

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

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



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante des extraits
polyphénoliques issus de sous- produits oléicoles
et la sensibilité des souches probiotiques vis-à-vis
de ces extraits**

Présenté par :

M^{elle} HESSAS Nesrine

M^{elle} LAKSI Kamélia

Devant le jury composé de :

Président : M^{me} OUALI- ABDOUNE Samia Maitre assistante chargée de cours UMMTO

Promotrice : M^{elle} DERMECHE Samia Maitre assistante Classe A UMMTO

Examineur 1 : M^R OUELHADJ Akli Maitre de conférences Classe A UMMTO

Examineur 2 : M^{me} SENANI-OULARBI Nassima Maitre assistante Classe A UMMTO

2014/2015

REMERCIEMENTS

*Nous remercions DIEU tout puissant, maître des cieux et de la terre,
qui nous a permis de mener à bien ce travail.*

*Tout d'abord on tient à adresser nos plus vifs remerciements à notre
promotrice **M^{elle} DERMECHE S.**, qui nous a fait l'honneur
d'accepter la réalisation de ce travail sous sa direction, pour sa
grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils précieux.*

*Nous tenons également à adresser nos plus sincères remerciements
aux membres du jury :*

Mme OUALI-ABDOUNE S.,

M^r OULHADJ A.,

Mme SENANI-OULARBI N.

*Nous assurons notre profonde gratitude à **M^r TITOUCHE Y.**, nous
vous remercions énormément pour toutes vos aides, pour vos
remarques judicieuses, pour votre gentillesse et votre serviabilité.*

Dédicaces

Nous dédions ce modeste travail

*A ceux qui nous ont donné sans rien en retour,
A ceux qui nous ont encouragés et soutenus dans nos moments les plus
difficiles,
Et ceux à qui nous devons tant.*

*A **IDRIS** sans lequel ce travail n'aurait pas abouti.*

*A nos parents, que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux
de nos profondes reconnaissances pour tout ce que vous avez fait.*

A nos chères familles

A tous nos ami(e)s

*Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à
la réalisation de ce travail.*

Un grand merci à tous

Résumé

Les polyphénols sont des micro-constituants végétaux abondants dans nos aliments dont l'intérêt n'a cessé de grandir au cours de ces dernières années ; ils sont reconnus pour leur forte bioactivité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques.

C'est dans ce contexte que le présent travail est mené sur l'évaluation des activités biologiques des polyphénols des extraits bruts des feuilles d'oléastre et de margines d'olives *Olea europaea* (variété *Chamlal*) récoltés dans la région de Tizi-Ouzou, réputées pour leur pharmacopée traditionnelle et tant appréciées dans les domaines thérapeutique, alimentaire, cosmétique et pharmaceutique...etc.

Les extraits polyphénoliques obtenus de deux types d'extraction aqueuse et organique sont soumis à différents tests biochimiques (dosage des composés phénoliques par la méthode du folin-Ciocalteu, évaluation de leur activité antioxydante par la réduction du radical DPPH·) et microbiologiques (Estimation de la biomasse bactérienne sur milieux liquides, dénombrement des cellules viables sur boîtes, test de sensibilité par la méthode de diffusion sur disque et détermination des paramètres d'inhibition CMI/CMB).

Les tests biochimiques ont permis de dévoiler que la teneur des polyphénols et le pouvoir antiradicalaire des différents extraits sont étroitement liés aux conditions d'extraction étudiées. Les extraits bruts pourraient être qualifiés d'excellents piègeurs de radicaux libres.

L'étude microbiologique a montré que les six souches appartenant au genre *Lactobacillus* ont répondu positivement au test de viabilité vis-à-vis des extraits aqueux. Le test antimicrobien a fait apparaître un taux d'inhibition de l'ensemble des souches, et qu'est plus ou moins important et variant selon les différents extraits organiques à l'exception de l'extrait de feuilles à l'acétate d'éthyle.

Mots clés : Feuilles d'oléastres, antioxydant, antibactérien, viabilité, probiotiques, polyphénols, margines.

Table des matières

	Pages
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux et des figures	
Introduction.....	1

1^{ère} Partie : Recherche bibliographique

Chapitre I : Olivier et sous-produits oléicoles

I.1.Généralités sur l'olivier.....	3
I.1.1. Origine et Histoire.....	3
I.1.2. Description botanique.....	3
I.1.3. Taxonomie et systématique.....	5
I.1.4. Répartition et écologie de l'olivier	6
I.1.5. Variétés cultivées en Algérie.....	6
I.2. Valorisation de sous-produits oléicoles.....	7
I.2.1.Caractéristiques.....	7
I.2.2. Les feuilles de l'olivier.....	7
I.2.3. Le grignon d'olive.....	8
I.2.4.Les margines.....	8

Chapitre II : polyphénols et bioactivités

II. Les composés phénoliques	11
II.1.Généralités et définition.....	11
II.2. Localisation et biosynthèse des composés phénoliques.....	12
II.3. Structures chimiques et classification.....	13
II.3.1. Flavonoïdes.....	14
II.3.2. Acides phénoliques et tannins hydrolysables.....	15
II.3.3. Stilbénes.....	16
II.3.4. Lignines et subérines.....	16
II.4.Disponibilité biologique des composés phénoliques.....	17
II.5.Méthodes d'extraction des composés phénoliques.....	17
II.6.Méthodes d'analyse des composés phénoliques.....	19
II.7. Les composés phénoliques des olives et produits dérivés.....	20
II.8. Rôles des composés phénoliques et effets thérapeutiques.....	23
II.9. Stress oxydatif.....	25
II.9.1 Définition du radical libre et le stress oxydant.....	26
II.9.2. Biosynthèse et origine de production des ERO.....	26
II.9.3. Conséquences du stress oxydatif.....	27
II.10. Activité antioxydante.....	28
II.10.1.Les antioxydants.....	28

II.10.2. Mécanismes d'action des antioxydants.....	29
II.11. Activité antimicrobienne et mode d'action.....	30

Chapitre III : Les probiotiques

III.1. Les bactéries lactiques.....	32
III.1.1. Habitat et origine.....	32
III.1.2. Taxonomie.....	32
III.1.3. Caractéristiques des principaux genres de bactéries lactiques.....	34
III.1.3.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	34
III.1.3.2. Le genre <i>Lactococcus</i>	34
III.1.3.3. Le genre <i>Streptococcus</i>	34
III.1.3.4. Le genre <i>Enterococcus</i>	34
III.1.3.5. Les genres <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> et <i>Weissella</i>	34
III.1.3.6. Les genres <i>Pediococcus</i> et <i>Tetragenococcus</i>	34
III.1.3.7. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	35
III.1.4. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques.....	35
III.1.5. Les ferments lactiques.....	35
III.1.6. Applications industrielles des bactéries lactiques.....	35
III.2. Les probiotiques.....	36
III.2.1. Principales espèces des bactéries lactiques à effet probiotique.....	36
III.2.2. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques.....	37
III.2.2.1. Résistance à l'acidité gastrique.....	38
III.2.2.2. Résistance aux sels biliaires.....	38
III.2.2.3. Adhésion aux cellules épithéliales.....	39
III.2.2.4. Production de substances antimicrobiennes.....	39
III.2.2.5. Résistance aux antibiotiques.....	39
III.2.2.6. Critères technologiques.....	39
III.2.3. La différence entre probiotique et prébiotique.....	40
III.2.4. Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé.....	40
III.2.5. Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques.....	41
III.2.6. Interaction composés phénoliques-probiotiques.....	41

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

I. Matériels et Méthodes

I.1. Matériels.....	43
I.1.1. Matériel biologique.....	43
I.1.2. produits chimiques et appareillages.....	44
I.2. Méthodes.....	46
I.2.1. Extraction des polyphénols des margines et des feuilles.....	46
I.2.2. Analyse quantitative des échantillons.....	49
I.2.2.1. Rendement d'extraction.....	49
I.2.2.2. Quantification des phénols totaux des extraits aqueux et organiques.....	49

I.2.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante	51
I.2.4.Évaluation de l'activité antibactérienne	51
I.2.4.1. Estimation de la biomasse bactérienne sur milieu liquide.....	52
I.2.4.2. Dénombrement de colonies sur boites.....	52
I.2.4.3.Méthode de diffusion en milieu gélosé (Test de sensibilité).....	53
I.2.4.4. Détermination des paramètres d'inhibition: CMI, CMB et CMI/CMB.....	53
I.2.5. Etude statistique.....	55

II. Résultats et Discussion

II.1. Rendement d'extraction des feuilles et de margines.....	56
II.2. Quantification des composés phénoliques.....	58
II.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante et pourcentage de piégeage.....	61
II.4. Viabilité des probiotiques en présence des extraits bruts	65
II.4.1. Estimation de la biomasse cellulaire.....	65
II.4.2. Dénombrement des cellules viables sur boîte.....	67
II.5. Méthode de diffusion sur agar.....	69
II.6. Détermination des paramètres d'inhibition CMI, CMB et CMI/CMB.....	75

Conclusion et perspectives..... 80

Références bibliographiques

Annexes

Liste d'abréviations

AG	Acide gallique
ANOVA	Test d'Analyse de Variances
AT	Acide tannique
MH	Müller Hinton
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CP	Composés phénoliques
DBO	Demande biochimique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ERO	Espèce réactive à l'oxygène
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
LM	Lyophilisat de margines
MRS	Man Rogosa Sharpe
MS	Matière sèche
PM	Poids moléculaire
PPT	Polyphénols totaux
R	Coefficient de corrélation
TE	Teneur en eau
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra-violet
V/V	Volume / Volume
Zi	Zone d'inhibition

N°	Intitulés	Pages
01	Coupe schématique d'une olive (NEFZAOU, 1984).	5
02	Allure du fruit en fonction du cycle de maturation.	5
03	Répartition géographique naturelle de l'olivier dans le monde (SIDHOUM, 2011).	6
04	Formule chimique brute d'une fonction phénol.	12
05	Structure des acides phénoliques. a) acides cinnamiques. b) acidesbenzoïques (CHIRA, 2008).	14
06	Structure des anthocyanosides.	15
07	Structure globale d'un flavonoïde.	17
08	Structures des principaux composés phénoliques des feuilles de l'olivier (OMAR, 2010).	20
09	Effets biologiques des polyphénols (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002) (modifié).	24
10	Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres (ALFONSO, 2007).	26
11	Le piégeage des ERO par les flavonoïdes (MARFAK., 2003).	30
12	Protocole d'obtention des extraits aqueux.	46
13	Protocole d'extraction des composés phénoliques de feuilles d'oléastre par les solvants organiques.	47
14	Protocole d'obtention des polyphénols à partir des margines.	48
15	Courbe d'étalonnage pour le dosage des PPT en équivalent d'acide gallique.	50
16	Protocole du dosage des polyphénols totaux.	50
17	Rendement des extraits bruts des feuilles d'oléastre (Variété <i>chamlal</i>).	56
18	Rendement des extraits bruts organiques de margines d'olive (Variété <i>chamlal</i>).	57
19	Teneur en polyphénols totaux des extraits aqueux et organiques de feuilles de l'olivier.	58

20	Teneur en polyphénols totaux des extraits de margines.	60
21	Pourcentage de réduction du radical DPPH• par les extraits de feuilles de l'olivier.	61
22	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par les extraits de margines.	63
23	Cinétique de l'activité antioxydante des différents extraits de feuilles d'oléastre.	64
24	Cinétique de l'activité antioxydante des différents extraits de margines d'olives.	65
25	Taux de croissance (biomasse) des bactéries probiotiques en présence des extraits aqueux de feuilles d'oléastre.	66
26	Dénombrement initial des cellules viables en unités formant colonies.	67
27	Dénombrement final de cellules viables en unités formant colonies.	68
28	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) exercés par les extraits bruts de feuilles de d'oléastre sur les six souches probiotiques.	71
29	Diamètres des zones d'inhibition provoqués par les extraits de margines sur six les souches de bactéries lactiques.	74

N°	Intitulés	pages
Tableau I	Différentes filières de valorisation des margines (CHOUCHENE ,2010).	9
Tableau II	Différentes filières de valorisation des grignons d'olives.(CHOUCHENE ,2010).	10
Tableau III	Principales classes des composés phénoliques (BRUNETON, 1999; HENNEBELLE, CROZIER et <i>al.</i> ,2006).	13
Tableau IV	Bibliographie sur les mécanismes d'action et indications cliniques des extraits de feuilles d'olivier.	21
Tableau V	Structures et teneurs des monomères phénoliques rencontrés dans les margines (COLLIN et <i>al.</i> , 2011).	22
Tableau VI	Activités biologiques de quelques composés phénoliques (BRUNETON.,1999; HENNEBELLE., 2006).	25
Tableau VII	Nouvelle classification des Lactobacilles selon ATLAN et <i>al.</i> (2000).	33
Tableau VIII	Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotiques (SHAH., 2007).	37
Tableau IX	Critères de sélection des probiotiques (NOUSIAINIEN., 2004).	38
Tableau X	Les souches bactériennes utilisées dans notre étude microbiologique	44
Tableau XI	Les produits chimiques utilisés dans notre étude.	44
Tableau XII	Les dilutions réalisées pour la détermination des CMI.	54
Tableau XIII	Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne \pm SD) provoquées par les extraits de feuilles d'oléastre.	70
Tableau XIV	Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne \pm SD) provoquées par les extraits de margines.	73

Tableau XV	Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en µg/ml) retenues par les composés phénoliques de feuilles d'oléastre.	76
Tableau XVI	Les CMB et la nature de l'activité obtenue par les extraits de feuilles d'oléastre.	77
Tableau XVII	Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en µg/ml) retenues par les extraits de margines.	77
Tableau XVIII	Les CMB et la nature de l'activité obtenue par les extraits de margines.	78

Introduction

Introduction

L'utilisation de plantes par l'homme est une pratique antique (MAJINDA *et al.*, 2001). La majorité des habitants à travers le monde entier utilisent de très nombreuses plantes, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme source d'assaisonnement et comme remède en médecine traditionnelle. Cependant cette utilisation tient compte simplement des observations au cours des siècles. Cet héritage vert représente donc un énorme réservoir de composés qui attendent d'être découverts.

