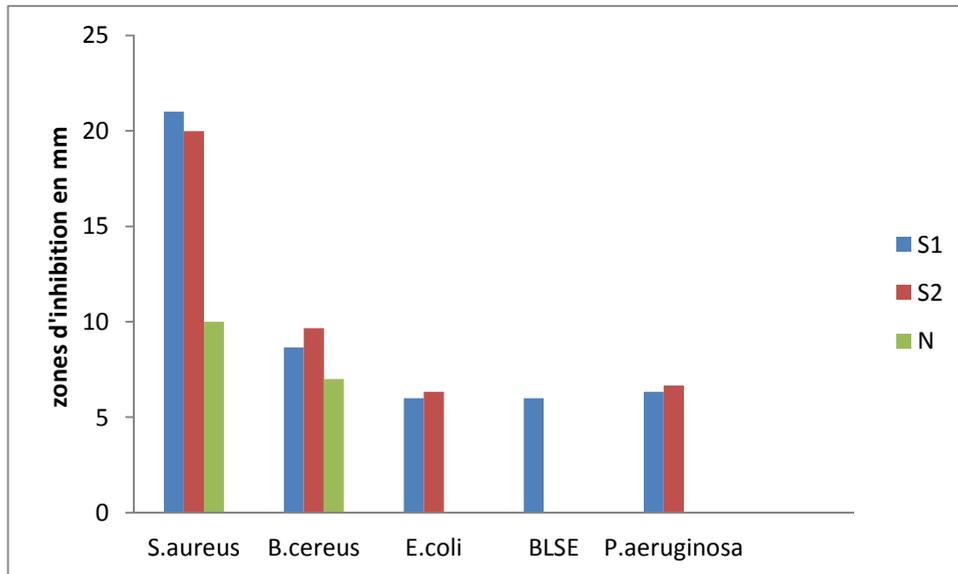
Les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les souches suscitées (Tab.VIII) varient de 0 à 21±1 mm selon la souche et les types d'extrait testés.

**Tableau VIII:** diamètres des zones d'inhibition (mm) de chaque extrait des feuilles d'olivier.

| Diamètres des zones en mm     |      |            |             |     |              |       |
|-------------------------------|------|------------|-------------|-----|--------------|-------|
| Différents extraits d'olivier |      |            |             |     |              |       |
| Espèces                       | Gram | S1         | S2          | N   | CN           | T (-) |
| <i>B. cereus</i>              | +    | 8.66±3.055 | 9.66±1.527  | 7±1 | 31±2.645     | 0     |
| <i>S. aureus</i>              | +    | 21±1       | 19.99±0.577 | 10  | 32.666±1.527 | 0     |
| <i>E. coli</i>                | -    | 6±0        | 6.33±0.577  | 0   | 29.333±2.516 | 0     |
| <i>P. aeruginosa</i>          | -    | 6.33±0.577 | 6.66±0.577  | 0   | 27.333±1.154 | 0     |
| BLSE                          | -    | 6±0        | 0           | 0   | 24±0         | 0     |

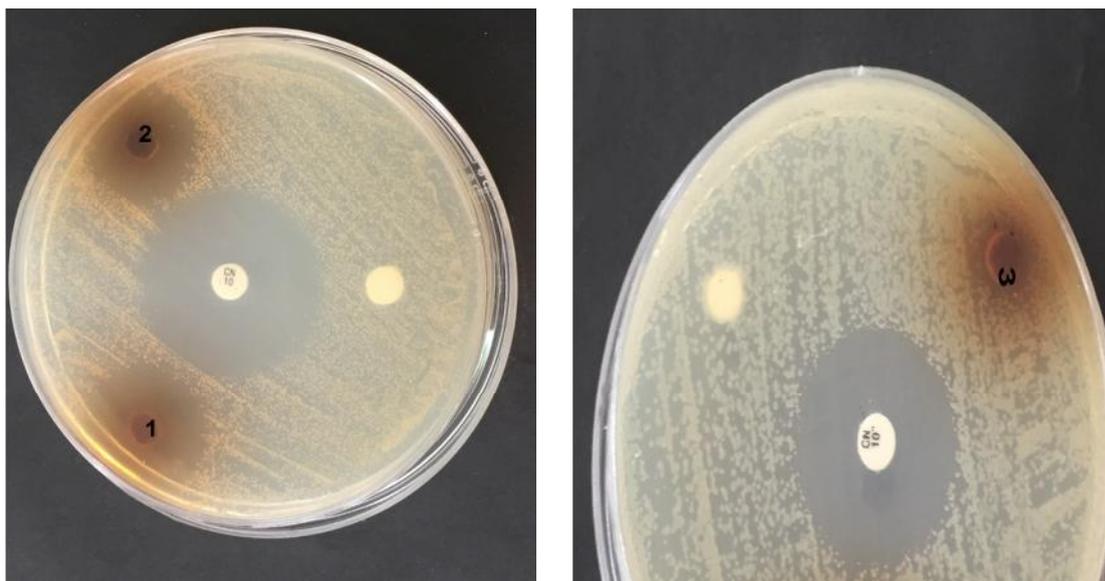
S<sub>1</sub>: extrait brut aqueux (*Olea europaea subsp. perrinei*), S<sub>2</sub>: extrait brut éthanolique (*Olea europaea subsp. perrinei*), N: extrait brut aqueux (*Olea europaea subsp. sylvestris*), CN: Gentamicine comme témoin positif et T (-), Eau distillé.

La figure (10) illustre les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les différents extraits (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et N), pour les différentes souches bactériennes testées.

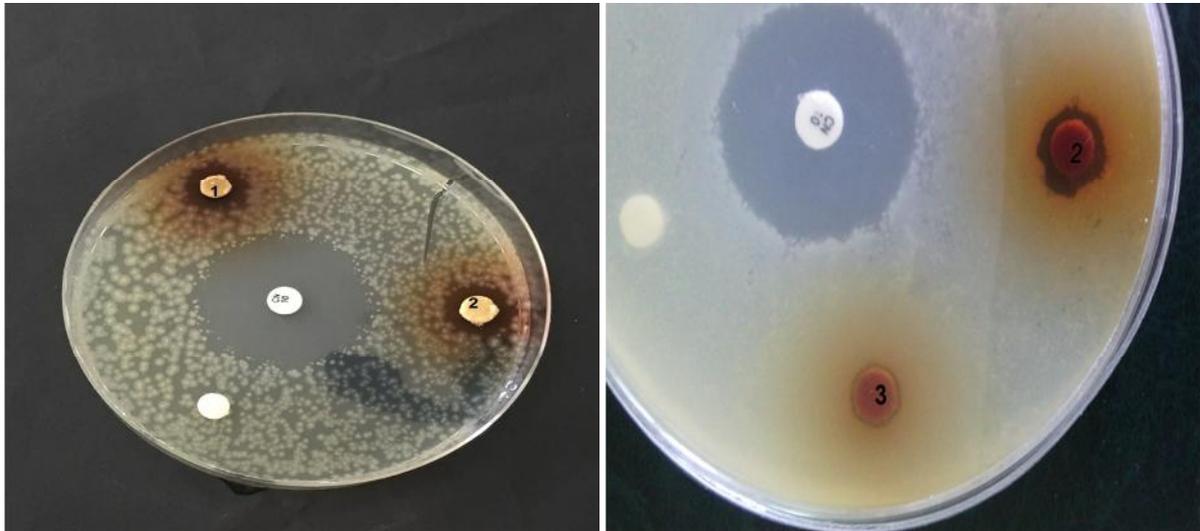


**Figure9:** Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm).

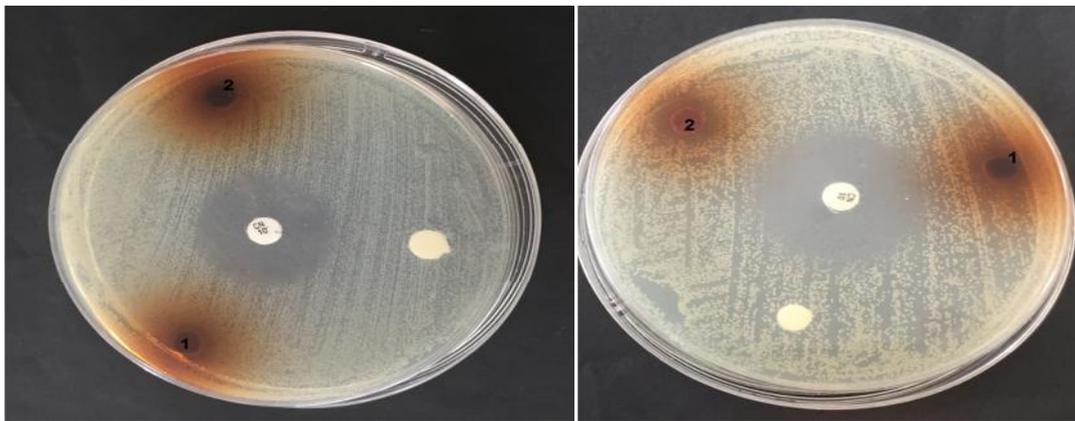
Les résultats des aromagrammes, pour la détermination des diamètres des zones d'inhibition, sont représentés sur la figure suivant



*Staphylococcus aureus* Mu50

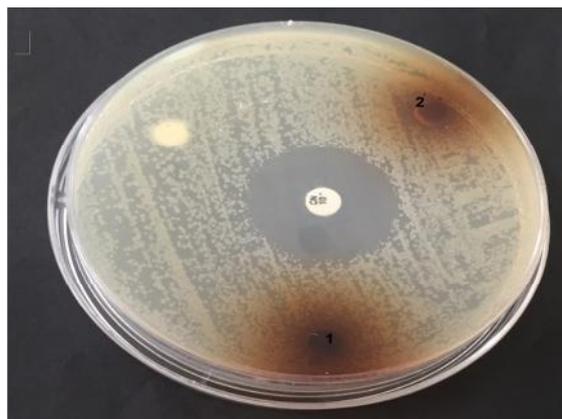


*Bacillus cereus* ATCC10876



BLSE

*Escherichia coli* ATCC25922



*Pseudomonas aeruginosa*

**Figure 10:** montrant les halos d'inhibitions provoquées par l'E.B (1: S1, 2: S2, 3: N) et les différentes combinaisons antibactériennes testées, réalisées par la méthode de diffusion sur gélose.