L'olivier (*Olea europaea*), arbre dont la culture millénaire est traditionnelle dans le bassin méditerranéen, est l'espèce la plus utilisée dans la médecine traditionnelle. Son fruit, son huile et ses feuilles fournissent d'innombrables bienfaits. Ses utilisations sont nombreuses et reconnues : domaine culinaire, thérapeutique, combustible pour l'éclairage, en cosmétologie et en parfumerie pour le soin de la peau, et aussi pour la décoration (arbre ornementale, fabrication des produits artisanaux).

Pour les pays producteurs, l'olivier est une fortune économique transmise sur plusieurs générations (UCCELLA, 2001) et avec la promotion des vertus bénéfiques de l'huile d'olive pour la santé humaine, sa demande ne cesse d'augmenter. Toutefois, elle présente l'inconvénient de générer d'énormes quantités de déchets divers, essentiellement de grandes quantités de margines dont la fraction organique complexe d'où une demande biologique élevée en oxygène (DBO) les rend un déchet industriel gravement polluant et un redoutable souci écologique dans la région méditerranéenne (FIORENTINO *et al.*, 2003).

Plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, la peroxydation des lipides au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments conduit à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Les polyphénols de synthèse sont avérés responsables de cet effet. De plus, l'usage excessif d'agents antibactériens chimiques dans la médication humaine conduit à l'apparition de souches bactériennes résistantes (MAU *et al.*, 2004) et l'altération de la flore intestinale, notamment les probiotiques.

Les bactéries lactiques « probiotiques » sont des micro-organismes constitués d'un mélange variable de plusieurs souches ou espèces de bactéries. Ils occupent des niches écologiques extrêmement variées ; notamment l'intestin humain ; ils ont la capacité de fermenter les hydrates de carbone, et de dégrader les protéines et les lipides menant à la synthèse d'une large gamme de composés élémentaires au métabolisme tels que les acides organiques, les peptides ; les composés antimicrobiens (prébiotiques) ...etc. Ces métabolites peuvent contribuer aussi aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (MOZZI *et al.*, 2010).

De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante.

La conception et la réalisation de notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de ressources végétales vu la charge potentielle de leurs extraits bruts en molécules naturelles bioactives qui commencent à avoir beaucoup d'intérêt (chercher leurs qualités, leurs

Introduction

innocuités et leurs efficacités) et font l'objet de plusieurs études pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection aliments contre l'oxydation.

Les recherches sur les polyphénols ont cependant débuté beaucoup plus tardivement que pour les autres antioxydants. Ceci est largement expliqué par la très grande diversité de leurs structures chimiques. Plusieurs centaines de molécules ont été identifiées dans les aliments, réparties en plusieurs classes.

Leurs rôles dépassent de loin leur pouvoir piègeur ou supprimeur de radicaux libres, ils sont des pigments quasi universels des végétaux, ils sont qualifiés de métabolites secondaires. Ces composés présentent plusieurs propriétés pharmacologiques, parmi lesquelles, nous citerons les propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires, vasodilatatrices, anti-cancérigènes, anti-thrombiques, anti-athérogéniques, antipyrétiques, analgésiques, d'autres chercheurs ont permis de mettre en relief d'autres propriétés comme leur activité anti-cancérigène, la réduction de la formation de molécules pro-inflammatoires ; la prévention des maladies cardiovasculaires (RODRIGO et *al.*, 2011).

Notre recherche est axée vers l'étude de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits bruts de deux sous-produits oléicoles de l'olivier sauvage (variété *Chamlal*) qui appartiennent à l'espèce (*Olea europaea L.*). Parmi les critères ayant conduit au choix de cet arbre, l'origine géographique (large répartition) sont parmi les plus populaires plantes utilisées dans le monde entier, leur utilisation fréquente par nos populations et elles représentent récemment un sujet de recherche scientifique intéressant.

*1^{ère} Partie : Recherche
bibliographique*

*Chapitre I : Olivier et
sous-produits oléicoles*

I.1. Généralités sur l'olivier

I.1.1. Origine et Histoire

L'olivier (*Olea europaea* L., Oléacées) est l'arbre emblématique de la zone méditerranéenne, l'histoire et les mythes le décrivent comme étant un symbole de force, de longévité, de paix, de foi et de fertilité (LALLAS *et al.*, 2011).

En Algérie, nos ancêtres lui ont réservé une place de choix. De ce fait, il constitue de tout temps le fond du patrimoine arboricole national, sa propagation aux quatre coins de l'Algérie montre l'attachement ancestral de l'Algérien à cette espèce et à ses produits.

D'après MOUSSOUNI (2011), il serait originaire de l'Asie mineure et étendu de la Syrie jusqu'en Grèce en passant par l'Anatolie. Son histoire se confond avec celle des civilisations qui ont vu le jour autour du bassin Méditerranéen (RAYAN et ROBARDS, 1998).

Les fossiles de feuilles d'olivier retrouvés dans les gisements du Pliocène de Mongardino (Italie), les restes fossilisés dans les couches paléolithique supérieur en Afrique du Nord, des morceaux d'oléastres et des noyaux dans les excavations de l'Énéolithique en Espagne témoignent de la longévité remarquable de cet arbre, son existence remonte au Xème millénaire avant Jésus-Christ (BITONTI *et al.*, 2000).

I.1.2. Description botanique

- **L'olivier**

C'est un arbre moyennement trapu qui peut atteindre les 15 mètres de hauteur (WAGNER, 1999), son tronc tourmenté et noueux porte à sa base de nombreux rejets dans sa condition mi-sauvage. Le bois d'olivier est brun clair veiné de marbrures sombres, il est sempervirent, ses fleurs s'épanouissent en petites grappes blanches, chaque grappe donnera un seul fruit (ARTAUD, 2008).

L'olivier est cultivé tandis que l'oléastre est sauvage (BRETON *et al.*, 2008). Ce dernier se différencie de l'olivier cultivé par ces caractères: c'est un arbrisseau, il possède des rameaux épineux et quadrangulaires, ses fruits sont petits et nombreux avec une forme elliptique à faible poids et son huile est peu abondante, il est distribué dans différents environnements, avec des altitudes différentes et des sols qui peuvent être une source très importante de sa résistance aux stress abiotiques tels que la sécheresse, le sel, le vent et la baisse de température (TERRAL et ARNOLD-SIMARD, 1996 ; ARANDA *et al.*, 2011).

L'huile d'olive est dotée d'excellentes propriétés nutritionnelles, sensorielles et fonctionnelles et occupe une place importante au niveau économique et agricole dans la région méditerranéenne. L'huile d'olive vierge est particulièrement appréciée pour sa grande stabilité par rapport aux autres huiles végétales et de sa teneur élevée en constituants tels que les acides gras monoinsaturés (AGMI) (BENDINI *et al.*, 2006).

Le parfum doux et unique de l'huile d'olive est dû particulièrement à un groupe de composants présents en très faibles quantités tels que les composés polyphénoliques, les caroténoïdes et les flavonoïdes. Certains de ces composés dont les phénols, jouent un rôle important comme antioxydants naturels qui piègent les radicaux libres de l'oxygène et préservent la qualité et la stabilité de l'huile durant des périodes prolongées de conservation, ainsi ils contribuent à la qualité organoleptique comme le goût, la saveur et la valeur nutritive (DOVERI et BALDONI, 2007).

Les fruits de l'olivier (*Olea europaea* L.) et ses produits dérivés représentent une source connue de plusieurs composants naturels d'une bioactivité importante (BOUAZIZ et *al.*, 2005),

- **Les feuilles**

Les feuilles de l'olivier sont persistantes, elles ont une moyenne de vie de trois ans. Elles sont simples, lancéolées, pointues. Sur le rameau, elles sont opposées et le pétiole est court. Les feuilles sont glabres et à bords révolutes. La face supérieure est luisante de couleur vert foncé, tandis que la face inférieure présente un aspect argenté dû à une purine.

Le dessus des feuilles exposé au soleil est protégé par une cuticule verte sombre d'une texture vernissée, imperméable. La face inférieure est duveteuse et contrôle la sortie des eaux par un poil qui le coiffe à la manière d'un parasol. En moyenne, les feuilles de l'olivier mesurent de 2 à 8 cm de long et de 0,5 à 1,5 cm de large.

- **Le fruit**

L'olive est le fruit de l'olivier à partir duquel l'huile de table est directement extraite. Il est formé de trois parties : la peau du fruit dite Epicarpe, la pulpe ou mésocarpe et l'endocarpe qui est constitué par un fusiforme rigide dont le rôle est la protection d'une seule graine à albumen huileux (figure1).

Sa forme est ovoïde, ses dimensions sont en fonction des variétés et sa couleur est en fonction du cycle de maturation passant de la couleur verte à la couleur violette ou rouge puis noire à maturité complète, vers octobre novembre, et en même temps, il se charge en l'huile (BROUSSE et *al.*, 1978) (Figure 2).

Les fleurs blanches, à corolle en tube portant quatre lobes ovales, sont groupés en grappes dressées et apparaissent à l'aisselle des feuilles vers Mai-Juin.

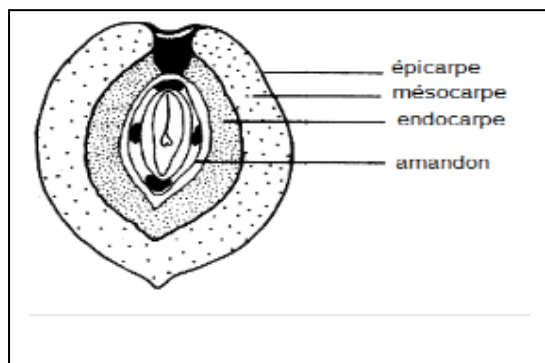


Figure 01 : Coupe schématique d'une olive (NEFZAOU, 1984).



Figure 02 : Allure du fruit en fonction du cycle de maturation.

I.1.3. Taxonomie et systématique

Olea europaea L. est un complexe formé de six sous espèces dont *Olea europaea* subsp. *europaea* qui correspond à l'olivier méditerranéen (GREEN et WICKENS, 1989). Ce dernier comprend la forme cultivée, *O. europaea* var. *europaea* et la forme sauvage ou oléastre, *O. europaea* var. *sylvestris* (SPICHIGER et al., 2002 ; DUPONT et al., 2007).

Répartition botanique de l'espèce *Olea europaea* L. (Ghedira., 2008) modifié

Règne : *Plantae*

Sous règne: *Tracheobionta* ou Plantes vasculaires

Embranchement : *Magnoliophyta*, Angiospermes, Phanérogames

Sous-embranchement : *Magnoliophytina*

Classe : *Magnoliopsida*, dicotylédones

Sous classe: *Asteridae*

Ordre : *Scrophthdariales*

Famille : *Oleaceae*

Genre : *Olea*

Espèces : *Olea europaea* L.

Sous-espèces : *Olea europaea* subsp. *Europaea* variété. *Sylvestris*

Olea europaea subsp. *Europaea* variété. *europaea*

I.1.4. Répartition et écologie de l'olivier

L'olivier est une espèce thermophile très adaptée au climat méditerranéen, au nord, il est limité par le froid et le gel alors qu'au sud, la culture est limitée par les conditions arides et sahariennes (AMOURETTI et COMET, 1998), Malgré cela, sa culture a dépassé le bassin méditerranéen et a été exportée dans plusieurs pays du monde tels l'Afrique du Sud et l'Argentine, l'Australie et les Etats unis (RUGINI et FEDILI, 1990).

Cette répartition géographique est influencée par des facteurs climatiques et pédologiques (GAUSSORGUE, 2009 ; CATRION et al., 2010) ; l'olivier résiste jusqu'à -8 à -10°C, mais les dégâts peuvent être très importants pour des basses températures (0 à -1°C) pendant la floraison. A des températures élevées (35-38°C), la croissance végétative s'arrête et à 40°C et plus, l'appareil foliacé peut être brûlé et les fruits peuvent chuter, surtout si l'irrigation est insuffisante (WALID et al., 2003).

Plusieurs centaines de divers cultivars d'oliviers géographiquement existent dans le bassin méditerranéen. Ils se distinguent par la morphologie des feuilles, la forme de drupe et la couleur, la composition de l'huile et de la phénologie (adaptation avec les climats) (BRETON et al., 2008).



Figure 03 : Répartition géographique naturelle de l'olivier dans le monde (SIDHOUM, 2011)

I.1.5. Variétés cultivées en Algérie

Une même variété d'olivier regroupe des arbres dont les caractéristiques phénotypiques sont similaires et probablement les mêmes génotypes dans chaque région.

La description des variétés d'olives cultivées en Algérie a déjà fait l'objet de nombreuses études et il en sort une large gamme de variétés (variétés à huile, variétés à olives de table et des variétés mixtes).

Les variétés cultivées en Algérie sont *Olea europaea* variété *Chamlal* (90%) qui est une variété vigoureuse, elle est réputée pour sa bonne qualité d'olive, *Olea europaea* variété *azaradj* qui constitue une variété mixte très estimée pour la conservation en olive verte mais moins recommandés pour l'huilerie, *Olea europaea* variété *limli* (10 %) utilisée pour la fabrication de l'huile, la relative acidité de son huile est compensée par la régularité de sa production, et *Olea europaea* variété *Aberkane* qui est une autre olive de conserve mais peut également procurer des résultats satisfaisants en huilerie (TAMENDJARI et al., 2004; BENAMAR, HADJOU et al., 2013).

Ces variétés cohabitent avec une multitude d'autres : locales (Sigoise, Bouricha...) et étrangères (Cornicabra, Sevillane, Blanquette, Lucques, Picholine).

La qualité de l'huile d'olive est influencée par plusieurs facteurs à savoir la variété de l'olivier, la qualité du sol, les conditions climatiques ainsi que la qualité de l'ensemble des procédés de production de l'huile d'olive.

I.2. Valorisation de sous-produits oléicoles

I.2.1. Caractéristiques

L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile d'olive et les olives de table comme produits principaux, des sous-produits de type liquide (margines) et solide (grignons et produits de la taille des oliviers (feuilles et brindilles)). Les quantités des produits de la taille ont été estimées à 25 kg de feuilles et brindilles (diamètres inférieurs à 3 cm) produites par an et par arbre, selon NEFZAOU (1995). Par ailleurs, les quantités des grignons d'olive et des margines dépendent étroitement du procédé de trituration appliqué.

I.2.2. Les feuilles de l'olivier

Leur quantité avant l'entrée dans l'huilerie est estimée aux environs de 5kg de matières sèches par arbre et par an (NEFZAOU, 1987). La composition chimique des feuilles et brindilles varie en fonction de nombreux facteurs; variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations (NEFZAOU, 1995). La teneur en matières azotées totales des feuilles varie de 9 à 13%, alors que celle des rameaux ne dépasse guère 3 à 6 %. La teneur en lignine est de 18 à 20 %.

Les résidus de la taille ont des applications nombreuses, entre autres l'utilisation dans l'alimentation animale (BOTSOGLOU et al., 2010), l'utilisation comme combustibles, servir de compost, ou constituer la matière première dans l'industrie du papier ou même la fabrication des meubles (NEFZAOU, 1995).

Une étude récente a été menée afin d'améliorer la digestibilité et la valeur nutritive de cette biomasse (feuilles d'olive et brindilles) par un traitement biologique (FAYED *et al.*, 2009).

D'autres études ont porté sur la bioconversion des polyphénols des feuilles en antioxydants destinés aux industries agroalimentaires et pharmaceutiques (BOUAZIZ *et al.*, 2008 ; LEE *et al.*, 2009). Par ailleurs, à cause de la disponibilité saisonnière des feuilles d'oliviers, d'autres auteurs ont mis l'accent sur le séchage des feuilles afin d'assurer une conservation et une disponibilité de cette biomasse toute l'année pour des éventuelles applications (MOLINA-ALCAIDE, 2008; ERBAYET-ICIER, 2009).

I.2.3. Le grignon d'olive

Ce sous-produit résulte de l'extraction de l'huile d'olive. Il renferme la plus grande partie de la matière sèche de l'olive, constituée essentiellement de l'épicarpe du fruit (pellicule), le mésocarpe (pulpe ou chair de l'olive) et l'endocarpe (coque et amandon de noyau). (NEFZAUI, 1987), leur DBO et DCO peuvent atteindre plus de 100 et 200 g/l respectivement (DERMECHE *et al.*, 2013).

La composition des grignons dépend étroitement de la variété d'olives, le degré de maturation des olives et le système employé lors de l'extraction de l'huile d'olive.

Contrairement aux autres tourteaux oléagineux, les grignons d'olive bruts sont pauvres en matières azotées et riches en cellulose brute. Ils restent relativement riches en matières grasses (DPV, 2009).

I.2.4. Les margines

Les margines, parfois dénommées alpechines, sont des effluents liquides très acides générés par la fabrication de l'huile d'olive essentiellement durant les mois de novembre et de décembre, leur couleur peut être brune rougeâtre ou noire, Leur odeur rappelle celle de l'huile d'olive, mais elle peut devenir gênante lors des phénomènes de rancissement ou de fermentation anaérobie (RANALLI, 1991 ; ZBAKH *et EL ABASSI*, 2012).

Les composés fondamentaux des margines sont l'eau (83.2 %), les substances organiques (15 %) et les substances minérales (1.8 %) (FIESTAS *et BORJA*, 1992).

Les caractéristiques des margines diffèrent en fonction du type du procédé d'extraction de l'huile, de la qualité des olives et de la conduite des opérations d'extraction (MOUNCIF *et al.*, 1993).

Les déchets oléicoles représentent un réel problème environnemental dans la plupart des pays oléicoles et plus particulièrement dans les pays Méditerranéens, c'est pourquoi la mise en place de procédés de valorisation est plus qu'essentiel, en effet, elle présente un double intérêt, D'une part, elle permet de résoudre un problème environnemental, mais aussi, et surtout de subvenir au besoin économique national.

Tableau I : Différentes filières de valorisation des margines. (CHOUCHENE ,2010).

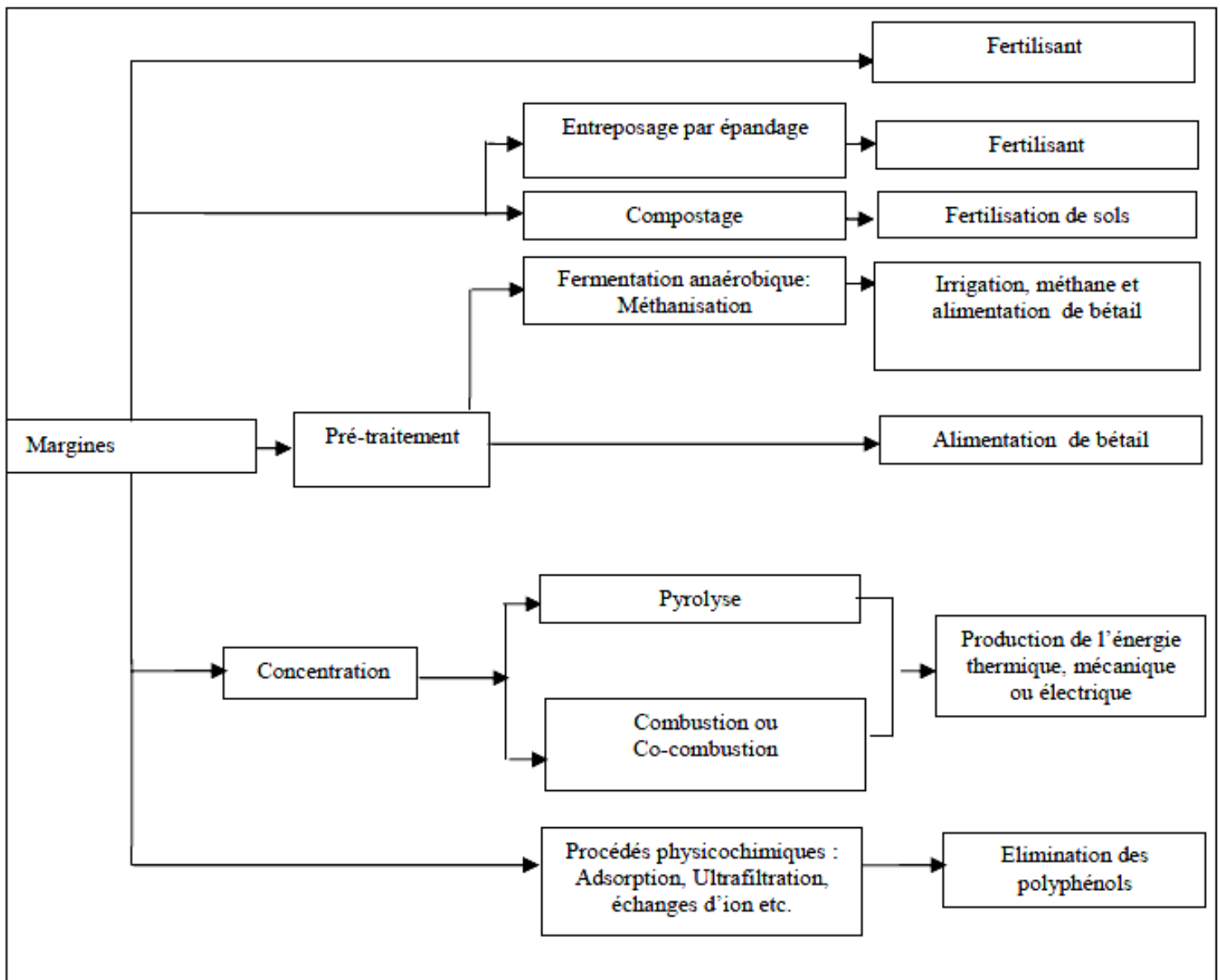
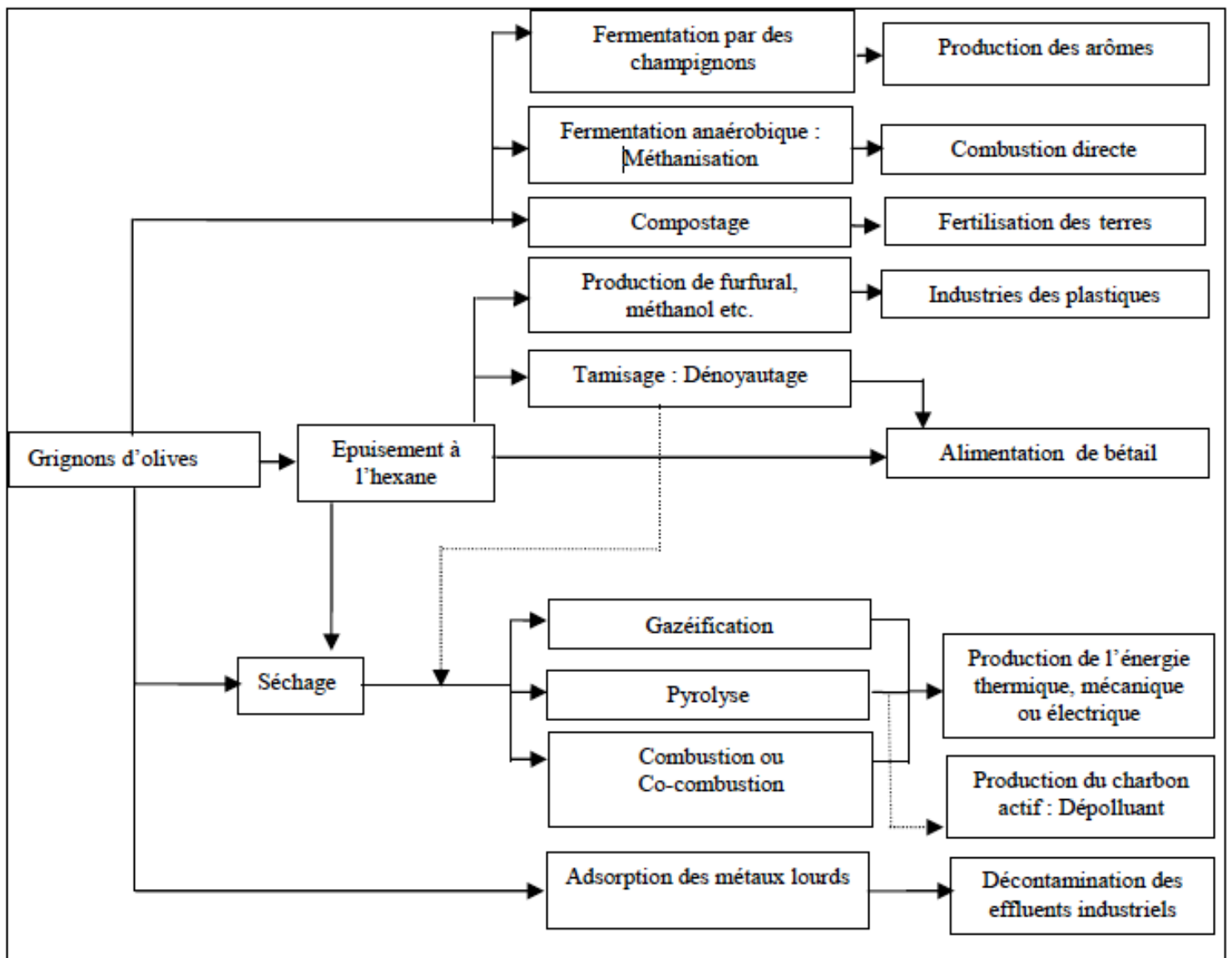


Tableau II : Différentes filières de valorisation des grignons d'olive. (CHOUCHENE ,2010).



*Chapitre II : polyphénols
et bioactivités*

II. Les composés phénoliques

II.1. Généralités et définition

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des métabolites secondaires, produits à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), forment le groupe des composés organiques phytochimiques le plus important, et le plus spécifique dans le royaume des végétaux avec plus de 10 000 molécules caractérisées jusqu'à aujourd'hui et qui ne cesse d'augmenter (BETA et *al.*, 2005), ils appartiennent au métabolisme secondaire.

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, Sont des molécules très diversifiées, constituées d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles libres ou engagées dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (BRUNETON, 1993 ; BALASUNDRAM et *al.*, 2006).

La plupart de ces molécules sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout de la phénylalanine, qui sont formés de façon variable suivant les végétaux (GUIGNARD, 2000).

Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (HENNEBELLE et *al.*, 2004). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (HARBONE, 1993).

Leur grande diversité structurale rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (BRUNETON, 1993).

Sont très inégalement répartis chez les végétaux mais dont le niveau d'accumulation peut quelquefois atteindre des valeurs élevées (MACHEIX et *al.*, 2005).

La notion de « métabolite secondaire » résultait initialement de trois groupes d'observations : d'abord une difficulté à attribuer à ces métabolites une fonction précise dans la physiologie même de la plante, ensuite une extrême diversité de répartition de ces composés selon les végétaux, quelquefois entre des espèces très voisines ou même entre différentes sous espèces ou variétés à l'intérieur d'une même espèce, enfin une certaine « inertie biochimique » car ces substances sont rarement remobilisées dans la plante après qu'elles y ont été accumulées (GRESELE et *al.*, 2011).

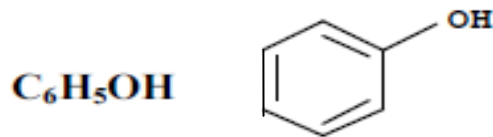


Figure 04 : Formule chimique brute d'une fonction phénol.

II.2. Localisation et biosynthèse des composés phénoliques

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule.

Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol (WINKEL, 2004; MACHEIX *et al.*, 2005).

D'autres organites du cytoplasme, comme des vésicules golgiennes ou des chloroplastes, peuvent participer à la biosynthèse des composés phénoliques mais ce ne sont pas des lieux d'accumulation (MACHEIX *et al.*, 2005).

Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme (TOMAS-BARBERAN et ESPIN, 2001; CHEYNIER et SARNI-MANCHADO, 2006).

Les composés phénoliques interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur confère des fonctions très spécifiques (DESJARDIN, 2008).