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibitions répertoriées dans les figures 10 et 11, que les zones d'inhibitions les plus importantes sont observées avec *S.aureus* suivi de *B.cereus*.

Nous avons noté que *E.coli* et *P. aeruginosa* sont résistantes à l'extrait N et la BLSE est résistante aux deux extraits N et S<sub>2</sub>.

On comparant l'activité des extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> on remarquera que l'extrait S<sub>2</sub> a une activité plus efficace que l'extrait S<sub>1</sub> sur *B.cereus*, *E.coli* et *P.aeruginosa*. Cela avère que la nature du solvant influence sur l'efficacité de l'activité antibactérienne.

Tandis que *S.aureus* présente une sensibilité plus importante vis-à-vis de S<sub>1</sub>, on effectue le diamètre d'inhibition correspond à une valeur de (21±1) mm alors que dans l'extrait S<sub>2</sub> le diamètre d'inhibition correspond à une valeur de (19.99±0.577) mm. Cette observation est validée par notre test statistique qui conclut qu'il existe une différence significative entre S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>.

En effet, HAYOUNI *et al.* (2007) ont montré que la méthode d'extraction et la nature du solvant peuvent influencer l'activité antimicrobienne des composés phénoliques des plantes. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

Mais lorsque on compare l'activité des deux extraits S<sub>1</sub> et N, on notera que l'extrait S<sub>1</sub> présente une activité plus efficace que l'extrait N. Cela démontre que la répartition géographique et la période de la récolte des feuilles influence aussi sur l'efficacité de l'activité antibactérienne des extraits.

BOUDHRIOUA *et al.* (2009); VASILEIOS *et al.* (2010), ont rapporté que les variations en teneur de polyphénols est dépendante des conditions climatiques et géographiques, des conditions de culture et le degré de maturité, mais aussi de l'état physiologique et l'âge de la plante étudié (DE LEONARDIS *et al.*, 2008).

D'après les résultats illustrés (tab. VIII) on remarque qu'il existe des variations de sensibilité des bactéries testées selon les extraits bruts:

*P.aeruginosa* (Gram-), *E. coli* (Gram-) et BLSE (Gram -) sont non sensible aux extraits comparés à *S.aureus* (Gram<sup>+</sup>) et *B.cereus* (Gram<sup>+</sup>). D'après ces observations, il semble que nos extraits sont plus efficaces sur les Gram<sup>+</sup> que les Gram<sup>-</sup>

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

En ce que concerne *P. aeruginosa*, elle est connue pour sa résistance à certains antibiotiques ainsi qu'à une grande variété d'agents chimique (MARTIN *et al.*, 1993), soit de façon native (par l'expression constitutive de  $\beta$ -lactamases et /ou de pompes à efflux, ou en raison d'une faible perméabilité de la membrane externe), soit suite à l'exposition aux antibiotiques (acquisition de gènes codant pour des enzymes détruisant les antibiotique) (MESAROS *et al.*, 2007).

Pour TEPE *et al.* (2004), les bactéries à Gram négatif, sont généralement résistantes aux agents antimicrobiens 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.

Selon SHANet *al.* (2007), la membrane des bactéries 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.

Les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques, cela est dû principalement aux peptidoglycanes constituant la paroi. En effet, les bactéries perdent leur rigidité et se lysent sous leur pression osmotique interne qui rompt leur membrane cytoplasmique (ATHAMENA *etal.*, 2010).

Confirmant les rapports précédents, il a été constaté que la force et le spectre d'activité antimicrobienne varient selon le type d'extrait et le Gram des bactéries. Cependant la résistance des bactéries Gram négatif, peut s'expliquer par la configuration spatiale des molécules qui empêchent de traverser les protéines de transport (porine) de la membrane externe, et ne peuvent pas donc atteindre le peptidoglycane de la paroi bactérienne (BOUSSEBOUA, 2001; PAGES *et al.*, 2003).

Les propriétés antimicrobiennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau de la paroi bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires ; dégradation de la paroi cellulaire (HELANDER *et al.*, 1989; ULTEE *et al.*, 2001), dommage des protéines membranaires (JUVEN *et al.*, 1994; ULTEE *et al.*, 2001), fuite de contenu des cellules (OOSTERHAVEN *et al.*, 1995; LAMBERT *et al.*, 2001), coagulation du cytoplasme et l'épuisement de force motrice des porons (ULTEE et SMID, 2001).

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

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

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

COWAN (1999) a rapporté aussi que les différentes classes de polyphénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes peuvent augmenter la toxicité des extraits envers les microorganismes. Cette toxicité est fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité.

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est très complexe. Parmi les hypothèses avancées nous citons, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (HARRAR, 2012).

L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (DHAOUADI *et al.*, 2010).

Un grand nombre d'auteurs a rapporté que l'oleuropéine est parmi les composés phénoliques des feuilles d'oliviers le plus puissant pour les propriétés antimicrobiennes.

TASSOU et NYCHAS, (1994) ont déjà confirmé la résistance d'*E.coli* envers l'oleuropéine purifiée.

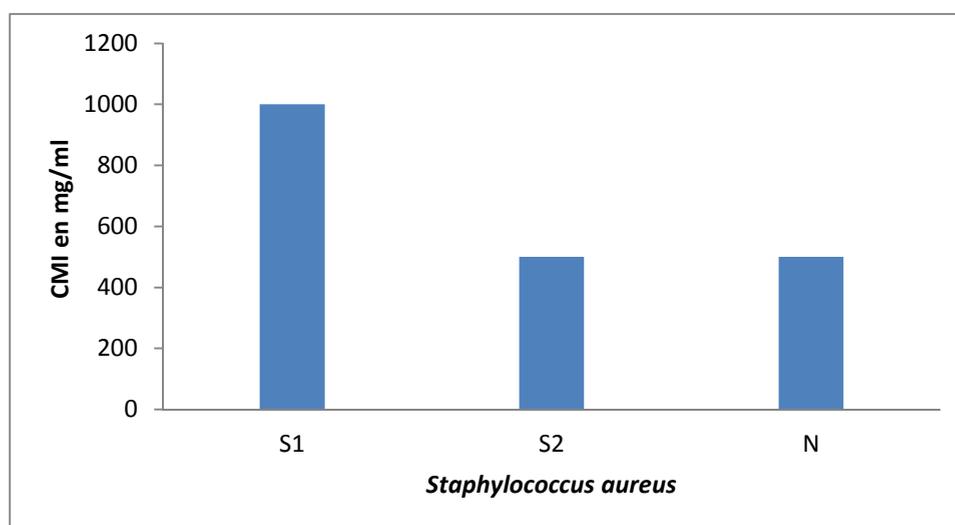
D'autres études ont rapporté que les huiles essentielles ont la plus grande efficacité dans le traitement des pathologies infectieuses (RIOS et RECIO, 2005). On peut citer l'exemple des travaux de (SATRANI et al., 2007), qui a pu évaluer l'effet antimicrobien d'huile essentielle extrait à partir de l'Astéracée (*Clandanthusmixtus*) contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* et les champignons *Penicillium parasiticus*, *Aspergillus niger* et *trametes pini*.

### II.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les CMI sont déterminées vis-à-vis des bactéries testées par la méthode de microdilution sur microplaques à 96 puits. Les résultats des CMI des extraits S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et N sur *S. aureus* sont représentés dans le tableau IX et la figure 12 qui suivent :

**Tableau IX:** valeurs des CMI obtenues avec les trois extraits bruts vis-à-vis de *S. aureus*.

| Souche                                | CMI en mg/ml      |                   |                   |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                       | N                 | S <sub>1</sub>    | S <sub>2</sub>    |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>MU 50 | 500               | 1000              | 500               |
| <b>Classification</b>                 | Faible inhibition | Faible inhibition | Faible inhibition |



**Figure 11:** Représentation graphique des valeurs des CMI retenues sur *S. aureus* avec les trois extraits S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et N.

Selon les résultats illustrés (Fig. 12), lors de la comparaison des CMI des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> on notera que S<sub>2</sub> présente la plus faible concentration inhibitrice pour *S. aureus* qui est de 500 mg/ml, tandis que la comparaison des CMI des deux extraits S<sub>1</sub> et N démontre que l'extrait N présente la plus faible concentration inhibitrice qui est de 500 mg/ml. L'extrait S<sub>1</sub> a présenté une CMI 1000 mg/ml.

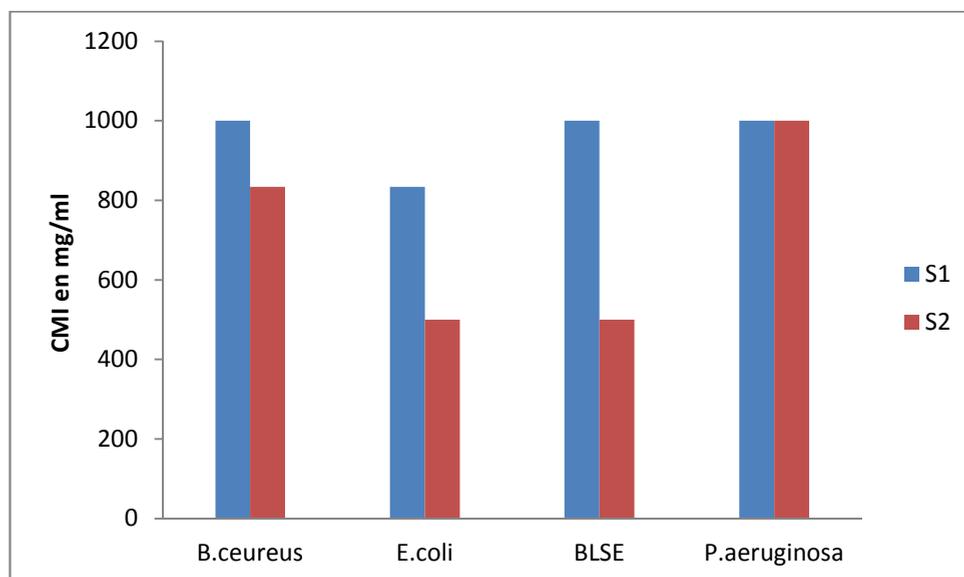
D'après les résultats illustrés dans la figure 6 l'extrait Na présenté une zone d'inhibition de 10 mm avec *S. aureus* et de (7±1) mm avec *B. cereus*, il s'est avéré que *S. aureus* est plus sensible vis-à-vis de l'extrait N. C'est la raison pour la quelle on a écarté *B. cereus*.

Les valeurs des CMI des extrait S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> sur les autre souches bactéries testé qu'on a testé sont représenté dans le tableau X et par la figure 13, ainsi ;

**Tableau X:** Valeurs des CMI obtenues avec les extraits bruts S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et BLSE.

| Souches              | CMI mg/ml      |                | Classification    |
|----------------------|----------------|----------------|-------------------|
|                      | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> |                   |
| <i>B. cereus</i>     | 1000           | 833,3          | Faible inhibition |
| <i>E. coli</i>       | 833,3          | 500            | Faible inhibition |
| <i>P. aeruginosa</i> | 1000           | 1000           | Faible inhibition |
| BLSE                 | 1000           | 500            | Faible inhibition |

La figure 13 illustre les résultats des CMI des extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> obtenues avec *B.cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et BLSE.



**Figure 12:** Représentation graphique des valeurs des CMI des extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>.

Il ressort de ces résultats (Fig. 13) que la plus faible CMI est obtenue avec S<sub>2</sub> sur *E.coli* et BLSE (500 mg/ml), tandis que les plus hautes CMI ont été obtenues avec les extraits S<sub>1</sub> sur *B. cereus*, *P. aeruginosa* et BLSE et S<sub>2</sub> sur *P. aeruginosa* (1000 mg/ml).

Cependant et selon la classification proposé par ALIGANNIS et ses collaborateurs (2001); FABRI et *al.* (2009), les trois extraits présentent une faible activité antibactérienne puisque les valeurs enregistrées sont toutes supérieures à 1600 µg/ml sur les cinq souches testées.

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

Selon les études *in vitro* réalisées par DJENANE et *al.* (2012), les valeurs de CMI indiquent que l'extrait polyphénolique est plus efficace que l'extrait brut. L'extrait polyphénolique qui a provoqué d'importantes zones d'inhibition vis-à-vis de *S. aureus* est celui qui a donné la plus faible valeur de CMI (0,05%). Il serait donc probable que les résultats obtenus dans notre travail découlent de l'utilisation des extraits bruts qui sont probablement moins efficace.

#### II.4. Détermination de l'effet de l'association extrait-antibiotique

Lacombinaison entre les extraits (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et N) et l'amoxicilline est testée par la méthode du damier sur *S. aureus* pour déterminer s'il existe une éventuelle synergie.

Notre choix pour l'amoxicilline n'est pas fortuit, mais c'est plus tôt par rapport à la sensibilité que présente *S. aureus* vis-à-vis de ce dernier.

Ainsi le tableau XI représente les résultats obtenus de la combinaison de S<sub>1</sub> et l'amoxicilline.

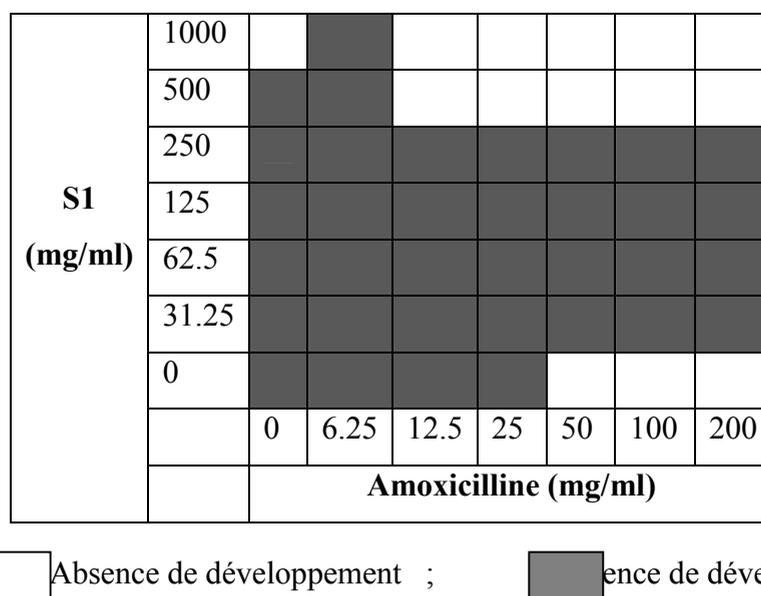
**Tableau XI:** activité antibactérienne de l'association S<sub>1</sub>-amoxicilline

|  |                                 |           |           |           |           |           |           |           |                                 |
|--|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------------------|
| <b>Concentration de l'extrait mg/ml</b>      | 1000                            | 0.00<br>1 | 0.17<br>7 | 0.02<br>6 | -         | 0.00<br>8 | 0.00<br>1 | 0.00<br>1 | <b>T<sup>+</sup>=0.04<br/>6</b> |
|  | 500                             | 0.05<br>0 | 0.21<br>7 | 0.01<br>8 | -         | 0.01<br>8 | -         | 0.02<br>6 |                                 |
|  | 250                             | 0.21<br>2 | 0.43<br>9 | 0.21<br>2 | 0.70<br>1 | 0.15<br>3 | 0.25<br>6 | 0.27<br>7 |                                 |
|  | 125                             | 0.13<br>4 | 0.59<br>6 | 0.39<br>9 | 0.71<br>1 | 0.38<br>7 | 0.49<br>9 | 0.56<br>0 |                                 |
|  | 62.5                            | 0.36<br>6 | 0.42<br>9 | 0.43<br>7 | 0.48<br>9 | 0.44<br>8 | 0.46<br>1 | 0.45<br>4 |                                 |
|  | 31.25                           | 0.43<br>1 | 0.12<br>8 | 0.14<br>8 | 0.11<br>2 | 0.43<br>0 | 0.44<br>8 | 0.43<br>8 |                                 |
|  | 0                               | 0.04<br>6 | 0.12<br>7 | 0.10<br>6 | 0.09<br>7 | 0.02<br>0 | 0.01<br>9 | 0.01<br>5 |                                 |
|  | <b>T<sup>-</sup>=0.03<br/>6</b> | 0         | 6.25      | 12.5      | 25        | 50        | 100       | 200       |                                 |
| <b>concentration de l'antibiotique mg/ml</b> |                                 |           |           |           |           |           |           |           |                                 |

T<sup>-</sup> : Témoin négatif, T<sup>+</sup> : Témoin positif

Les valeurs représentées (Tab. XI), (Tab. XII) et (Tab. XX) sont le résultat de la lecture qu'on a obtenue à l'aide du lecteur ELISA. Les cases contenant des valeurs supérieures au T<sup>-</sup> seront en gris (Fig. 14), (Fig. 15) et (Fig. 16) ce qui nous permet d'avoir un tableau à damier.

La figure 14 démontre l'association de l'extrait S<sub>1</sub> et l'amoxicilline, qui nous a permis de calculer le FICI;



**Figure 13:** La méthode du tableau à damier montre l'effet de la combinaison de S<sub>1</sub> et l'amoxicilline sur *S.aureus*.

D'après les résultats obtenus (Fig. 14) on calcule une valeur de FICI de 0.75 lors de l'étude de l'association entre l'extrait S<sub>1</sub> et l'amoxicilline, cela nous a permis de conclure qu'il n'y a pas d'interactions sur *S.aureus*.

**Tableau XII:** Activité antibactérienne de l'association N-amoxicilline

|   |       |       |       |       |       |       |       |       |                            |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------------|
| <b>Concentration<br/>d'extrait en<br/>mg/ml</b> | 1000  | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.005 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | <b>T<sup>+</sup>=0.046</b> |
|   | 500   | 0.007 | 0.059 | 0.003 | 0.015 | 0.012 | -     | 0.001 |                            |
|   | 250   | 0.173 | 0.174 | 0.150 | 0.172 | 0.198 | 0.157 | 0.184 |                            |
|   | 125   | 0.162 | 0.591 | 0.546 | 0.609 | 0.529 | 0.572 | 0.606 |                            |
|   | 62.5  | 0.225 | 0.224 | 0.227 | 0.235 | 0.229 | 0.231 | 0.238 |                            |
|   | 31.25 | 0.587 | 0.162 | 0.168 | 0.172 | 0.168 | 0.174 | 0.178 |                            |

|  |                 |  |       |       |       |       |       |       |  |
|--|-----------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
|  | 0               | 0.046  | 0.127 | 0.106 | 0.090 | 0.020 | 0.019 | 0.015 |  |
|  | $T^-$<br>=0.036 | 0  | 6.25  | 12.5  | 25    | 50    | 100   | 200   |  |
|  |                 | <b>Concentration d'antibiotique en mg/ml</b> |       |       |       |       |       |       |  |

La combinaison de l'effet de l'extrait N et l'amoxicilline est démontré dans la figure 15 nous permis decalculer le FICI;

|                      |       |                             |      |      |    |    |     |     |
|----------------------|-------|-----------------------------|------|------|----|----|-----|-----|
| <b>N<br/>(mg/ml)</b> | 1000  |                             |      |      |    |    |     |     |
|                      | 500   |                             |      |      |    |    |     |     |
|                      | 250   |                             |      |      |    |    |     |     |
|                      | 125   |                             |      |      |    |    |     |     |
|                      | 62.5  |                             |      |      |    |    |     |     |
|                      | 31.25 |                             |      |      |    |    |     |     |
|                      | 0     |                             |      |      |    |    |     |     |
|                      |       | 0                           | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
|                      |       | <b>Amoxicilline (mg/ml)</b> |      |      |    |    |     |     |

**Figure 14:** la méthode du tableau à damier montre l'effet de la combinaison de N et l'amoxicilline sur *S.aureus*.

D'après les résultats obtenues (Fig. 15) on calcule une valeur de FICI de 1.25 lors de l'étude de la synergie entre l'extrait N et l'amoxicilline, cela nous permis de conclure qu'il ya pas d'interactions sur *S.aureus*.