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, majoritairement dérivant :

- de l'acide shikimique, Cette voie shikimate conduit à la formation des oses, puis aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) (YAHIAOUI, 2012), puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (BRUNETON, 1993 ; KNAGGS, 2003) ;
- Dans les flavonoïdes et les stilbénes, c'est le cas d'un des deux cycles aromatiques tandis que l'autre provient de la condensation de trois acétyl-CoA (voie des polycétides). La voie de l'acide acétique seule ne conduit qu'à peu de polyphénols (ex : la phytoalexine de la carotte) (BRUNETON, 1999) ;




- Les stilbènes, comme les flavonoïdes, sont donc synthétisés par la voie de la phénylalanine/polymalonate. Néanmoins, la dernière étape est catalysée par la stilbéne synthase pour les stilbènes et par la chalcone synthase pour les flavonoïdes (JEANDET et *al.*, 2002 ; SOLEAS et *al.*, 1997), double origine biosynthétique, cela est encore accrue par la participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

II.3. Structures chimiques et classification

Les composés phénoliques sont classés en différentes classes selon le nombre d'atomes de carbones ; le tableau III récapitule les principaux groupes, leur structure de base, ainsi que quelques exemples de plantes qui les renferment :

Tableau III : Principales classes des composés phénoliques (BRUNETON, 1999; HENNEBELLE, CROZIER et *al.*, 2006).

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples	Structure de base	Plantes
6	C ₆	Phénols simples	Catéchol, hydroquinone		Busserole
7	C ₆ -C ₁	Acides Phénols benzoïques	Acide gallique, Acide salysalique, Vanilline		Artichaut Saule
8	C ₆ -C ₂	Acétophénone	3-acétyl6-Méthoxybenzaldehyde Gallacetophénone		Saule
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide ρ -hydroxyphénylacétique		
9	C ₆ -C ₃	Acide hydroxycinamique	Acide coumarique, Acide caféique		Romarin Marronnier d'inde
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculétine		
10	C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Shikonine		Drosera spp.

13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Bellidifoline, mangotine		Racine de gentiane, Centaurée
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stiblènes	Hydrangénol, Pinosylvine		Raisin, pin
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine Roténoïde		Ginkgo Thym Camomille
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Matairésinol	—	Chardon
30	(C ₆ -C ₃ - C ₆) ₂	Bi flavonoïdes	Amentoflavone Hinokiflavone	—	Carcinia Hypericum
N	(C ₆ -C ₃ -C ₆) n	Tanins condensés(proant hocyanidols)	Aesculitanins	—	Marronnier d'inde, vigne

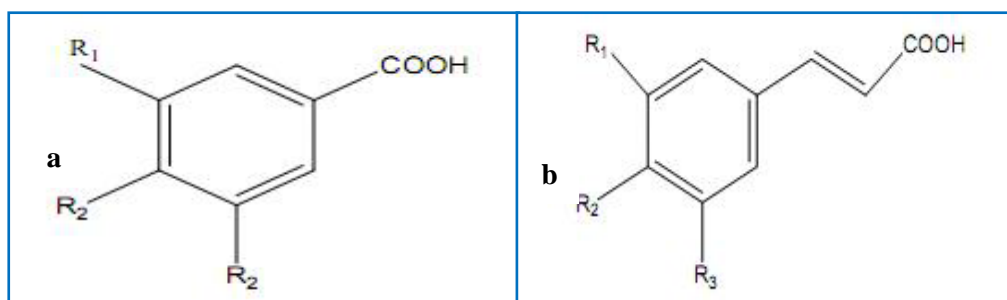


Figure 05 : Structure des acides phénoliques. a) acides cinnamiques. b) acides benzoïques (CHIRA, 2008).

II.3.1. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (TSIMOGIANNINS et OREOPOULOU, 2006).

Actuellement, environ plus de 4000 composés flavoniques sont connus (EDENHARDER et GRUNHAGE, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C₆-C₃-C₅ de type phényl-2-benzopyrane (YAO et *al.*, 2004).

a) Flavonols

Les flavonols se caractérisent par un hétérocycle oxygéné relativement oxydé.

b) Flavones et Flavanoïdes

Les Flavones et les flavanoïdes possèdent également la structure de base C6-C3-C6.

c) (Prényl) chalcones et dihydrochalcones

Les molécules ouvertes ne possédant pas la double liaison conjuguée au carbonyle sont appelées dihydrochalcones.

d) Anthocyanidines-anthocyanines

Ces termes seront fréquemment utilisés pour les oligomères (respectivement 2, 3...unités). L'appellation de flavanoïdes simples sera conservée jusque 7 à 8 unités. Pour un plus grand nombre d'unités monomériques, la terminologie tannin sera retenue (SANTOS-BUELGA et SCALBERT, 2000).

Les anthocyanidines-anthocyanines jouent un rôle prépondérant dans la coloration des nombreux aliments (cerises, myrtilles, raisins rouges, cacao).

Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavonoïde » chargé positivement (C6-C3-C6) (VIVAS DE GAULEJAC, 2001). Les anthocyanines se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation ainsi que par la nature des sucres liés à la molécule.

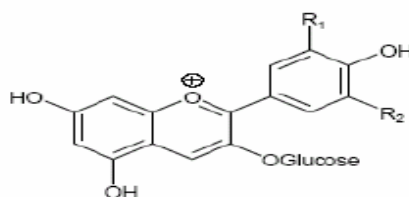


Figure 06 : Structure des anthocyanosides.

II.3.2. Acides phénoliques et tannins hydrolysables

Parmi les acides phénoliques. On distingue les dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1, 2), ceux de l'acide cinnamique (+ leurs dérivés estérifiés), et des coumarines, tous possédant une structure du type (C6-C3) (HOLLMAN, 2001).

a) Acides hydroxybenzoïques

Les structures des acides hydroxybenzoïques varient suivant les hydroxylations et les méthoxylations sur le cycle phénolique aromatique (THOMÁS-BARBERAN et CLIFFORD, 2000).

b) Acides hydroxycinnamiques

Contrairement aux acides hydroxybenzoïques qui se présentent majoritairement sous forme libre, les acides hydroxycinnamiques peuvent exister sous une forme estérifiée par l'acide quinique (BORCHERS *et al.*, 2000 ; JALAL et COLLIN, 1977).

c) Coumarines

Ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides ortho-hydrocinnamiques. Elles se trouvent à l'état libre ou combiné, sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense. Ces composés sont connus pour leurs propriétés anti-coagulantes (VIVASDE GAULEJAC, 2001).

d) Tannins hydrolysables

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (HASLAM, 1996 ; COWAN, 1999).

Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toute les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (SCALBERT, 1991). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

Les tannins hydrolysables (T_H) sont des esters d'acides phénoliques (acide gallique) associés à un polyol (habituellement le glucose) (CLIFFORD, 2000). Ils sont divisés en ellagitannins et gallotannins (VIVAS DE GAULEJAC, 2001). Les gallotannins libèrent par hydrolyse acide, hydrolyse basique, à l'eau chaude ou par action enzymatique de l'acide gallique (WOLLGAST et ANKLAM, 2000).

II.3.3. Stilbénes

Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C2-C6 comme les flavonoïdes, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbénes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (CROAZIER *et al.*, 2006). Plus de 30 stilbénes et glycosides de stilbénes sont présents naturellement dans le règne végétal. La structure chimique de base des stilbénes est composée de deux cycles aromatiques joints par un pont méthylène.

II.3.4. Lignines et subérines

Les lignines et subérines sont des précurseurs de polymères pariétaux des plantes constituant des facteurs de défense contre les agents pathogènes. Chimiquement, les lignines sont des polymères d'alcools (dérivant des acides férulique, sinapylique et p-coumarique). Par contre, les subérines sont des polyesters des acides férulique et p-coumarique avec des acides aliphatiques (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2002).

Lignanes : Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropioniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles.

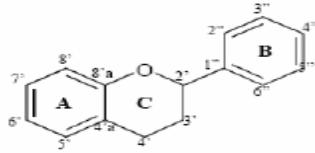


Figure 07: Structure globale d'un flavonoïde.

II.4. La disponibilité biologique des composés phénoliques

Il y'a eu des avancées ces dernières années concernant l'absorption et le métabolisme des polyphénols, il est évident que la plupart des classes en sont absorbées suffisamment pour offrir des possibilités intéressantes d'exercer des effets biologiques (WILLIAMSON et MANACH, 2005).

Le taux d'absorption intestinale est déterminé par la structure des polyphénols qui dépend de certains facteurs comme le degré de glycosylation/acylation, leur structure, le poids moléculaire, le degré de polymérisation et de leur solubilité (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000).

II.5. Méthodes d'extraction de composés phénoliques

Quatre propriétés peuvent être exploitées pour extraire les polyphénols d'une matrice complexe : leur polarité, leur acidité, leur volatilité ou leur taille.

a) Extraction des polyphénols sur base de leur polarité

COUNET et COLLIN (2003), ont montré qu'un mélange acétone/eau/acide acétique (70/28/2, v/v) était optimal pour l'extraction des flavanoïdes, surtout s'il s'agissait d'oligomères. Quand le méthanol est utilisé, il est déconseillé d'y ajouter de l'eau.

JERUMANIS (1969) suspecte une dépolymérisation des proanthocyanidines en présence de méthanol. Des solvants de polarité analogue sont généralement employés pour récupérer les flavonols et les phényl flavonoïdes.

Pour les anthocyanidines, le méthanol acidifié (1 % HCl) et l'acétone aqueux (70/30) sont les solvants les plus fréquemment utilisés. Le second semble toutefois préférable pour éviter la formation de pyrano-anthocyanidines (LU et FOO, 2001).

Les solvants non miscibles à l'eau n'extraient pas très bien les flavonoïdes (ZHAO et *al.*, 2006). De manière générale, pour l'étude d'une phase aqueuse. Un lavage à l'eau est généralement effectué avant l'élution des polyphénols par l'éthanol.

Les solvants apolaires sont par contre recommandés pour récupérer sélectivement les acides tanniques de haut poids moléculaire. C'est ainsi qu'en utilisant l'acétate d'éthyle, il est possible de concentrer un extrait de gallotannins à raison de plus de 50 % avec les fractions contenant plus de sept unités galloyles (TIAN et *al.*, 2009).

Les arômes dérivés des acides hydroxycinnamiques sont quant à eux habituellement extraits par des solvants apolaires tels que le chloroforme, le diéthyléther ou le Fréon 1.

b) Extraction des polyphénols sur base de leur acidité

Avec leur pKa proche de 10, il est possible de faire passer les phénols de la phase aqueuse vers le solvant organique, ou l'inverse, selon le pH (CALLEMIEN et COLLIN, 2009 ; Milligan et *al.*, 2002 ; STEVENS et PAGE, 2004). Ceci peut être très intéressant lorsque l'on veut séparer les phénols d'intérêt d'autres molécules de même polarité.

Une acidification à température plus élevée est parfois utilisée pour libérer certaines formes phénoliques liées (acides hydroxybenzoïques ou hydroxycinnamiques et flavonols) (GARCI et *al.*, 2004 ; NARDINI et GHISELLI, 2004 ; VANBENEDEN et *al.*, 2006).

Beaucoup de polyphénols sont instables à des pH extrêmes. Une dégradation est souvent observée à des valeurs proches de 6 (autooxydation) (ZHU et *al.*, 2002). Un pH trop bas est à déconseiller pour l'étude des glycosides (flavonols, flavanoïdes ou stilbénes).

De plus, les oligomères de procyanidines sont connus pour se dépolymériser à pH inférieur à 4 (ZHU et *al.*, 2002). À des valeurs de pH en dessous de 4, des oxydations enzymatiques peuvent également prendre place, donnant des dimères liés par liaisons interflavoniques C-O (GUYOT et *al.*, 1996).

c) Extraction des polyphénols sur base de leur volatilité

Les arômes appartenant à la famille des phénols volatils peuvent être extraits d'une matrice complexe par distillation sous vide, ou par une chromatographie en phase gazeuse (FRITSCH et SCHIEBERL, 2003 ; STEINHAUS et SCHIEBERL, 2000).

Les flavanoïdes, les stilbénes et les chalcones ne sont par contre pas assez volatils pour être extraits de cette manière. Toutefois, ils peuvent le devenir après dérivatisation, et ce, avant leur injection en chromatographie gazeuse (JERCOVIC et *al.*, 2008 ; LUAN et *al.*, 2000).

La dérivatisation est également parfois employée pour augmenter la sensibilité de la détection en sortie de colonne (ex.: détecteur à capture d'électrons).

d) Extraction des polyphénols sur base de leur taille

Diverses méthodes ont été développées pour étudier les polyphénols de plus grandes tailles. La dialyse peut être exploitée pour séparer les gros oligomères de proanthocyanidines

de plus petits analogues. La chromatographie d'exclusion (SEC) ou perméation sur gel (GPC) permettent un fractionnement selon le poids moléculaire (YANAGIDA *et al.*, 2002, 2003).

e) Autres méthodes

Des enzymes attaquant les polysaccharides permettent parfois d'améliorer le taux de récupération des polyphénols (PINELO *et al.*, 2006). La température d'extraction est également un paramètre à optimiser (25-60 °C) (CALLEMIEN *et al.*, PINELO *et al.*, 2005). Les colonnes en phase inverse peuvent séparer presque tous les composés phénoliques. Des systèmes binaires d'élution sont préconisés.

II.6. Détection et analyse des composés phénoliques

a) Absorption UV

Tous les CP végétaux absorbent en UV (ultraviolet) et certains d'entre eux absorbent également dans le visible. Le spectre d'absorption résulte de la présence simultanée du cycle benzénique, des fonctions hydroxyles phénoliques et des différentes doubles liaisons présentes dans la molécule (MACHEIX *et al.*, 2005 ; MARTHA, 2008).

En sortie d'HPLC, les phénols peuvent être détectés par absorption UV ou par fluorimétrie. Le spectre UV des proanthocyanidines présente deux maxima, le premier entre 200 et 240 nm, le second à 278-280 nm (MCMURROUGH et MCDOWELL, 1978).

Au sein des flavonoïdes, les flavonols sont habituellement quantifiés par absorption UV à 350 nm. Par ailleurs, les maxima d'absorption UV permettent aisément de distinguer les prénylchalcones (X = 370 nm) des flavanones (X = 270-295 nm). Les anthocyanidines, étant colorées, seront analysées dans le visible (AWIKA *et al.*, 2004). Les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques sont connus pour absorber à 254 à 280 et à 320-330 nm.

b) Détection électrochimique (ECD-HPLC)

L'ECD a été employée intensivement pour l'étude des acides hydroxybenzoïques, des acides hydroxycinnamiques, des flavonols et des flavanoïdes. Il s'agit d'un outil extrêmement sensible pour la caractérisation de ces antioxydants (bonne sensibilité et sélectivité beaucoup plus grande) (MADIGAN *et al.*, 1994).

c) Olfactométrie (GC)

Dans le cas des phénols volatils, la GC-Olfactométrie est souvent utilisée comme premier détecteur. Juste en appliquant le nez humain à la sortie de la colonne GC, des traces d'arômes peuvent en effet être repérées au sein d'une multitude de composés inactifs. Pour obtenir des données quantitatives, des dilutions successives de l'extrait sont habituellement analysées.

d) Méthode colorimétrique

La méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-ciocalteau, cette méthode très sensible mais peu spécifique car beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer, en particulier l'acide ascorbique.