**Tableau XX:** activité antibactérienne de l'association S<sub>2</sub>-amoxicilline :

|   |  |       |       |       |       |       |       |       |             |
|---|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| <b>Concentration d'extrait en mg/ml</b> | 1000   | 0.021 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.017 | $T^+=0.046$ |
|   | 500  | 0.043 | 0.014 | 0.001 | -     | 0.001 | 0.035 | 0.028 |             |
|   | 250  | 0.099 | 0.085 | 0.098 | 0.104 | 0.111 | 0.118 | 0.126 |             |
|   | 125  | 0.097 | 0.293 | 0.382 | 0.417 | 0.386 | 0.421 | 0.438 |             |
|   | 62.5   | 0.137 | 0.130 | 0.148 | 0.187 | 0.222 | 0.225 | 0.232 |             |
|   | 31.25  | 0.397 | 0.085 | 0.088 | 0.090 | 0.137 | 0.132 | 0.    |             |
|   | 0  | 0.046 | 0.129 | 0.106 | 0.097 | 0.020 | 0.019 | 0.015 |             |
|   | $T^-$<br>=0.036                              | 0     | 6.25  | 12.5  | 25    | 50    | 100   | 200   |             |
|   | <b>Concentration d'antibiotique en mg/ml</b> |       |       |       |       |       |       |       |             |

La figure 16suivant illustre l'effet de la combinaison de l'extrait S<sub>2</sub> et l'amoxicilline qui nous permis de calculer FICI ;

|                                  |       |                             |      |      |    |    |     |     |
|----------------------------------|-------|-----------------------------|------|------|----|----|-----|-----|
| <b>S<sub>2</sub><br/>(mg/ml)</b> | 1000  |                             |      |      |    |    |     |     |
|                                  | 500   |                             |      |      |    |    |     |     |
|                                  | 250   |                             |      |      |    |    |     |     |
|                                  | 125   |                             |      |      |    |    |     |     |
|                                  | 62.5  |                             |      |      |    |    |     |     |
|                                  | 31.25 |                             |      |      |    |    |     |     |
|                                  | 0     |                             |      |      |    |    |     |     |
|                                  |       | 0                           | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
|                                  |       | <b>Amoxicilline (mg/ml)</b> |      |      |    |    |     |     |

**Figure 15:** La méthode du tableau à damier montre l'effet de la combinaison de S<sub>2</sub> et l'amoxicilline sur *S.aureus*.

Selon les résultats obtenues nous avons une FICI de 1.125 lors de l'étude de la synergie entre l'extrait S<sub>2</sub> et l'amoxicilline, cela nous permis de conclure qu'il ya pas d'interactions sur *S.aureus*.

Il s'est avéré que le FICI (fractional inhibitory concentration index) de tous les extraits est compris entre  $0.5 < FICI < 4$ , on conclue donc qu'il n'y a pas d'interaction entre les extraits et l'antibiotique seul. Cependant on comparant les CMI de l'antibiotique et qui était à une valeur de 50 mg/ml tout seul pour atteindre les valeurs de 12.5 mg/ml dans la combinaison avec les extraits S<sub>1</sub> et Net 6.25 mg/ml dans la combinaison avec S<sub>2</sub>.

Ces résultats ont été prouvés par plusieurs travaux qui ont montré la possibilité de l'association des extraits de plantes avec des antibiotiques dans le but d'augmenter leurs effets antimicrobiens et de réduire leurs concentrations, ainsi diminuer les effets secondaires et indésirables des antibiotiques (SHIN et KANG, 2003 ; ROSATO et al., 2008).

Selon SAFFIDINE (2015), les mécanismes par lesquels les composés phénoliques agissent en synergie avec les antibiotiques ne sont pas encore élucidés, mais on observe un effet positif et une augmentation de l'activité antibactérienne des composés flavoniques combinés aux antibiotiques. Ce qui suggérerait une complémentarité entre deux composés.

Dans notre études, Il serait donc intéressant d'extraire et de purifié les polyphénols constituants les feuilles d'olivier ensuite de tester l'effet de la combinaison de ces polyphénols et un antibiotique donné sur plusieurs espèces bactérienne. Ainsi ; il serait probable d'avoir des interactions synergique entre les polyphénols et l'antibiotique.

# **Conclusion**

## Conclusion et perspectives

---

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la comparaison des effets antibactériens de deux extraits bruts issus d'*Olea europaea laperrinei* l'un est aqueux (extrait S<sub>1</sub>) et l'autre est éthanolique (extrait S<sub>2</sub>) et la comparaison de l'activité antibactérienne de deux extraits bruts aqueux issus de deux sous espèces différentes *Olea europaea laperrinei* (extrait S<sub>2</sub>) et *Olea europaea sylvestris* (extrait N).

L'évolution qualitative de cet effet antibactérien montre que c'est l'extrait aqueux de l'olivier de Laperrine (S<sub>1</sub>) qui présente la zone d'inhibition la plus intéressante mesurée sur *S. aureus* avec une valeur moyenne de 21±1 mm, tandis que l'extrait éthanolique (S<sub>2</sub>) a présenté une zone d'inhibition de 19.99±0.577 mm sur la même souche bactérienne.

Cependant l'extrait N a manifesté une zone d'inhibitions de 10 mm sur *S. aureus*. Par ailleurs l'ensemble des souches testées étaient résistantes à ce dernier sauf *B. cereus* avec un diamètre moyen de 7±1 mm.

L'activité bactéricide des extraits testés ni observée que sur les bactéries Gram positif ayant fait l'objet de notre expérimentation, les bactéries Gram négatif se sont toutes avérées résistantes aux trois extraits.

Les valeurs des CMI quant à elles correspondent à 500 mg/ml dans le cas de l'extrait S<sub>2</sub>, 833.3 mg/ml dans le cas de l'extrait S<sub>1</sub> et 500 mg/ml dans le cas de l'extrait N.

D'après les résultats obtenus lors de l'étude de l'association entre les extraits et l'antibiotique, il s'est avéré qu'il n'y a pas d'interaction entre ces extraits et cet antibiotique sur *S. aureus*.

Il serait intéressant pour compléter cette étude de;

- Une évaluation de l'activité antioxydants et préciser les molécules responsables ;
- Approfondir l'étude phytochimiques afin de déterminer qualitativement et quantitativement les molécules biactives présentes ;
- Une optimisation des différentes extractions ;
- Elargir l'étude de l'activité antimicrobienne sur d'autres souches bactériennes pathogènes et d'autres microorganismes notamment les champignons et les parasites.

**Références**

**bibliographiques**

## Annexes

---

### Annexe 01 : Composition des solutions et milieux de culture utilisés

- **Eau physiologique stérile** (composition en g/l)
  - Chlorure de sodium(NaCl).....9g.
  - Eau distillée.....1000ml.
  - pH=7.
  - stérilisation à 120°C/15min.
  
- **Gélose Mueller Hinton** (composition en g/l)
  - Extrait de viande .....3g
  - Amidon .....1,5g
  - Hydrolysate acide de caséine ..... 17,5g
  - Agar.....18g
  - pH = 7,4
  
- **Bouillon BRAIN HEART INFUSION (BHIB) CM 225** (composition en g/l)
  - Protéase-peptone.....10g
  - Infusion de cervelle de veau.....12,5g
  - Infusion de cœur de bœuf.....5g
  - Chlorure de sodium.....5g
  - Phosphate disodique.....2,5g
  - Glucose.....2g
  - Eau distillée qsp.....1000 ml
  - pH=7,4
  - Stérilisation à 121 °C/15min.
  
- **Gélose chapman**
  - Peptone.....10.0g
  - Extrait de viande de bœuf.....01.5g
  - Chlorure de sodium.....75.0g
  - Mannitol.....10.0g
  - Rouge de phénol.....0.025g

## Annexes

---

- Agar.....15.0g
- Eau distillée.....1000 ml
- pH =7.4
  
- **Gélose Hektoen**
- Peptone pepsique de viande.....12.0g
- Extrait autolytique de levure.....03.0g
- Lactose.....12.0g
- Saccharose.....12.0g
- Salicine.....02.0g
- Sels biliaire.....9.0g
- Chlorure de sodium.....05.0g
- Thiosulfate de sodium.....05.0g
- Citrate ferrique ammoniacal.....01.5g
- Bleu de bromothymol.....65.0mg
- Fuschine acide.....40.0mg
- Agar.....13.5g
- pH=7.6
  
- **gélose King B**
- Peptone.....20.0g
- Glycérol.....10.0ml
- Phosphate dipotassique.....1.5g
- Sulfate de magnésium.....1.5g
- Agar .....15.0g
- pH=7.2.
  
- **Gélose DCLS**
- Mélange de peptones .....15.0g
- Extrait de bœuf.....5.5g
- Thiosulfate de sodium.....1.25g
- Désoxycholate de sodium.....1.2g

## Annexes

---

- Citrate de sodium.....7.5g
- Saccharose.....5.0g
- Lactose.....5.0g
- Rouge neutre.....0.03g
- Agar .....12.0g
- pH=7.3
  
- **Bouillon lactosé au BCP**
- Peptone .....5.0g
- Extrait de viande de bœuf.....3.0g
- Lactose.....10.0g
- Pourpre de bromocrésol.....25mg
- Agar.....15g
- pH=6.8.