II.7. Les composés phénoliques des olives et produits dérivés

• Les feuilles d'olivier

La teneur en composés phénoliques dans les feuilles d'olivier varie entre 2,8 mg/g de matière sèche (ALTIOK et *al.*, 2008) et 44,3 mg/g de matière sèche (BOUDHRIOUA et *al.*, 2009). Elle peut même dépasser les 250 mg/g de matière sèche (MYLNAKI et *al.*, 2008).

La variation de la concentration des composés phénoliques dans les feuilles d'olivier, citée dans la littérature, dépend de la variété de l'olivier, des conditions climatiques, la période de l'échantillonnage.

En plus de ces facteurs de variabilité, il s'ajoute l'effet de la méthode de préparation des feuilles d'olivier (déshydratation et broyage), du procédé et des techniques d'analyses qualitative et quantitative des composés phénoliques (ALTIOK et *al.*, 2008).

L'oleuropéine, le composé phénolique majoritaire des feuilles d'olivier. ALTIOK et *al.*, (2008) ont trouvé que l'oleuropéine représente 29%, en terme de pourcentage d'abondance dans un extrait phénolique de feuilles d'olivier, caractérisé par un pouvoir antioxydant important résultant des synergies et antagonismes des divers composés qui le constituent.

Les composés phénoliques dans les feuilles d'olivier sont très divers. Elles contiennent des monomères et des polymères phénoliques. Leur composition phénolique a fait l'objet de nombreuses études.

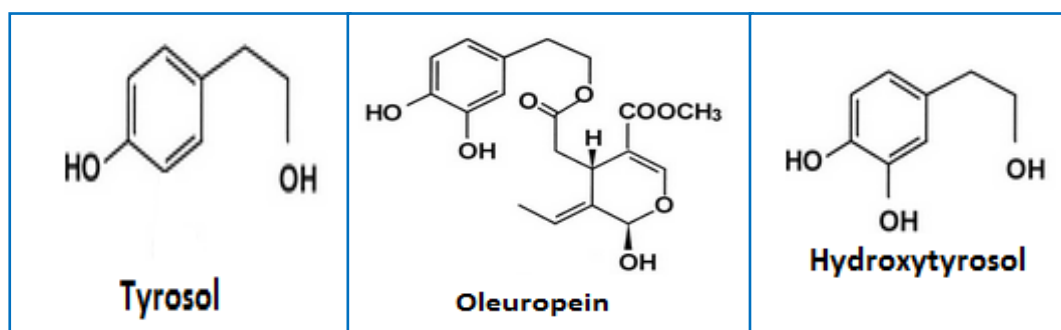


Figure 08 : Structures des principaux composés phénoliques des feuilles de l'olivier (OMAR, 2010).

Tableau IV: Bibliographie sur les mécanismes d'action et indications cliniques des extraits de feuilles d'olivier.

Mécanismes d'action et indications cliniques	Références
Activité antioxydante Activité anti-microbienne Activité antivirale (contre VHSV) Activité antivirale (contre HIV) Activité anti-fongique Activité gastro-protective Activité hypo-glycémiante Activité hypo-tensive	ALTIOK <i>et al.</i> , 2008 ; LEE <i>et al.</i> , 2009 ; LEE <i>et al.</i> , 2010 ; KIRITSAKIS <i>et al.</i> ; Hayes <i>et al.</i> , 2010. MICOL <i>et al.</i> , 2005 ; PEREIRA <i>et al.</i> ; BAO <i>et al.</i> , 2007 ; SUDJANA <i>et al.</i> , 2009 ; LEE <i>et al.</i> , 2010. TAKESHI <i>et al.</i> , 2007 (brevet) ; KORUKLUOGLU <i>et al.</i> , 2008 ; DEKANSKI <i>et al.</i> , 2009. PERRINJAQUET-MOCCEZZI <i>et al.</i> , 2008 ; SUSALIT <i>et al.</i> , 2011. JEMAI <i>et al.</i> , 2008 ; MILJKOVIC <i>et al.</i> , 2009 ; ESMAEILI-MAHANI <i>et al.</i> , 2010.
Activité hypo-lipidémique Activité neuro-protective Activité vasodilatateur Activité anti-cancérigène Activité anti-leucémique (effet antiprolifératif des cellules leucémiques humaines) Action anti-vieillessement	JEMAI <i>et al.</i> , 2008. MOHAGHEGHI <i>et al.</i> , 2011. SINGH <i>et al.</i> ; SCHEFFLER <i>et al.</i> , 2008 ; FONOLLA <i>et al.</i> , 2010. KINURA <i>et al.</i> SUMIYOSHI, 2009 ; BOUALLAGUI <i>et al.</i> , 2011 TADASHI ; THOMAS <i>et al.</i> , 2006 ; JULIAN CASTILLO <i>et al.</i> , 2010.

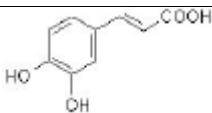
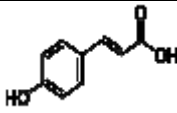
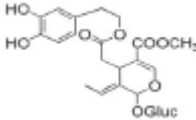
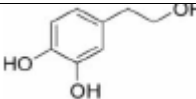
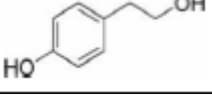
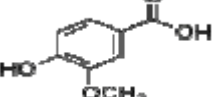
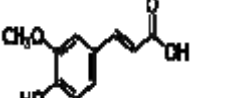
• **Les margines**

Contenant principalement les polyphénols dont le tyrosol et l'hydroxytyrosol, ce dernier est le plus abondant des monomères phénoliques (FKI *et al.*, 2005 ; DEMARKO *et al.*, 2007 ; AMARAL *et al.*, 2008). La composition phénolique des margines varie en fonction de la composition des olives (FKI *et al.*, 2005), elle est dix fois plus abondante dans les margines que dans l'huile.

Les CP à haut poids moléculaire présents dans les margines sont, essentiellement, des tanins dont la concentration peut atteindre 12 g/l (SERAPHIM *et al.*, 2008). Le

catécholmélaniquinique est un flavotanin, il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines (AISSAM, 2003).

Tableau V: Structures et teneurs des monomères phénoliques rencontrés dans les margines (COLLIN et al., 2011).

Composés phénoliques	structure	teneurs	Références
Acide caféique (mM)		0.32-1.36	D'ANNIBALE et al., 2004 ; EI HADJOUJI et al., 2007
Acide <i>p</i> -coumarique (mM)		0.19-0.57	D'ANNIBALE et al., 2004 ; EI HADJOUJI et al., 2007
Oleuropéine (mM)		0.056	EI HADJOUJI et al., 2007
Hydroxytyrosol (mg.L ⁻¹)		37.9-143.34	FKI et al., 2005 ; ERGUL et al., 2009
Tyrosol (mg.L ⁻¹)		8.51-9.43	FKI et al., 2005 ; ERGUL et al., 2009
Acide vanillique (mg.L ⁻¹)		20	AZABOU et al., 2007
Acide férulique (mg.L ⁻¹)		95	D'ANNIBALE et al., 2004 ; FKI et al., 2005

- **Les olives de tables**

Selon OWEN, (2003), dans les olives de table vertes, un seul CP est prépondérant, tant dans la pulpe des olives que dans la saumure, il s'agit de l'hydroxytyrosol.

Pour les olives noires, quatre CP sont présents en quantités considérables : l'hydroxytyrosol, l'acide dihydro-caféique, tyrosol, et l'acide dihydro-*p*-coumarique. Cependant, l'hydroxytyrosol est majoritaire puisqu'il représente 35% des CP totaux.

- **Les grignons**

Cette partie du fruit retient une fraction importante de composés phénoliques, Le -1-pinorésinol lignane est le prédominant dans le noyau (SERVILI et al., 2009), il est le principal

CP caractérisé par HPLC couplée à la spectroscopie de masse d'ionisation (SILVA *et al.*, 2010).

- **L'huile d'olive**

L'huile contient les formes aglyconiques des phénols, qui sont plus liposolubles (VISIOLI et GALLI, 2002). Les phénols hydrophiles sont les plus abondants des antioxydants de l'huile d'olive vierge (SERVILI et MONTEDORO, 2002). Ils sont répartis en plusieurs classes, on trouve les acides phénoliques (gallique, protocatéchique, p-hydroxybenzoïque, vanillique, caféique, syringique, p-coumarique, férulique et cinnamique), les flavonoïdes, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine (BRENES *et al.*, 2000). Les lignanes en sont les plus concentrés dans l'huile (SERVILI *et al.*, 2004).

II.8. Rôles des composés phénoliques dans les aliments et les végétaux

Pour COUNET et COLLIN(2003), l'activité antioxydante par gramme de composé phénolique augmente avec le degré de polymérisation. Ainsi une étude récente, montre que l'activité antioxydante augmente avec le nombre de groupement galloyls (TIAN *et al.*, 2009).

L'homme ingère avec ses aliments environ un gramme de polyphénols chaque jour (CHUN *et al.*, 2007 ; OVASKAINEN *et al.*, 2008), soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E et l'on estime que les fruits et légumes contribuent pour moitié à ces apports.

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Les activités biologiques relatives à ces derniers sont relativement diversifiées. Chaque classe chimique de polyphénols semble être utilisée pour ses vertus spécifiques (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002) ; ils peuvent en effet intervenir :

- Comme une source potentielle d'antioxydants naturels et qui peuvent être utilisés dans l'industrie pharmaceutique (SAVARESE *et al.*, 2007) ;
- Dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions avec leur environnement biologique et physique (microorganismes symbiotiques ou parasites, les champignons, les insectes), résistance aux UV, ce qui explique leur localisation dans les tissus externes (GOULD et LISTER, 2006). soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux ;
- Un rôle de signal (TREUTTER, 2006), des flavonoïdes permettent la mise en place de la symbiose entre des Fabacées et des bactéries, ce qui permet à ces plantes de fixer directement l'azote atmosphérique. Ils participent aux phénomènes de pollinisation puisqu'ils sont responsables de la coloration des fleurs (MACHEIX *et al.*, 2005) ;
- Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des

organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par transformation (LUGASI et *al.*, 2003 ; DICKO et *al.*, 2006) ;

- Peuvent contenir des traces d'éléments vitaux tels que le sélénium, le fer, le zinc, la vitamine C, la β carotène et une grande partie d'acides aminés (POLZONETTI et *al.*, 2003) ;
- Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau (HENNEBELLE et *al.*, 2004).

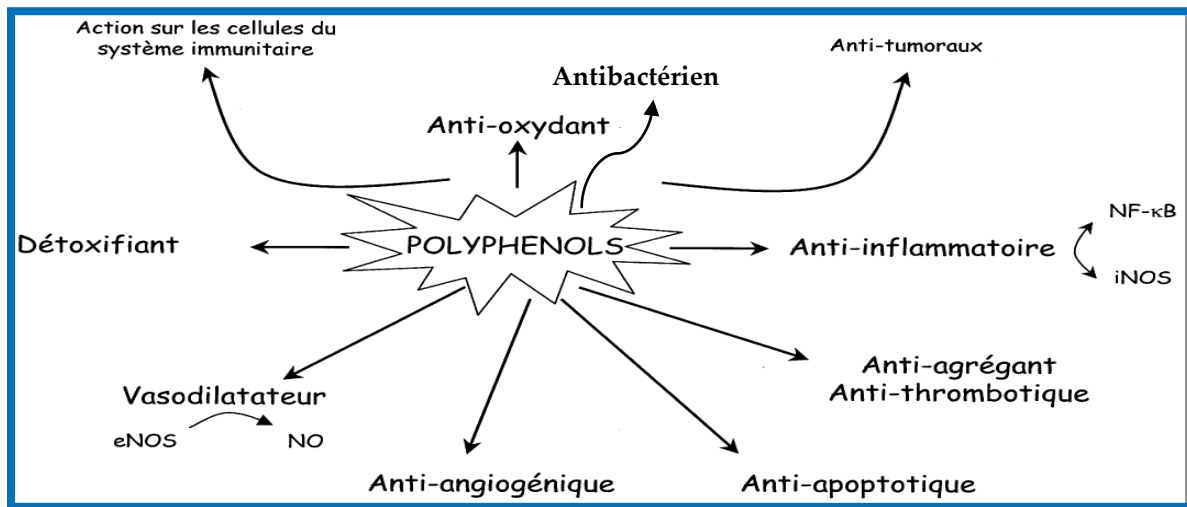


Figure 09 : Effets biologiques des polyphénols (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation.

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

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

II.9. Stress oxydatif

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais il peut être également une source d'agression pour ces derniers. En effet, des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition (EKOUMOU, 2003).

Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont, l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical superoxyde O_2^- , les peroxydes alkyles ROOH et les radicaux hydroxyles OH, les peroxydes ROO et alkoxydes RO (CAVINA, 1999).

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule.

Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO). Dans certaines conditions pathologiques, ces RLO ainsi que leurs dérivés sont produits de façon excessive. Parmi les RLO, l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) joue un rôle clé dans l'inflammation, sont aussi impliqués dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (GUINEBERT et *al.*, 2005).

L'anion superoxyde constitue la première forme radicalaire capable d'agresser les composantes cellulaires et matricielles (AFONSO *et al.*, 2007).

Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires tels que l'oxygène singulet¹O₂, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le nitroperoxyde (ONOOH), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (FAVIER, 2003).