### Annexe 02 : Coloration de Gram

#### - **Étalement**

Déposer une colonie bactérienne sur une lame en verre préalablement dégraissée qui contient une goutte d'eau, étalée en une couche mince et homogène.

#### - **Séchage**

Faire passer le frottis au dessus de la flamme.

#### - **Fixation**

Le frottis est fixé par la chaleur par le passage 2 à 3 fois dans la flamme.

#### ➤ **Coloration du frottis**

- Recouvrir le frottis avec le violet de Gentiane qu'on laisse agir 1 min ;
- Rejeter le colorant et recouvrir avec le Lugol qu'on laisse agir 45 s ;
- Rejeter le Lugol et le recouvrir une deuxième fois et laisser agir 45 s ;
- Décolorer à l'alcool pendant 30 s ;
- Rincer à l'eau courante pour neutraliser l'action de l'alcool ;
- Recouvrir le frottis avec la Fushine et laisser agir 1 mn ;
- Lavage à l'eau ;
- Séchage et observation à l'immersion (G×1000).

## Annexes

---

### Lecture

- Les bactéries Gram+ apparaissent en rose.

Les bactéries Gram- apparaissent en violet.

### Annexe 03 : Différents outils et appareils utilisés dans notre expérimentation

| Outils   | Appareils   | ANTIBIOTIQUE |
|--|---|--------------|
| Boîtes de Pétri                                      | Etuve (Mettler, Allemagne)<br>Etuve : BINDER. Allemagne),                       | Gentamicine  |
| Perforateur  | Vortex (Heidolph, Allemagne)  | Amoxicilline |
| Barreaux magnétiques                                 | Bec Bunsen  |              |
| Pipettes Pasteur                                     | Autoclave (pbi international,<br>Italie)  |              |
| Ecouvillons  | Réfrigérateur (ENIEM, Algérie)  |              |
| Tubes à hémolyse                                     | Bain-Marie (Mettler,<br>Allemagne)  |              |
| Anse   | Broyeur électrique  |              |
| Micropipette   | Spectrophotomètre : Vis-7220G.<br>Biotech Engineering.<br>Management CO.LTD (UK |              |
| Embouts  | Balance de précision : KERN<br>770. Allemagne.                                  |              |
| Flacons  | Lecteur ELISA   |              |
| microplaques   | Lyophilisateur  |              |
| Spatules, pinces                                     | Four Pasteur : BINDER.<br>Allemagne.  |              |
| Cuves de spectrophotomètre                           | Agitateur à barreau magnétique<br>non chauffant : GERHARDT.<br>Allemagne.       |              |
| Verrerie : Flacons en verre,<br>Becher, Erlen Meyer, | Centrifugeuse : HettichUniversal<br>/ K2S.                                      |              |

## Annexes

|  |  |  |
|--|--|--|
| Cristallisoirs, Entonnoirs, Tubes<br>à essai |  |  |
| Papier wattman                               |  |  |

### Annexe 04: résultats des tests statistiques

| Effet        | Tests Univariés de Significativité pour ZI (Feuille de données<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |                     |          |          |          |
|--------------|---|---------------------|----------|----------|----------|
|              | SC  | Degr. de<br>Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine | 368,1667  | 1                   | 368,1667 | 71,25806 | 0,001079 |
| extrait      | 4,1667  | 1                   | 4,1667   | 0,80645  | 0,419940 |
| Erreur       | 20,6667   | 4                   | 5,1667   |          |          |

| Cellule N° | Test de Newman-Keuls ; variable ZI (Feuille de données<br>Groupes Homogènes, alpha = ,05000<br>Erreur : MC Inter = 1,0000, dl = 4,0000 |               |      |      |
|------------|--|---------------|------|------|
|            | extrait  | ZI<br>Moyenne | 1    | 2    |
| 1          | N  | 10,00000      | **** |      |
| 2          | S1   | 21,00000      |      | **** |

**Figure 1** : tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antimicrobienne des deux extraits S<sub>1</sub> et N vis-à-vis de *S. aureus*

| Effet        | Tests Univariés de Significativité pour ZI (Feuille de données<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |                     |          |          |          |
|--------------|---|---------------------|----------|----------|----------|
|              | SC  | Degr. de<br>Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine | 2480,667  | 1                   | 2480,667 | 3721,000 | 0,000000 |
| extrait      | 2,667   | 1                   | 2,667    | 4,000    | 0,116117 |
| Erreur       | 2,667   | 4                   | 0,667    |          |          |

| Cellule N° | Test de Newman-Keuls ; variable ZI (Feuille de données<br>Groupes Homogènes, alpha = ,05000<br>Erreur : MC Inter = ,66667, dl = 4,0000 |               |      |
|------------|--|---------------|------|
|            | extrait  | ZI<br>Moyenne | 1    |
| 2          | S2   | 19,66667      | **** |
| 1          | S1   | 21,00000      | **** |

**Figure 2** : tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antimicrobienne des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de *S. aureus*

## Annexes

| Tests Univariés de Significativité pour ZI (Feuille de données5<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |          |                     |          |          |          |
|--|----------|---------------------|----------|----------|----------|
| Effet  | SC       | Degr. de<br>Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine   | 368,1667 | 1                   | 368,1667 | 71,25806 | 0,001079 |
| extrait  | 4,1667   | 1                   | 4,1667   | 0,80645  | 0,419940 |

| Test de Newman-Keuls ; variable ZI (Feuille de données<br>Groupes Homogènes, alpha = ,05000<br>Erreur : MC Inter = 5,1667, dl = 4,0000 |         |               |      |
|--|---------|---------------|------|
| Cellule N°   | extrait | ZI<br>Moyenne | 1    |
| 2  | N       | 7,000000      | **** |
| 1  | S1      | 8,666667      | **** |

**Figure 3** : tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antimicrobienne des deux extraits S<sub>1</sub> et N vis-à-vis de *B. cereus*

| Tests Univariés de Significativité pour ZI (Feuille de données<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |          |                     |          |          |          |
|---|----------|---------------------|----------|----------|----------|
| Effet   | SC       | Degr. de<br>Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine  | 504,1667 | 1                   | 504,1667 | 86,42857 | 0,000745 |
| extrait   | 1,5000   | 1                   | 1,5000   | 0,25714  | 0,638768 |
| Erreur  | 23,3333  | 4                   | 5,8333   |          |          |

| Test de Newman-Keuls ; variable ZI (Feuille de données<br>Groupes Homogènes, alpha = ,05000<br>Erreur : MC Inter = 5,8333, dl = 4,0000 |         |               |      |
|--|---------|---------------|------|
| Cellule N°   | extrait | ZI<br>Moyenne | 1    |
| 1  | S1      | 8,666667      | **** |
| 2  | S2      | 9,666667      | **** |

**Figure 4** : tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antimicrobienne des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de *B. cereus*

| Tests Univariés de Significativité pour ZI (Feuille de données1<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |          |                     |          |          |          |
|--|----------|---------------------|----------|----------|----------|
| Effet  | SC       | Degr. de<br>Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine   | 228,1667 | 1                   | 228,1667 | 1369,000 | 0,000003 |
| extrait  | 0,1667   | 1                   | 0,1667   | 1,000    | 0,373901 |
| Erreur   | 0,6667   | 4                   | 0,1667   |          |          |

## Annexes

| Test de Newman-Keuls ; variable ZI (Feuille de données1<br>Groupes Homogènes, alpha = ,05000<br>Erreur : MC Inter = ,16667, dl = 4,0000 |         |               |      |
|---|---------|---------------|------|
| Cellule N°  | extrait | ZI<br>Moyenne | 1    |
| 1   | S1      | 6,000000      | **** |
| 2   | S2      | 6,333333      | **** |

**Figure 5** : tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antimicrobienne des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de *E. coli*

| Tests Univariés de Significativité pour ZI (Feuille de données1<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |          |                     |          |          |          |
|--|----------|---------------------|----------|----------|----------|
| Effet  | SC       | Degr. de<br>Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine   | 253,5000 | 1                   | 253,5000 | 760,5000 | 0,000010 |
| extrait  | 0,1667   | 1                   | 0,1667   | 0,5000   | 0,518519 |
| Erreur   | 1,3333   | 4                   | 0,3333   |          |          |

| Test de Newman-Keuls ; variable ZI (Feuille de données1<br>Groupes Homogènes, alpha = ,05000<br>Erreur : MC Inter = ,33333, dl = 4,0000 |         |               |      |
|---|---------|---------------|------|
| Cellule N°  | extrait | ZI<br>Moyenne | 1    |
| 1   | S1      | 6,333333      | **** |
| 2   | S2      | 6,666667      | **** |

**Figure 6** : tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antimicrobienne des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de *p. aeruginosa*

| Tests Univariés de Significativité pour ZI (Feuille de données1<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |          |                     |          |          |          |
|--|----------|---------------------|----------|----------|----------|
| Effet  | SC       | Degr. de<br>Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine   | 96,00000 | 1                   | 96,00000 | 16,00000 | 0,016130 |
| extrait  | 24,00000 | 1                   | 24,00000 | 4,00000  | 0,116117 |
| Erreur   | 24,00000 | 4                   | 6,00000  |          |          |

| Test de Newman-Keuls ; variable ZI (Feuille de données17<br>Groupes Homogènes, alpha = ,05000<br>Erreur : MC Inter = 6,0000, dl = 4,0000 |         |               |      |
|--|---------|---------------|------|
| Cellule N°   | extrait | ZI<br>Moyenne | 1    |
| 2  | S2      | 2,000000      | **** |
| 1  | S1      | 6,000000      | **** |

**Figure 7** : tables de l'ANOVA et Newman Keuls pour les résultats de l'activité antimicrobienne des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de BLSE