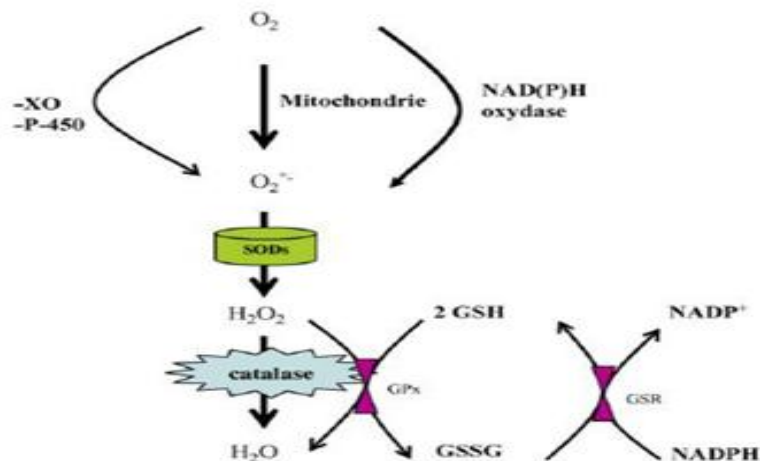


Figure10 : Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres (ALFONSO, 2007).

II.9.1. Définition du radical libre et le stress oxydant

Certains radicaux libres sont utilisés par l'organisme comme médiateurs régulant les fonctions cellulaires comme la prolifération et la mort cellulaire programmée (apoptose), impliquant des modifications de l'expression génique (HADDAD, 2002).

Le stress oxydatif est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus, lorsqu'ils sont soumis à un déséquilibre entre la production de radicaux libres ou pro-oxydants et les systèmes de défenses antioxydants, ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires (GAMMOUDI *et al.*, 2013).

L'exposition chronique au stress oxydatif peut favoriser l'apparition de cancers et maladies cardiovasculaires (FAVIER, 2006 ; NKHILI, 2009). De point de vue terminologique, l'ensemble des radicaux libres et des espèces réactives non radicalaires est souvent connu sous le nom des espèces réactives de l'oxygène ou ERO (LEV *et al.*, 2007).

II.9.2 Biosynthèse et origine de production des ERO

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. La génération est initiée pendant la respiration, puis facilitée par l'implication de

divers facteurs physiologiques et environnementaux (UV, radiation, ozone, cigarette, pollution...). Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (GAUCHE et HAUSSWIRTH, 2006).

Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux:

- Des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (AURAUSSEAU, 2002) ;
- Des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées (MILAN, 2004 ; VAN ANTWERPEN, 2006) ;
- Du système xanthine déshydrogénase/ oxyde activé lors d'ischémie-reperfusion (LI et *al.*, 2002 ; VALKO et *al.*, 2004 ; VALKO et *al.*, 2006) ;
- D'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et le rayonnement (L'AMER, 2003).

II.9.3. Conséquences du stress oxydatif

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. Ses conséquences biologiques seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire.

De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion ; des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates.

L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles.

Cette agression appelée « stress oxydatif » (RAHMAN, 2002). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (AURAUSSEAU, 2002 ; VALKO et *al.*, 2006). Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies (ARUOMA, 1998).

Parmi elles, nous citons, les maladies d'Alzheimer (SMITH et *al.*, 1996 ; SMITH et *al.*, 2004), de Parkinson (BOLTON et *al.*, 2000), de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (MI et *al.*, 2008), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (JHA et *al.*, 1995), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (GEORGETTI et *al.*, 2003) et le cancer (MI et *al.*, 2008), formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, et immunosuppression (FAVIER, 2003). De nombreuses autres maladies, le stress oxydatif est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida ou le choc septique, le diabète ou l'insuffisance rénale (FAVIER, 2006).

L'organisme sait cependant se défendre contre eux, grâce aux enzymes antioxydantes contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action antiradicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium (BOSS, 2002).

II.10. L'activité antioxydante

II.10.1. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO.

Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (FAVIER, 2003).

Les défenses antioxydantes reposent sur des systèmes enzymatiques: superoxyde dismutases SOD, catalases et glutathion peroxydases ; et non enzymatiques comme les vitamines C et E, les polyphénols...etc. (LEVERVE, 2009). Aussi, le maintien de ces systèmes enzymatiques nécessite la présence d'un certain nombre d'oligoéléments : cuivre, manganèse, zinc et sélénium en particulier (JACOTOT, 1994).

Les polyphénols peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde, radical hydroxyle OH) pour produire des radicaux phénoxy stables. Ils peuvent aussi agir comme des antioxydants grâce à leur capacité à complexer les ions métalliques.

Malheureusement, certains polyphénols ont également une action pro-oxydante par transfert d'électrons à des ions métalliques (BUGGEY, 2001).

Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans 3 catégories : la prévention à temps plein, la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (VINT, 2004). Cependant, on distingue l'existence de deux origines des antioxydants.

➤ Antioxydants d'origine naturelle

La vie en aérobiose se traduit au niveau cellulaire par l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale nécessaire au stockage de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP).

La chaîne respiratoire est une succession de phénomènes d'oxydoréduction au cours desquels il existe des transferts d'électrons. Ces électrons peuvent réagir avec une molécule avoisinante pour aboutir à la formation d'un radical libre.

Parmi les antioxydants naturels ; les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant ; Ce sont des composés,

naturels, qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation qui favorisent le vieillissement cellulaire en interrompant le passage du stress oxydatif et interceptant le « message » de l'apoptose (mort cellulaire programmée) (MACHEIX *et al.*, 2005), et parmi :

- L'acide ascorbique (vitamine C) est une molécule hydrosoluble. Lors de son oxydation en acide d'hydro ascorbique, elle passe par une forme intermédiaire qui est le radical ascorbyl capable de capter certaines espèces radicalaires (radicaux OH) (BOUTABET, 2007). La vitamine C est abondante dans les agrumes, les fruits rouges, les pommes, les brocolis (BENBROOK, 2005) ;
- Les tocophérols sont des CP de structure apparentée à celle de l' α -tocophérol, le contenu est fortement influencé par la variété d'olive, le stade de maturation et le processus de fabrication des olives de table (SAKOUHI *et al.*, 2008). Ces additifs sont apparentés à la vitamine E et sont contenus dans les lipides végétaux, les amandes, les graines et les légumes à feuilles vertes (BOSSOKPI, 2002) ;
- Le β -carotène qui apparait un piègeur efficace (radicaux hydroxyles et pyroxyles) et captation de l'oxygène singulet 1O_2 (HADI, 2004). Il est présent dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon et les pinards (BOSSOKPI, 2002).

➤ Antioxydants d'origine synthétique

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels.

Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution (LISU *et al.*, 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (YU *et al.*, 2000).

II.10.2. Mécanismes d'action des antioxydants

Les antioxydants, essentiellement, les composés phénoliques peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (HODEK *et al.*, 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (VAN ACKER *et al.*, 1996 ; BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997).

Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxigenase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et virales (anti-HIV) (ANDERSON *et al.*, 1996 ; COWAN, 1999 ; YAO *et al.*, 2004).

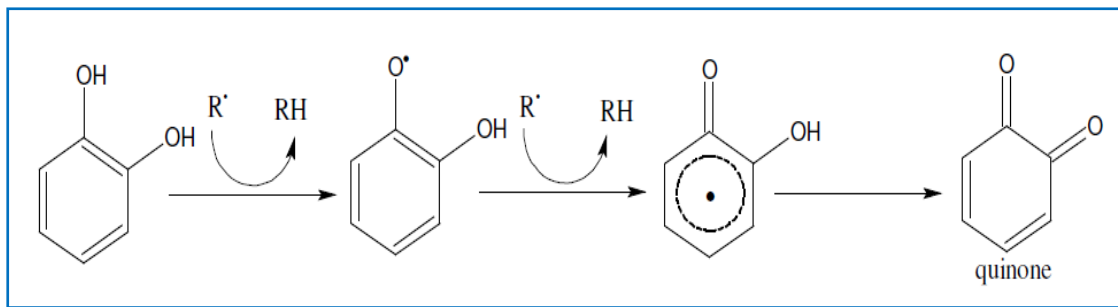


Figure 11 : Le piégeage des ERO par les flavonoïdes (MARFAK, 2003).

II.11. Activité antimicrobienne et mode d'action

Les recherches épidémiologiques visant à préciser les associations entre les niveaux de consommation des divers polyphénols et le risque de développer les pathologies permettront de préciser la nature des polyphénols et les niveaux d'apports les plus favorables à la prévention des diverses pathologies ; ces études sont encore à leurs balbutiements. Les progrès sont rendus difficiles par l'insuffisance des tables de compositions alimentaires pour les polyphénols.

Les recherches sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergiques, anti-athérogéniques, anti-inflammatoires, hépatoprotectives, antimicrobiennes, antivirales, anti-thrombotiques, cardioprotectives et vasodilatatoires (MIDDLETON *et al.*, 2000 ; KSOURI *et al.*, 2007).

Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est dû à leurs propriétés red/ox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (NIJVELDT *et al.*, 2001).

L'action antimicrobienne des phénols est liée à leur capacité à dénaturer les protéines et sont généralement classés comme agents agissant en surface (CATURLA *et al.*, 2005 ; CASAS-SANCHEZ *et al.*, 2007).

Leur action conduirait à la fuite des constituants cellulaires tels que les protéines, potassium et le phosphate des bactéries. Ces effets pourraient être dus à la destruction du peptidoglycane ou aux dommages de la membrane cellulaire, ainsi qu'une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte (fuite) de ses organites intracellulaires, en plus des caractéristiques physico-chimiques des composés polyphénoliques (la solubilité dans l'eau et la lipophilie) peuvent influencer cet effet antibactérien (DOMINECO *et al.*, 2005).

Les Stilbénes sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés anti-fongiques, ils inhibent la germination de solutions de conidies de *Botrytis cinerea* à des concentrations de 160 mg/L (100 % d'inhibition) (JEANDET et *al.*, 2002).

L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonols est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule (DAGLIA, 2011).

➤ **Action antivirale**

Des activités antivirales (LEE-HUANG et *al.*, 2003 ; MICOL et *al.*, 2005 ; LEE-HUANG et *al.*, 2007) notamment contre le virus de l'immunodéficience Humaine (VIH) ont été décrites. En effet l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine sont des inhibiteurs de la fusion et de l'intégration du VIH-1 à la cellule hôte.

L'oleuropéine peut aussi interférer avec la synthèse des acides aminés nécessaires pour l'activité virale prévenant ainsi la diffusion, le développement et l'attaque de la membrane cellulaire (LEE-HUANG et *al.*, 2007).

En l'absence de vaccin contre le SIDA, les microbicides topiques susceptibles de bloquer la transmission du virus pourraient s'avérer très utiles. Le jus de grenade contient des inhibiteurs d'entrée du HIV-1 qui peuvent être isolés par adsorption sur de l'amidon de maïs. L'étude de ce complexe montre qu'il bloque la liaison du virus avec certains récepteurs cellulaires, L'extrait de grenade pourrait donc être utilisé pour la production d'un microbicide efficace (NEURATH et *al.*, 2004).

*Chapitre III : Les
probiotiques*

III.1. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes qui appartiennent à la catégorie alimentaire, elles ont été décrites pour la première fois au début du XXe siècle par ORLA-JENSEN. Elles ont le pouvoir de fermenter les hydrates de carbone en acide lactique, cette caractéristique commune permet de les réunir en un unique groupe (DELLAGLIO et *al.*, 1994).

Les composés résultants de cette fermentation tels que les peptides, les acides aromatiques et les exopolysaccharides peuvent avoir un impact positif sur les caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (MOZZI et *al.*, 2010).

Elles partagent un certain nombre de caractéristiques communes, qui forment la base de leur classification, ce sont des bactéries procaryotes formant un groupe hétérogène constitué de coques et de bacilles (BADIS et *al.*, 2005) anaérobies facultatives, Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négatives, oxydase négatives et la plupart sont nitrate réductase négative, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C (SALMIEN et *al.*, 2004; KÖNIG et FRÖHLICH, 2009); elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexes vis-à-vis des acides aminés, des peptides, des vitamines, de sels, des acides gras ainsi que des glucides fermentescibles (DELLAGLIO et *al.*, 1994; HOGG, 2005).

III.1.1. Habitat et origine

Les bactéries lactiques occupent des niches écologiques très variées, elles sont susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat, elles accompagnent l'activité humaine au quotidien, en tant que bactéries de la flore commensale, de la flore intestinale ou de la flore alimentaire, elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples.

Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des aliments ensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain (LEVEAU et BOUIX, 1993; HASSAN et FRANK, 2001). Toutefois, certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (DE ROISSART, 1986).

III.1.2. Taxonomie

La taxonomie des bactéries lactiques ne cesse d'évoluer. Le nombre de nouvelles espèces a augmenté énormément au cours de ces dix dernières années. Les réorganisations effectuées ont contribué à fusionner des espèces en une seule, ou identifier une espèce comme un nouveau genre (POT, 2008).

L'identification préliminaire des bactéries lactiques peut se faire selon des critères phylogénétiques. Certaines caractéristiques phénotypiques peuvent être utilisées pour identifier les espèces à l'intérieur des genres comme la capacité à : fermenter les hydrates de

Les probiotiques

carbone, exiger des facteurs de croissance, produire de l'acétone, synthétiser certaines enzymes...etc. d'autres critères peuvent aussi être employés pour identifier des espèces lactiques tels que : la composition en G+C de l'ADN, la composition en acides gras (VANDAMME, 1996 ; STILES et HOLZOPFEL, 1997 ; HO et *al.*, 2007).

Cependant, la morphologie est considérée comme étant la caractéristique clé pour décrire et classifier les bactéries lactiques en genres. De ce fait, on peut les diviser arbitrairement en bacilles (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*) et coques (tous les autres genres). Le genre *Weissella*, est le seul genre qui comporte à la fois des bacilles et des coques (COLLINS et *al.*, 1993 ; HO et *al.*, 2007).

Tableau VII : Nouvelle classification des Lactobacilles selon ATLAN et *al.* (2000).

Groupe I. <i>Delbrueckii</i>	Groupe II. Casei-Pediococcus	Groupe III. Leuconostoc
<i>Lb. delbrueckii</i>	Homofermentaires stricts	Hétérofermentaires stricts
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. avarius</i>	Genre <i>Leuconostoc</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Ln. amelibiosum</i>
<i>Lb. crispatus</i>	Hétérofermentaires facultatifs	<i>Ln. carnosum</i>
Autres Homofermentaires	<i>Lb. casei</i>	<i>Ln. gelidum</i>
Hétérofermentaires Facultatifs	<i>Lb. plantarum</i>	Genre <i>Weissella</i>
<i>Lb. acetotolerans</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Ln. paramesen</i>
<i>Lb. hamster</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. Confusus</i>
	Heterofermentaires stricts	<i>Lb. halotolerans</i>
	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. viridescens</i>
	<i>Lb. fermentum</i>	
	<i>Lb. buchneri</i>	
	<i>Lb. reuteri</i>	
	<i>Lb. sanfrancisco</i>	
	<i>Lb. parakefir</i>	
	Genre <i>Pediococcus</i>	
	<i>Pc. Damnosus</i>	
	<i>Pc. acidilactici</i>	
	<i>Pc. pantosaceus</i>	

III.1.3. Caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques

III.1.3.1. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des *Lactobacillaceae*, ce sont des bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C.

Plusieurs espèces appartenant à ce genre sont utilisées dans diverses industries comme agents de fermentation lactiques ou sont rencontrées comme contaminants (KHALID et MARTH, 1990; LECLERC et al., 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par ORLA-JENSEN en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (TAMINE, 2002 ; GUIRAUD et ROSEC, 2004).

Groupe I « *Thermobacterium* » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.

Groupe II « *Streptobacterium* » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.

Groupe III « *Betabacterium* » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

III.1.3.2. Le genre « *Lactococcus* » : Le genre *Lactococcus* (streptocoque du groupe N) représente les streptocoques dits «lactique», car ils sont associés à de nombreuses fermentations alimentaires et ne possèdent aucun caractère pathogène (PILET et al., 2005).

III.1.3.3. Le genre « *Streptococcus* » : Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène, oral et les autres streptocoques (SCHEILFER, 1987).

III.1.3.4. Le genre « *Enterococcus* » : regroupe les streptocoques fécaux qui représentent une hémolyse de type λ et β et qui appartiennent au groupe D (TAMINE, 2002 ; HO et al., 2007).

III.1.3.5. Les genres « *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* » : Ils ressemblent les coques lenticulaires en paires ou en chainettes mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué (PILET et al., 1998 ; HO et al., 2007).

III.1.3.6. Les genres « *Pediococcus* et *Tetragenococcus* » : Les *Pediococcus* sont des coques homofermentaires dont la particularité est le regroupement en tétrade (PILET et al., 2005).

III.1.3.7. Le genre « *Bifidobacterium* » : Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal (AXELSSON et al., 2004 ; PILET et al., 2005 ; HO et al., 2007).

III.1.4. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des germes hétérotrophes, elles ont donc besoin d'énergie pour leur croissance, énergie qu'elles synthétisent à partir de la fermentation lactique des glucides.

La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (ATLAN et al., 2008) :

- le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- le catabolisme intracellulaire du sucre ;
- formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres, il s'agit des voies homofermentaire (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas) où l'acide lactique est le seul produit terminal et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate) où, en plus de l'acide lactique, d'autres composés constitués principalement d'acide acétique, d'éthanol et de gaz carbonique sont produits (ATLAN et al., 2008).

III.1.5. Les ferments lactiques

C'est une préparation microbienne ajoutée à une matière première dans le but de produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son procédé de fermentation.

Le groupe des bactéries lactiques occupe un rôle important dans ces processus (LEROY et De VUYST, 2004 ; MÄYÄR-MÄKINEN et BIGRET, 2004).

La sélection des ferments lactiques s'appuie sur de nombreux critères, ces critères relèvent éventuellement des fonctionnalités technologiques des souches, de leur performance et de leur sécurité (BEAL et al., 2008).

III.1.6. Applications industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent une large gamme d'application à l'échelle industrielle et ceci est dû à leur grande activité métabolique ainsi qu'à leur grande capacité d'adaptation à différents environnements (STREIT et al., 2007).

Les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs domaines :

- Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes sont utilisés pour la conversion d'une grande variété de matières premières mais l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (AXELSSON, 2004 ; STREIT et *al.*, 2007). dans l'industrie des additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides), pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (RODRIGUEZ et *al.*, 2003) ;
- Dans l'industrie chimique (production d'acide lactique) ;
- dans le domaine médical notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux (RODRIGUEZ et *al.*, 2003).

III.2. Probiotiques

A partir des travaux de Metchnikoff en 1908, l'idée que les bactéries lactiques ingérées vivantes pouvaient avoir un effet bénéfique a été développée, il a suggéré que l'ingestion de bactéries lactiques vivantes diminue considérablement les bactéries pathogènes se trouvant dans le tube digestif.

La notion de « probiotique » est alors née et a connu plusieurs changements évolutifs dans le temps en fonction des avancées technologiques.

Leur première définition comme « facteurs promoteurs de croissance produits par des microorganismes » a été proposée par LILLY et STILLWELLEN en 1965. Depuis ce temps, la définition du terme probiotique a été modifiée à plusieurs reprises (LAMOUREUX, 2000 ; AIT-BELGNAOUI et *al.*, 2005). En 1989, ROY FULLER a introduit l'idée qu'ils étaient bénéfiques pour la santé de l'hôte (GUARNER et *al.*, 2008).

La FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (2002) ont établi des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments et formulent la définition suivante: «Un probiotique est un micro-organisme vivant, bactérie ou levure, qui, consommé en quantité suffisante, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels» *International Life Science Institute, USA.*

III.2.1. Les principales espèces de bactéries lactiques à potentiel probiotique

Les espèces les plus fréquentes et les plus rapportées dans la littérature sont du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, mais il faut aussi mentionner des souches du genre *Enterococcus* et *Streptococcus* (GBASSI et *al.*, 2011 ; ROKKA et RANTAMAKI, 2010).

Les probiotiques

Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotiques sont répertoriées dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : Les principales espèces de bactéries lactiques à activité probiotiques (SHAH., 2007).

Espèces de <i>Lactobacillus</i>		
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lb. paracasei</i>
<i>Lb. amylovorus</i>	<i>Lb. johnsonni</i>	<i>Lb. Rhamnosus</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. plantarum</i>
Espèces de <i>Bifidobacterium</i>		
<i>Bf. lactis</i>	<i>Bf. animalis</i>	<i>Bf. infantis</i>
<i>Bf. longum</i>	<i>Bf. bifidum</i>	<i>Bf. breve</i>
<i>Bf. adolescentis</i>		
Autres bactéries lactiques		
<i>Lb. lactis</i>	<i>Lb. diacetylactis</i>	<i>Lb. faecalis</i>
<i>Lb. mesenteroides</i>	<i>Lb. intermedius</i>	<i>Lb. faecium</i>
<i>Lb. acidilactici</i>	<i>Lb. thermophilus</i>	

III.2.2. Propriétés et critères de sélection des souches probiotiques

Les propriétés bénéfiques des probiotiques sont variables selon l'espèce ou la souche microbienne. Ces derniers sont spécifiques à la souche microbienne, d'où la nécessité de connaître le genre et l'espèce de la souche utilisée.

La non pathogénicité (innocuité) des souches est un critère très important, les souches ayant le statut GRAS (*Generally Regarded As Safe*) sont d'ailleurs à favoriser. Toutefois, le critère de viabilité ou de survie demeure essentiel dans la sélection des probiotiques qui doivent parvenir vivantes au site de leur action, à savoir l'intestin, et donc résister aux différents mécanismes de défense de l'hôte.

Les bactéries étant administrées par voie orale, il faut qu'elles franchissent les obstacles majeurs du transit digestif : le pH acide, les sels biliaries, les enzymes pancréatiques...etc. (PERCIVAL, 1997 ; LAMOUREUX, 2000 ; MILLETTE et al., 2008).

Tableau IX: Critères de sélection des probiotiques (NOUSIAINIEN, 2004).

Critères	Critères du but recherché
- Résistance à l'acidité gastrique	- Survie pendant le passage par l'estomac et duodénum
- Résistance aux sels biliaires	- Survie pendant le passage par l'intestin grêle
- Production d'acide (à partir de glucose et de lactose)	- Production « de barrière acide » efficace dans l'intestin
- Adhésion au mucus et/ou aux cellules épithéliales humaines	- Colonisation efficace, réduction des sites d'adhésion des pathogènes à la surface
- Production de substances Antimicrobiennes	- Inhibition du développement des germes pathogènes
- Résistance à la chaleur	- Survie pendant le processus de transformation
- Bonnes propriétés technologiques	- La stabilité, croissance sur une large échelle, survie dans le produit, résistance aux bactériophages

III.2.2.1. La résistance à l'acidité gastrique

La survie des bactéries dans le suc gastrique dépend de leur capacité à tolérer un pH acide. Le temps de passage varie selon le régime de l'individu entre 1 heure et quatre heures, de ce fait les souches probiotiques doivent résister à un pH de 2.5 dans un milieu de culture pendant quatre heures (AMMOR et *al.*, 2007).

III.2.2.2. La résistance aux sels biliaires

Après avoir survécu à l'acidité de l'estomac les bactéries doivent faire face à l'action détergente des sels biliaires libérées dans le duodénum après ingestion des repas gras, et ceci grâce à leur capacité à réduire l'effet émulsifiant des sels biliaires en les hydrolysant, de ce fait diminuer leur solubilité (AMMOR et MAYO, 2007 ; GU et *al.*, 2008).

III.2.2.3. Adhésion aux cellules épithéliales

La capacité d'adhésion aux cellules intestinales est un critère obligatoire pour la colonisation des entrailles. L'adhérence constitue le premier mécanisme de défense contre l'invasion des bactéries pathogènes. (PALOMARES et *al.*, 2007 ; REYES-GAVILAN et *al.*, 2011).

En plus du pouvoir d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, les probiotiques peuvent se fixer au mucus qui recouvre les anthérocytes ou aux divers microorganismes que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal (LAMOUREUX, 2000).

III.2.2.4. Production de substances antimicrobiennes

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique lesquels sont exploités dans le but d'améliorer la préservation des aliments, parmi ces molécules on trouve : les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines (TITIEK et *al.*, 1996 ; LABIOUI et *al.*, 2005).

III.2.2.5. Résistance aux antibiotiques

La structure et la physiologie des bactéries lactiques font qu'elles sont naturellement résistantes à divers antibiotiques. Les travaux de TEMMERMAN et *al.*(2003)ont montré que plus de 60% des probiotiques sont dotés d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques.

Des souches de *Lactobacillus* ont été trouvées résistantes à la kanamycine (81%), à la tétracycline (29.5%), à l'érythromycine (12%) et au chloramphénicol (8.5%). Cette résistance n'est généralement pas transmissible, cependant, la possibilité d'un transfert du plasmide codant à d'autres espèces et genres n'est pas écartée (DENOUE, 2004).

Les autorités européennes ont récemment conclu qu'il était primordial de tester les souches bactériennes employées en industries alimentaires afin de vérifier qu'elles ne comportent aucuns gènes transmissibles de résistance aux antibiotiques car ces souches pourraient poser un risque à la santé humaine et animale (AMMOR et MAYO, 2007).

III.2.2.6. Critères technologiques

Les travaux de SAARELA et *al.* (2000) ont prouvé qu'en plus de l'innocuité et des propriétés fonctionnelles, le choix des souches probiotiques doit aussi se faire selon des critères technologiques, à savoir :

- Bonnes propriétés sensorielles ;
- Résistance aux phages ;
- Viabilité durant le traitement technologique.

III.2.3. La différence entre les prébiotiques et les probiotiques

Les prébiotiques sont définis comme étant des glucides indigestes (oligosaccharides) qui servent de «nourriture » aux probiotiques, ces derniers sont de bonnes bactéries naturellement présentes dans notre appareil digestif, plus particulièrement le côlon (ROBERFROID, 2001).

Lorsque les prébiotiques sont consommés en quantités suffisantes améliorent la santé en influençant favorablement la flore intestinale par la stimulation de la microflore à l'activité probiotique.

Les glucides non digestibles ne sont pas tous des prébiotiques, cependant, ils doivent tous respecter des critères scientifiques particuliers. (DESMOND et *al.*, 2005 ;SCHWAB et *al.*, 2007).

III.2.4. Effets bénéfiques des probiotiques sur la santé

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique.

- Dans l'industrie alimentaire

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments, ainsi, les produits de fermentation par ces souches lactiques sont divers : yaourts, charcuteries, pain au levain...etc. (BADIS et *al.*, 2005 ;YATEEM et *al.*, 2008).

Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent obligatoirement répondre à certains critères : absence de pathogénicité ou activité toxique, capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, capacité de dominance, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (MARTH et STEELE, 2001).

- Dans le domaine thérapeutique

Les mécanismes d'action des probiotiques sur l'hôte sont complexes et variés, ils diffèrent généralement selon la souche bactérienne considérée, ils agissent en particulier en inhibant les bactéries indésirables, en neutralisant les produits toxiques, en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire, Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B), et de sels minéraux assimilables (ROBIN et ROUCHY, 2001 ; AIT-BELGNAOUI et *al.*, 2005 ; YATEEM et *al.*, 2008).

Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (MKRTCHYAN et *al.*, 2010). D'autres ont cité leur capacité de diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique.

Aussi les souches de *Lactobacillus crispatus* sont utilisées sous forme de suppositoires comme moyen de lutte contre les bactéries pathogènes responsables d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie chez la femme (EL -GHAISH et *al.*, 2011 ;UEHARA et *al.*, 2006).

III.2.5. Les différents produits commercialisés en tant que probiotiques humains ou Animaux

De nos jours, les probiotiques font l'objet de recherches scientifiques très approfondies, ils sont très exploités et utilisés dans le domaine de la nutrition humaine et animale.

Les produits probiotiques commercialisés peuvent être constitués soit d'un seul microorganisme (produits mono souches) ou d'une association de plusieurs espèces (produits pluri souches).

Ils sont généralement commercialisés sous trois formes (PATTERSON, 2008) :

- Un concentré de culture ajouté à des aliments et boissons à base de produits laitiers, de fruits et de céréales ;
- Un ingrédient ajouté à un aliment à base de lait ou de soja et auquel on permet d'atteindre une concentration élevée par fermentation ;
- Des cellules séchées, concentrées, en poudre, en capsule ou en comprimés.

Plusieurs paramètres influencent la qualité et la viabilité des probiotiques tel que les processus de transformation et de stockage, c'est pourquoi, de nouvelles technologies sont utilisées tel que la micro encapsulation et la technologie des cellules immobilisées, en effet, elles offrent une protection additionnelle aux organismes probiotiques.(AILASAPATHY, 2002 ; PATTERSON, 2008).