## Annexes

| Tests Univariés de Significativité pour DO (Feuille de données<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |          |                  |          |          |          |
|---|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Effet   | SC       | Degr. de Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine  | 1,599382 | 1                | 1,599382 | 276,1403 | 0,000000 |
| dilution  | 0,690343 | 5                | 0,138069 | 23,8382  | 0,000000 |
| extrait   | 0,321111 | 1                | 0,321111 | 55,4413  | 0,000000 |
| dilution*extrait  | 0,164186 | 5                | 0,032837 | 5,6695   | 0,001372 |
| Erreur  | 0,139006 | 24               | 0,005792 |          |          |

**Figure 8** : tables de l'ANOVA pour les résultats des CMI des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de *S. aureus*

| Tests Univariés de Significativité pour DO (Feuille de données<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |          |                  |          |          |          |
|---|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Effet   | SC       | Degr. de Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine  | 2,722500 | 1                | 2,722500 | 366,3802 | 0,000000 |
| dilution  | 1,600600 | 5                | 0,320120 | 43,0801  | 0,000000 |
| extrait   | 0,032882 | 1                | 0,032882 | 4,4251   | 0,046079 |
| dilution*extrait  | 0,304711 | 5                | 0,060942 | 8,2013   | 0,000125 |
| Erreur  | 0,178339 | 24               | 0,007431 |          |          |

**Figure 9** : tables de l'ANOVA pour les résultats des CMI par la mesure de la DO à 625nm des deux extraits S<sub>1</sub> et N vis-à-vis de *S. aureus*

| Tests Univariés de Significativité pour DO (Feuille de données1<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |          |                  |          |          |          |
|--|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Effet  | SC       | Degr. de Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine   | 2,202256 | 1                | 2,202256 | 359,9029 | 0,000000 |
| extrait  | 0,244365 | 1                | 0,244365 | 39,9353  | 0,000002 |
| concentration  | 1,645146 | 5                | 0,329029 | 53,7715  | 0,000000 |
| extrait*concentration  | 0,147540 | 5                | 0,029508 | 4,8223   | 0,003418 |
| Erreur   | 0,146857 | 24               | 0,006119 |          |          |

**Figure 10**: tables de l'ANOVA pour les résultats des CMI par la mesure de la DO à 625nm des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de *E. coli*

## Annexes

| Effet            | Tests Univariés de Significativité pour DO (Feuille de données1<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |                  |          |          |          |
|------------------|--|------------------|----------|----------|----------|
|                  | SC   | Degr. de Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine     | 1,044143   | 1                | 1,044143 | 78,66787 | 0,000000 |
| dilution         | 0,643458   | 5                | 0,128692 | 9,69588  | 0,000036 |
| extrait          | 0,056248   | 1                | 0,056248 | 4,23784  | 0,050545 |
| dilution*extrait | 0,044238   | 5                | 0,008848 | 0,66660  | 0,652391 |
| Erreur           | 0,318547   | 24               | 0,013273 |          |          |

**Figure 11** : tables de l'ANOVA pour les résultats des CMI par la mesure de la DO à 625nm des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de BLSE

| Effet            | Tests Univariés de Significativité pour DO (Feuille de données1<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |                  |          |          |          |
|------------------|--|------------------|----------|----------|----------|
|                  | SC   | Degr. de Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine     | 2,525980   | 1                | 2,525980 | 1233,857 | 0,000000 |
| dilution         | 1,848156   | 5                | 0,369631 | 180,553  | 0,000000 |
| extrait          | 0,211600   | 1                | 0,211600 | 103,360  | 0,000000 |
| dilution*extrait | 0,163146   | 5                | 0,032629 | 15,938   | 0,000001 |
| Erreur           | 0,049133   | 24               | 0,002047 |          |          |

**Figure 12** : tables de l'ANOVA pour les résultats des CMI par la mesure de la DO à 625nm des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de *B. cereus*

| Effet                 | Tests Univariés de Significativité pour DO (Feuille de données1<br>Paramétrisation sigma-restreinte<br>Décomposition efficace de l'hypothèse |                  |          |          |          |
|-----------------------|--|------------------|----------|----------|----------|
|                       | SC   | Degr. de Liberté | MC       | F        | p        |
| ord. origine          | 2,560160   | 1                | 2,560160 | 1057,962 | 0,000000 |
| extrait               | 0,135706   | 1                | 0,135706 | 56,079   | 0,000000 |
| concentration         | 1,808326   | 5                | 0,361665 | 149,455  | 0,000000 |
| extrait*concentration | 0,290716   | 5                | 0,058143 | 24,027   | 0,000000 |
| Erreur                | 0,058078   | 24               | 0,002420 |          |          |

**Figure 13** : tables de l'ANOVA pour les résultats des CMI par la mesure de la DO à 625nm des deux extraits S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> vis-à-vis de *P. aeruginosa*

## Références bibliographiques

---

- **AKROUR N et HARANI F. (2011).** Contribution à l'amélioration de l'activité antibactérienne d'extrait de feuilles d'olivier par addition de la Nisine, et leur application à la conservation de la viande hachée bovine. Mémoire d'ingénieur Spécialité: Technologie Alimentaire. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou Algérie: 3-18.
- **AL-AZZAWIE H. F et ALHAMDANI M.S. (2006).** Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci*; 78: 1371-1377.
- **ALIGANNIS N., KALPOTZAKIS E., MITAKU S and CHINOI I.B. (2001).** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum species*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4168-4170.
- **ALMAJANO M.P., CARBO R., JIMENEZ J.A.L. and GORDON M.H.. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*. 108: 55-63.
- **ALTIOK E., BAYCIN D., BAYRAKTAR O et ULKU S. (2008).** Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea L.*) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.* 62 (2): 342-348.
- **AL-QARAWI A.A., AL-DAMEGH M.A and ELMOUGHY S.A. (2002).** Effect of freeze dried extract of *Olea europaea* on the pituitarythyroid axis in the rats. *Phytotherapy Research*. 16: 286-287.
- **ANDREADOU I., ILIODROMITIS E.K., MIKROS E., CONSTANTINOI M., AGALIAS A., AGALIAS A., MAGIATIS P., SKALTSOUNIS A.L., KAMBER E., TSANTILI-KAKOULIDOU A and KREMASTINOS D.T. (2006).** The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic antioxidant and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits, 136 (8): 9-2213.
- **ANDRIKOPOULOS N.K., ANTONOPOULOU S and KALIORA A.C. (2002).** Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35: 479-484.
- **ANGINOT P et ISLER F. (2003).** L'Olive. *Libris*: 43.
- **ANONYME 1:** [www.visoflora.com](http://www.visoflora.com)
- **ANONYME 2:** [www.feuilles-olivier.com](http://www.feuilles-olivier.com)
- **ANONYME 3:** [www.biokar.diagnostic.fr](http://www.biokar.diagnostic.fr)
- **ANONYME 4:** [www.2.ac-lyon.fr](http://www.2.ac-lyon.fr)

## Références bibliographiques

---

- **AOUIDI F. (2012).** Etude et Valorisation des Feuilles d'Olivier *Olea Europaea* dans l'Industrie Agro-Alimentaire. Mémoire de Doctorat. Université de Carthage, Tunisie: 3.
- **ARAQAS H. (2013).** Extraction des composés phénoliques de feuilles d'olivier et étude de leurs activités biologiques. Mémoire d'Obtention du Master CMBA. Univ Sidi Mohammed Ben Abellah, FST FES : 3-4.
- **ARGENSON C., REGIS S., JOURDAIN J.M et VAYSEE P. (1999).** Olivier Centre Technique interprofessionnel des fruits et légumes : 12.
- **ATHAMENA S., CHALGHEMI I., KASSAH-LAOUAR A., KHEBRI S et LAROUÏ S. (2010).** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal. Vol : 11-13.
- **AVENARD V. (2008).** L'olivier et les vertus thérapeutiques de ses feuilles. Université de Nantes : 64-88.
- **AZIZ N.H., FARAG S.E., MOUSA L.A and ABO-ZAID M.A. (1998).** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Microbios, 93: 43-54.
- **BAALI-CHERIF DJ. (2007).** Etude des populations d'olivier de Laperrine (*Olea europaea subsp. laperrinei*) du Sahara central algérien (Hoggar et Tassili) aspects biologiques et caractérisation moléculaire, Mémoire de Doctorat d'état en Sciences de la Nature Spécialité : Biologie Végétale. Université Des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene USTHB-ALGER. Pp : 17.
- **BARTOSZ G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9: 5-21.
- **BENAVENTE-GRACIA O., CASTILLO J., LORENTE J., ORTUNO A and DEL J.A. (2000).** Antioxydant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* leaves. *Food Chem.* 68 (4): 457-462.
- **BENCHELAH A-C et BOUZIANE H. (2006).** Arbre et Arbuste du Sahara: voyages au Coeur de leurs usages: 216-217.
- **BENNANI KABCHI N., FDHIL H et CHERRAH Y., (1999).** Effets of *Olea europaea* var. oleastre leaves in hypercholesterolemic insulin-resistant sand rats. *Thérapie.* 54: 23-717.
- **BISIGNANO G., TOMAINO A., LO CASCIO R., CRISAFI G., UCCELLA N and SAIJA A. (1999).** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* Vol. 51: 4-971.

## Références bibliographiques

---

- **BLAZQUEZ M. (1997).** Encyclopédie Mondiale de l'olivier. Conseil Oléicole internationale: 19.
- **BOLMONT R., BUSSLER L., JAUBERT J-P et le chantier BT de l'ICEM. (2015).** L'Olivier: 3.
- **BOTSOGLOU E., GOVARIS A., CHRISTAKI E and BOTSOGLOU N. (2010).** Effect of dietary olive leaves and/or a-tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food chemistry*, 121: 17-22.
- **BOUABDALLAH A. (2014).** Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europaea sylvestris*). Mémoire de Master. Univ Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie.
- **BOUAZIZ M et SAYADI S. (2003).** High yield extraction of oleuropein from chemlali olives and leaves and bioconversion to hydroxytyrosol. *Polyphénols actualités*, 23: 11-15.
- **BOUAZIZ M., FKI I., JEMAI H., AYADI M et SAYADI S. (2008).** Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108: 253-262.
- **BOUDHRIOUA N., BAHLOUL N., BEN SLIMEN I and KECHAOU N. (2009).** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 29: 412–419.
- **BOURREIL P et BENICHOU A. (1962).** Recherches critiques sur l'olivier de Laperrine étude anatomique du limbe des innovations des Aristida de l'Afrique du Nord et du Sahara. *Botanique Saharienne Mémoire* 6.
- **BOUSSEBOUA H. (2001);** *Elément de microbiologie général*: 160-167.
- **BRETON C et BERVILLE A. (2012).** Histoire de l'olivier l'arbre des temps *Editions Quae*: 48.
- **BREVIGLIERI N and CIFERRI R. (1942).** Introduzione and una classificazione morfo-ecologica dell'olivo coltivato in Italia. REDA, Rome.
- **BROSSE J. (2000).** Larousse des arbres: Dictionnaire des arbres et des arbustes: 291-292.
- **BRUNETON J. (2009).** Pharmacognosie : Phytochimie. Lavoisier, 4<sup>ème</sup> édition. Paris : 901-904.

## Références bibliographiques

---

- **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*; 29: 952-968.
- **CHAN K.N and MAZNAH I. (2009).** Supercritical carbon dioxide fluid extraction of hibiscus *Canna bimus L.* seed oil: Apotential solvent-free and high antioxydative edible oil. *Food chem* 6: 1291-1296.
- **COLLIN S., COUNET C., CALLEMIEN D et JERKOVIC V. (2011).** Nomenclature et voies de synthèse des principaux polyphénols; in «Polyphénols et Procédés: Transformation des polyphénols aux travers des procédés appliqués à l'agroalimentaire». Lavoisier., Paris: 5-25.
- **COWAN MM. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microb. Rev.* Vol. 12: 564-582.
- **CRONQUIST A. (1981).** Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press, NY: 1262
- **CROZIER A., DEL RIO D and CLIFFORD M-N. (2010).** Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine. Phytochemicals and Cardiovascular Protection.* 31: 446-467.
- **DHAOUADI K., RABOUDI F., ESTEVAN C., BARRAJON E., VILANOVA E and HAMDAOUI M. (2010).** Cell viability effects and antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian date syrup (Rub El Tamer) polyphenolic extracts. *J. Agric Food Chem.*59: 402-406.
- **DEKANSKI D., RISTIC S., RADONJIC N., PETRONIJEVIC N., DEKANSKI A and MITROVIC D. (2011).** Olive leaf extract modulates cold restraint stress-induced oxidativechanges in rat liver. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76 (9): 1207-1218.
- **DELARRAS C. (2007).** Microbiologie Pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *Tech. Doc. Lavoisier, Paris.*
- **DE LEONARDIS A., ACETINI A., ALFANO G., MACCIOLA V and RANALLI G. (2008).** Isolation of a hydroxytyrosol rich extract from olive leaves (*Olea europaea L.*) and evaluation of its antioxidant properties and Bioactivity. *European Food Research and Technology*, 226: 653-659.
- **DELGADO-PERTINEZ M., GOMEZ-CABRERA A and GARRIDO A. (2000).** Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and

## Références bibliographiques

---

- chemical composition and in vitro studies. *Animal Feed Science and Technology*, 87: 187-201.
- **DE LUCAS A., MARTINEZ de la OSSA E., RINCON J., BLANCO M.A and GRACIA I. (2002).** Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, 22 (3): 221-228.
  - **DERRICHE F et BOUARAB L. (2010).** Etude «in vitro» de l'effet antibactérien des extraits bruts de feuilles d'olivier de deux variétés: Chemlal, Azerradj; avec mise en évidence de l'effet de l'oleuropéine et leur application dans la conservation de la viande blanche «Escalope de dinde». Mémoire d'Ing. Ummto, Algérie: 24.
  - **DIBERT K. (1989).** Contribution à l'étude de l'extraction solide-liquide de l'huile et de l'acide chlorogénique du café vert. LYON, Claude Bernard LYON I. Engineer's Handbook. New York, McGraw-Hill Book Co: 247-289.
  - **DJENANE D., YANGUELA J., DERRICHE F., BOUARAB L et RONCALES P. (2012).** Extrait de feuilles d'olivier; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa*; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie*: 10-18.
  - **ERBAY Z et ICIER F. (2009).** Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 91: 533-541.
  - **ESSAWI T et SROUR M. 2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* Jun; 70 (3): 343-9.
  - **EUZEBY J.P. (2007).** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire [en ligne] Adresse URL: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/>.
  - **FARAG R.S., MAHMOUD E.A et BASUNY A.M. (2007).** Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science & Technology*, 42: 107-115.
  - **GARCIA-GOMEZ A., ROI G A et BERNAL M.P. (2003).** Composition of the solid fraction of olive mill waste water with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bioresource Technology*, 86: 59-64.
  - **GARRO GALVEZ J.M., RIEDL B et CONNER A.H. (1997).** Analytical studies on tara tannins. *Holzforchung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of wood*, 51: 235-243.
  - **GAUSSORGUES R. (2009).** L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique, *Revue française d'allergologie*: 49.

## Références bibliographiques

---

- **GHANBARI R., FAROOQ A., ALKHARFY KH. M., GILANI A-Hand SAARI N. (2012).** Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea L.*). A Review. *Int. J. Mol. Sci*; 13: 3291-3340.
- **GHEDIRA K. (2008).** L'olivier. *Phytothérapie*, vol 6 (2): 83-89.
- **GIAO M.S., GONZALES-SANJOSE M.L., RIVERO-PEREZ M.D., PEREIRA C.I., PINTADO M.E et MALCATA F.X. (2007).** Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of Science Food & Agriculture*, 87: 2638-2647.
- **GUPTA V.K., ROY A., NIGAM V.K and MUKHERJEE K. (2010).** Antimicrobial Activity of *Spondias Pinnata* Resin. *Journal of Medicinal plants Research* 4, 1656-1661.
- **HAGERMAN A-E., MULLER-HARVEY I et H-P-S. (2000).** Quantification of tannins in tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna. Pp: 26.
- **HAMDI K.H et CASTELLON R. (2005).** Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an antitumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 769-778.
- **HANSEN K., ADSERSEN A., BROGGER CHRISTENSEN S., JENSEN SOREN R., NYMAN U and WAGNER SMITT U. (1996).** Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lincea*. *Phytomedicine*; 2: 19-325.
- **HARBONE J.B and SOMMONDS N.W. (1964).** Biochemistry of Phenolic Compounds, Academic Press, London: 101.
- **HARRAR A. (2012).** Activités antioxydantes et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus L.* Diplôme de Magister Université Ferhat Abbas-Sétif: 55.
- **HAYOUNI E.A., ABEDRABBA M., BOUIX M and HAMDI M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera L.* and *Juniperus phoenicea L.* Fruit extracts. *Food Chem.* 105: 1126-1134.
- **HELANDER I.MI, ALAKOMI H.L., LATVA-KALA K., MATTILA-SANDMOLM T., POL L., SMID E.J., GRRIS L.G.M and VONWRIGH A. (1989).** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (9): 3590-3595.

## Références bibliographiques

---

- **HERNANDEZ NE., TERSCHUK ML and ABDALA I.R. (2000).** Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology* 73: 317-322.
- **JUVEN B.J., KANNER J., SCHVED F and WELSSLOWICZ H. (1994).** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied bacteriology*, (76): 626-631.
- **KACED L et HAMIDCHI T. (2013).** Contribution à l'évaluation «in vitro» de l'effet antibactérien d'extrait bruts issus de deux **KARAKAYA S. (2004).** Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (6): 453-64.
- **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 micros boutures de l'olivier (*Olea europaea* L) Var Chemlal. Thèse. Ing: 100.
- **KIM J., MARSHALL MR and WEI C. (1995).** Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43: 2839-2845.
- **KOMAKI E., YAMAGUCHI S., MARU I., KINOSHITA M., KAKEHI K., OHTA Y and TSAKADA Y. (2003).** Identification of Anti-Amylase Components from Olive Leaf Extracts. *Food Science. Technology. Research*, 9(1): 35-39.
- **LABANE S et TADALA F. (2015).** Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts des feuilles de l'olivier sauvage (*Olea europaea subsp sylvestris*). Mémoire en vue d'obtention du Diplôme de Master, Option Microbiologie Appliquée. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Algérie: 3-19.
- **LAMBERT R.J.W and PEARSON J. (2001).** Susceptibility testing; accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied microbiology*, (88): 784-790.
- **LEE-HUANG S., ZHANG L., HUANG P;-L and CHANG Y.-T. (2003).** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 307 (4): 1029-1037.
- **LEE O.H et LEE B.-Y. (2010).** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology*, 101: 3751-3754.
- **LEONG L.P and SHUI G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem* 76: 69-75.

## Références bibliographiques

---

- **LEYBROS J et FREMEAUX P. (1990).** "Extraction solide-liquide aspects théoriques". Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06.
- **LOUSSERT R et BROUSSE G. (1978).** L'olivier. *G.P. Maisonneuve et Latose, Printed in France*: 48.
- **MACHEIX J.J., FLEURIET A et SARNI-MANCHADO P. (2003).** Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Dans Les polyphénols en agroalimentaire; Sarni-Manchado P. et Cheynier V., Eds.; Lavoisier: Paris: 1-28.
- **MACHEIX J.J., FLEURIET A et MANCHADO P.S. (2006).** Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles; in: «Les Polyphénols En Agroalimentaire». Edition Tec et Doc., Lavoisier., Paris: 3-26.
- **MALIK N.S.A et BRADFORD J.M. (2006).** Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in "Arbequina" olives. *Sci Hort.* 110 (3): 274-278.
- **MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C and JIMENEZ L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *AmJ. Clin Nutr.* 79: 727-747.
- **MARKIN D., DUEK L and BERDICEVSKY I. (2003).** In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*; 46 (3-4): 132-136.
- **MARTIN D. W., SCHURR M.J., MUDD M.H., HOLLOWAY B. W and DERETIC V. (1993).** Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A.* 90: 8377-8381.
- **MARTIN-GARCIA A.I., MOUMEN A., YANEZ RUIZ D.R and MOLINA ALCAIDE E (2003).** Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive. Leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107: 61-74.
- **MARTIN S et ANDRIANTSITOHAINA R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et Angéiologie.* 51: 304-315.
- **MEDINA E., DE GASTRO A., ROMERO C and BRENES M. (2006).** Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 54: 4954-4961.

## Références bibliographiques

---

- **MEDINA E., BRENES M., ROMERO C., GARCIA A and DE CASTRO A. (2007).** Main Antimicrobial Compounds in Table Olives. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 55: 9817-9823.
- **MERAH H. (2016).** Activité antioxydante et antimicrobienne des fractions polyphénoliques d'olive local (*Olea europaea L.*), Mémoire présenté en vue d'obtention du diplôme de Magister Spécialité: Substances Naturelles et Innovation thérapeutique S.N.I.T. Université Mustapha Stambouli Mascara. Algérie. Pp: 3.
- **MICOL V., CATURLA N., PEREZ-FONS L., MAS V and ESTEPA A (2005).** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research.*, 66 (2-3): 129-136.
- **MOHAMED MOUNIR S. (2007).** Département Génie des procédés Industriels. La Molyneux P., The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 26 (2): 211-219.
- **MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E and ROURA S.I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Sciencand Ttechnology*, 38: 565-570.
- **MOTILVA M-J., SERRA A and MACIA A. (2013).** Analysis of food polyphenols by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An Overview. *Journal of Chromatography A, State of the art of (UHP) LC-MS (-MS). Techniques and their Pratical Application.* 1292: 62-82.
- **MYLONAKI S., KLIASSOS E., MAKRIS D.P and KEFALAS P. (2008).** Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (5): 977-985.
- **NACZK M and SHAHIDI F. (2006).** Phenolics in Cereals Fruit and Vegetables: occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of pharmaceutical and bio medical Analysis*, vol 41, N 05: 1523-1542.
- **NEFZAQUI A. (1991).** Valorisation des sous-produits de l'olivier. In: Tisserand J.L. (éd) *Alibés X. Fourrage et sous-produits méditerranéenl.* Zaragoza: CHEMA. Option: Méditerranéens: Série A. Séminaire Méditerranéens, (16):101-108.
- **NIEPCERON E. (2013).** *Staphylococcus aureus*, Ecole supérieure de biochimie biotechnologie. Université catholique de Lyon: 1-5.

## Références bibliographiques

---

- **OMAR S.H. (2010).** Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm. Paris, Techniques et Documentation-Lavoisier. J. 18:* 111-121.
- **OOSTERHAVEN K., POOLMAL B and SMID E.J. (1995).** S-carvone as naturel potato sprouts inhibiting fungistatic and bacterstatic compound. *Industrial crops products. (4):* 23-31.
- **ORHAN G., BAYRAM A., ZER Y and BALCI I. (2004).** Synergy Tests by E test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology:* 140-143.
- **OROZCO-SOLANO M., RUIZ-JIMENEZ J and LUQUE DE CASTRO M.D. (2010).** Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1217:* 1227-1235.
- **OWEN P and JOHENS T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastem North American plant remedies used for gout. *J. Ethnoph. 64:* 149-160.
- **PAGES J.M et GARNOTEL E. (2003).** Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. *Revue française des Laboratoires. Vol. 352:* 57-63.
- **PEREIRA J.A., OLIVEIRA I., SOUSA A., VALENTAO P., ANDRADE P.B., FERREIRA I.C.F.R., FERRERES F., BENTO A., SEABRA R and ESTEVINHO L. (2007).** Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antimicrobiall activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol. 45:* 2287–2295.
- **POLESE JM. (2009).** Olivier pas à pas. *EDISSUD Provence:* 9-12.
- **RICE-EVANS C.A., MILLER N.J., BOLWELL P.G., BRAMLEY P.M and PRIDHAM J.B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research, Rochelle, Université de La Rochelle, 22:* 375-383.
- **RIOS J-L and RECIO M-C. (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology, 100:* 80-84.
- **ROBARDS K., PRENZLER P.D., TUCKER G., SWATSITANG P and GLOVER W., (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry, 66,* 401-436.

## Références bibliographiques

---

- **RODRIGUEZ-RODRIGUEZ R., HERRERA M.-D., DE SOTOMAYOR M.-A and RUIZ-GUTIERREZ V. (2007).** Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxidesynthase expression. *Am. J. Hypertens*; (7): 728-734.
- **ROMBI M., ROBERT D., GUEDON D., ROSIER-SALA C et RENZACCI E. (2015).** Le dictionnaire des plantes medicinales. *Composition/Mode d'action. Editions Alpen*: 517-519-520 et 521.
- **ROSATO A., VITALI C., GALLO D., BALENZANO L and MALLAMACI R. (2008).** The inhibition of Candida Species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B, *Phytomedicine*, 15: 635-638.
- **SAFFIDINE K. (2015).** Etude analytique et biologique des flavonoides extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L. Université Ferhat Abbas Sétif: 76-80.
- **SATO H., GENET C and STREHLE A. (2007).** Antihyperglycemic activity of TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem; biophys. Res. Commun*; 362:793-798.
- **SATRANI B., GHANMI M., FARAH A., AAFI A., FOURGACH H., BOURKHISS B., BOUSTA D et TALBI M. (2007).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentiel de *cladanthus mixtus*. *Bull Soc. Pharm Bordeaux*, (146): 85-96.
- **SCHUCHARDT H. (1997).** Encyclopédie Mondiale de l'olivier. Conseil Oléicole international: 21.
- **SHAN L., HE P and SHEEN J. (2007).** Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. *Cell Host Microbe*.1: 167-174.
- **SHIN S and KANG C.A. (2003).** Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* kutze and its synergysim with Ketoconazole. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 111-115.
- **SIGUERDJIDJENE K. (2010).** Contribution à l'étude bibliographique de l'olivier (*Olea europaea* L). Mémoire d'Etude Supérieure en Biologie et Physiologie Végétale. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Algérie. Pp: 3.
- **SINGH I., MOK M., CHRISTENSEN A.M., TURNER A.H and HAWLEY J.A (2008).** The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 18: 127-132.

## Références bibliographiques

---

- **SOMOVA L.I., SHODE F.O., RAMNANAN P and NDAR A., (2002).** Antihypertensive antiaterosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacol*: 1-7.
- **SUDJANA A.-N., D’ORAZIO C., RYAN V., RASOOL N., NG J., ISLAM N., RILLEY T.-V and HAMMER K.-A. (2009).** Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* leaf extract. *Int. J. Antimicrob; Agents*; 33 (5): 461-463.
- **SUSALIT E., AGUS N., EFFEND I., TJANDRAWINATA R.R., NOFIARNY D., PERRINJAQUET-MOCCHETTI T and VERBRUGGEN M. (2011).** Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18 (4): 251-258.
- **TADASHI U. (2006).** Antiaging food compositions containing collagen, and heir manufacture. Patent written in Japanese. Application: JP 2006191845 A 20060727: 7.
- **TALHAOUI N., TAAMALLI A., GOMEZ-CARAVACA A.M., FERNANDEZ-GUTIERREZ A and SEGURA-CARRETERO A. (2015).** Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77: 92-108.
- **TAO and LAMBERT J.D. (2014).** Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer. *Polyphenols in Human Health and Disease.*, 2: 1191-1198.
- **TASSOU CC and NYCHAS GJE. (1994).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolic in broth and in food model system. *J. Food Prot.* Vol. 57: 120-124-132.
- **TEASIOLA-MARGARI and OKOGERI. (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 and 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): 519-525.
- **THOMAS D., NEMONE T., MARIANNE W-L and ARMIN W. (2006).** Cosmetic and dermatological composition for the treatment of aging or photodamaged skin. Ptent written in German. EP2005-20052 20050915: 40.
- **TRIPOLI E., GIAMMANCO M., TABACCHI G., DI MAJO D., GIAMMANCO S and LA GUARDIA M. (2005).** The phenolic compounds of olive oil: structure,

## Références bibliographiques

---

- biological activity and beneficial effects on human health. *Nutria. Res. Rev.* Vol. 18: 98-112.
- **ULTEE A and SMID E.J. (2001).** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* (46): 373-378.
  - **ULTEE A., BENNIK M.H.J and MOEZELAAR R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, (4): 1561-1568.
  - **VASILEIOS Z., GEORGIA T-B., ATHANASSIOS M-A., GRIGORIOS B-D and MILTIADIS V. (2010).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry*, 120: 1097-1103.
  - **VERCAUTERN J and CHEZE C. (1998).** Polyphénols 96: 18<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols. Les Colloques, N°87. *Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)*. Paris: 11-89.
  - **VERDIER E. (2003).** L'Huile d'olive.
  - **VISIOLI F., BELLOSTA S and GALLI C. (1998).** Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* doi: 10.1016/S0024-3205 (97) 01150-8. 62: 541-546.
  - **WAINSTEIN J., GANZ T., BOAZ M., BAR DAYAN Y., DOLEV E and KEREM Z. (2013).** Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Natural medicine*: 01-477.
  - **WALKER M. (2000).** L'extrait de feuille d'olivier pour renforcer le système immunitaire. Editions Medicis-Entrelacs.
  - **WENDAHOON CN and SAKAGUCHI M. (1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Prot.* Vol. 58: 280-283.
  - **YUHONG L., QINGSHENG L., HUIQING K., CHEN Z., XIONG L., QIUYAN L and MEILING L. (2006).** Study on using microwave to extract flavonoid antioxidants from olive leaves. *Shipin Keji, Journal written in Chinese.* (8): 111-114.
  - **ZARZUELO A., DUARTE J and JIMENEZ J. (1991).** Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Med.* 57: 417-419.
  - **ZOHARY D., HOPF M and WEISS E. (2012).** Domestication of plants in the Old World. 3. ed. New York: Oxford University Press. 328 p.