Les micro-organismes utilisés en alimentation animale diffèrent sensiblement de ceux utilisés en alimentation humaine. Les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont majoritairement utilisés en nutrition humaine, alors que les genres *Bacillus*, *Enterococcus* et *Saccharomyces* sont plus utilisés dans les élevages (SIMON *et al.*, 2001).

III.2.6. Interaction composés phénoliques-probiotiques

Il a été démontré que le régime alimentaire est un facteur majeur déterminant la composition et l'évolution du microbiote de l'intestin ;il a été estimé par CHUN *et al.*, (2007) qu'un apport quotidien d'environ 1g de polyphénols est inclut dans notre alimentation, dont la moitié est contenue dans les fruits et légumes ;La flore intestinale transforme les polyphénols lorsqu'ils arrivent dans l'intestin, 5 à 10 % des polyphénols alimentaires sont absorbés dans l'intestin grêle et les bactéries du gros intestin agissent sur les 90 à 95 % restant pour former des dérivés métaboliques.

Les polyphénols et leurs dérivés qui sont absorbés au niveau de l'intestin passent par le foie, puis regagnent la circulation générale où ils sont distribués aux organes. Or les polyphénols alimentaires ont une action sur la population microbienne (CARDONA *et al.*,

2013) et peuvent sélectivement supprimer ou stimuler la croissance de quelques composants de microbiote intestinal.

Par conséquent, ils peuvent influencer la dynamique de population bactérienne (TOUNIS et *al.*, 2008) et donc influencer positivement ou négativement la santé humaine (BLAUT et CLAVEL, 2007).

Certains travaux ont démontré que des acides phénoliques dérivés du métabolisme microbien ont un impact positif sur l'hôte comme l'inhibition d'accumulation plaquettaire (RECHNER et CRONE, 2005), l'activité antiproliférante dans les cellules prostatiques et tumorales (GAO et *al.*, 2006). Ils sont reconnus comme des antioxydants directs, mais aussi indirects par l'induction d'enzymes protectrices endogènes (STEVENSON et LE BOSQUET, 2007).

Selon des travaux récents, les polyphénols auraient des « effets prébiotiques » en modifiant la composition de la flore intestinale. Certains polyphénols agissent sur la membrane bactérienne et ont des activités antimicrobiennes contre des bactéries pathogènes.

Cependant, les interactions entre les composés phénoliques et des bactéries gastro-intestinales sont toujours mal comprises (JENNER et *al.*, 2005).

*2ème Partie : Partie
expérimentale*

I- Matériels et Méthodes

Matériel et Méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB), au niveau des laboratoires communs I et II d'analyse physico-chimique et le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université de Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou (UMMTO), durant la période Mars – Juin de l'année 2015.

Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

-Quantification des composés phénoliques de deux sous-produits oléicoles, feuilles d'oléastre et margines d'olives, issus de deux types d'extraction : aqueuse et organique ;

-Détermination de l'activité antioxydante des polyphénols totaux extraits ;

-Détermination de l'effet antibactérien de ces polyphénols sur six souches bactériennes probiotiques, appartenant au Genre *Lactobacillus* et la recherche de leur viabilité par différents tests microbiologiques.

I.1.Matériels

I.1.1. Matériel biologique

➤ L'olivier

Les feuilles utilisées dans la présente étude sont issues de la variété sauvage ; témoin d'un intérêt primordial pour les recherches.

Les feuilles sont récoltées durant le mois de mars 2015 dans la région de Tizi-Ouzou (Algérie). Après récolte, les feuilles fraîches ont été transportées au laboratoire d'analyse physico-chimique au niveau de l'UMMTO dans des sacs en plastiques à l'abri de la lumière et à température ambiante. Elles ont suivi plusieurs étapes de préparation :

- Lavages à l'eau distillée, afin d'éliminer toutes les impuretés, et un égouttage à l'aide d'un tamis ;
- Séchage des feuilles à l'air libre, à l'abri de la lumière et à une température ambiante pendant 8 jours ;
- Broyage à l'aide d'un broyeur électrique (*Braun 450 WATT*), on vue de l'obtention d'une poudre fine ;
- Le broyat résultant est tamisé, la poudre obtenue est ensuite conservée dans des flacons en verre hermétiquement fermés, afin de faire l'objet d'extraction des polyphénols totaux (PPT).

Les margines, proviennent de la macération des olives d'un cultivar de la variété *Chamlal* ; pressées dans une huilerie moderne sise dans la région de Boghni (Tizi-Ouzou), provenant de la campagne 2015.

Matériel et Méthodes

Au laboratoire, elles ont été réparties dans des flacons en plastiques, puis conservées à -18°C.

Cette margine est constituée de 13,7 % (137 g/l) de MS, et de 86,58 % d'eau. Ces teneurs ont été déterminées par étuvage à 100°C, cette quantification sert à exprimer la quantité des composés phénoliques dosés par spectrophotométrie en mg contenus dans 1g de MS.

➤ Les souches bactériennes

Pour notre étude microbiologique nos tests ce sont effectués sur six souches probiotiques de référence appartenant au Genre *Lactobacillus*.

Tableau X: Les souches bactériennes utilisées dans notre étude microbiologique.

Souches
<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>

I.1.2. Les produits chimiques et appareillage

➤ Produits chimiques

Pour notre étude expérimentale, divers produits chimiques ont été utilisés, regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XI : Les produits chimiques utilisés dans notre étude.

		Référence	Utilisation
Solvants	Diéthyléther	Sigma-Aldrich	Extraction des polyphénols
	Ethanol 80%		
	Acétate d'éthyle	GPR RECTAPUR	Solubilisation et conservation des extraits
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	Sigma-Aldrich	
	Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich	Dosage des polyphénols
	Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich	

Matériel et Méthodes

Réactifs	Acide gallique (AG)	Sigma	
	DPPH·2,2-diphényl-1picrylhydrazyl	Sigma-Aldrich	Activité antioxydante
Composés phénoliques standards	acide tannique (AT)	Sigma	Réalisation de courbe d'étalonnage
Sels	Chlorure de Sodium(NaCl)	Fluka Biochemika	Préparation d'eau physiologique

• Préparation du composé phénolique standard

Le composé phénolique standard choisi est l'acide tannique, il a été utilisé comme témoin négatif dans le test de sensibilité bactérienne aux différents extraits polyphénoliques.

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

➤ Les milieux de cultures

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

- Bouillon MRS (SIGMA) ;
- Gélose MRS (SIGMA) ;
- Gélose Müeller Hinton (MH) (CONDA);
- Bouillon nutritive N 1 (Fluka Biochemika).

Ces milieux de culture ont été additionnés de : L-cystéine (SIGMA) et D-Saccharose (SIGMA).

➤ Appareillage

Les appareils utilisés sont les suivants :

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

I.2. Méthodes

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

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tout le contenu total en phénols, et par conséquent affecte les activités biologiques méditées par ces métabolites (LEE et *al.*, 2003).

➤ Extraction aqueuse (feuilles d'oléastre)

Une quantité de 5 g de poudre de feuilles d'oléastre est mélangée avec 150 ml d'eau distillée dans un bécher.

Deux échantillons (ech1, ech2) ont été placés sous une agitation magnétique pendant 3h, à deux températures différentes (Température ambiante 25°C et 40°C) respectivement.

Le troisième échantillon a été placé dans un bain marie à 100°C pendant 2h (en infusion).

Une filtration à l'aide de filtres millipores stériles est ensuite effectuée. Le schéma représenté par la figure 12 illustre le protocole suivi.

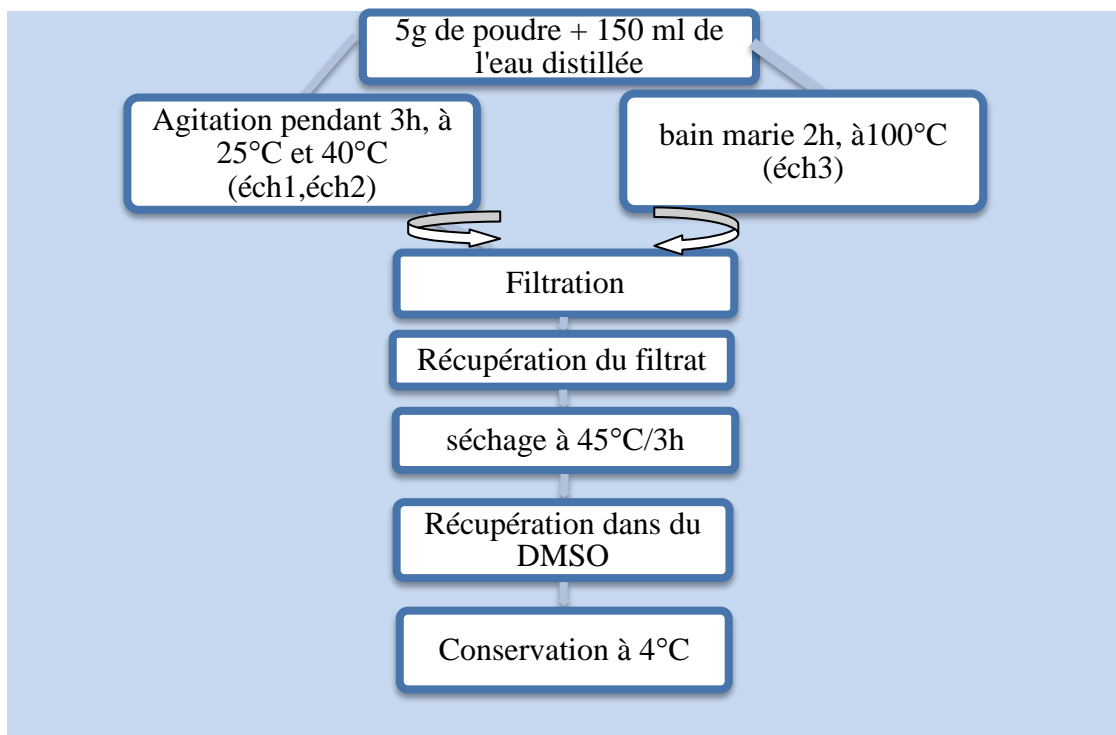


Figure 12 : Protocole d'obtention des extraits aqueux

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

➤ Extraction organique (feuilles et margines)

✓ Feuilles

Une quantité de 5 g de poudre est macérée dans un volume de 150 ml de solvant. Ce volume est ensuite placé dans un bêcher sous une agitation magnétique pendant 2h à température ambiante, sachant que nous avons réalisé deux extractions à l'aide de deux solvants organiques éthanol et acétate d'éthyle.

Une filtration sur papier filtre est effectuée pour les mélanges à l'éthanol et une centrifugation réfrigérée, pour ceux à l'acétate d'éthyle à 5000trs/5 min, le filtrat et/ou le surnageant récupéré est séché à 40°C. Après évaporation du solvant, l'extrait sec résultant est reconstitué dans du DMSO (figure 13).

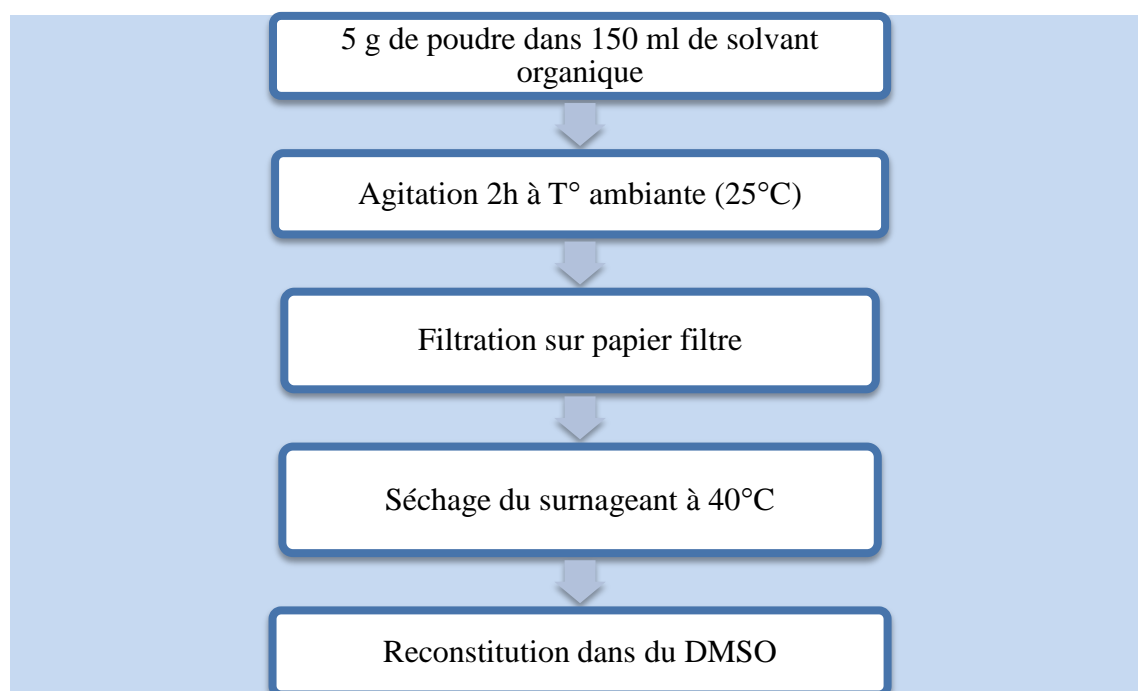


Figure13 : Protocole d'extraction des composés phénoliques de feuilles d'oléastre par les solvants organiques.

Il est recommandé d'utiliser l'éthanol absolu à la macération ou éthanol- eau avec différentes proportions (LIYANA-PATHIRANA et SHAHIDI, 2006).

✓ Margines

- Un volume de margines de 100ml est additionné de 100ml de solvant (v/v), le mélange est ensuite versé dans un bécher sous une agitation magnétique pendant 2h à température ambiante (25°C).

L'ensemble est centrifugé à 4°C, à une vitesse de 5000trs/5min. Après la centrifugation le mélange est complètement séparé en deux phases : Une séparation en deux phases permet d'aspirer le surnageant composé riche en Polyphénols.

Il est récupéré et séché à 40°C jusqu'à évaporation du solvant. L'extrait sec est récupéré dans un volume minimum du DMSO.

Deux extractions ont été réalisées à l'aide de deux solvants organiques, acétate d'éthyle et diéthyléther ; en suivant le protocole ci-dessous.

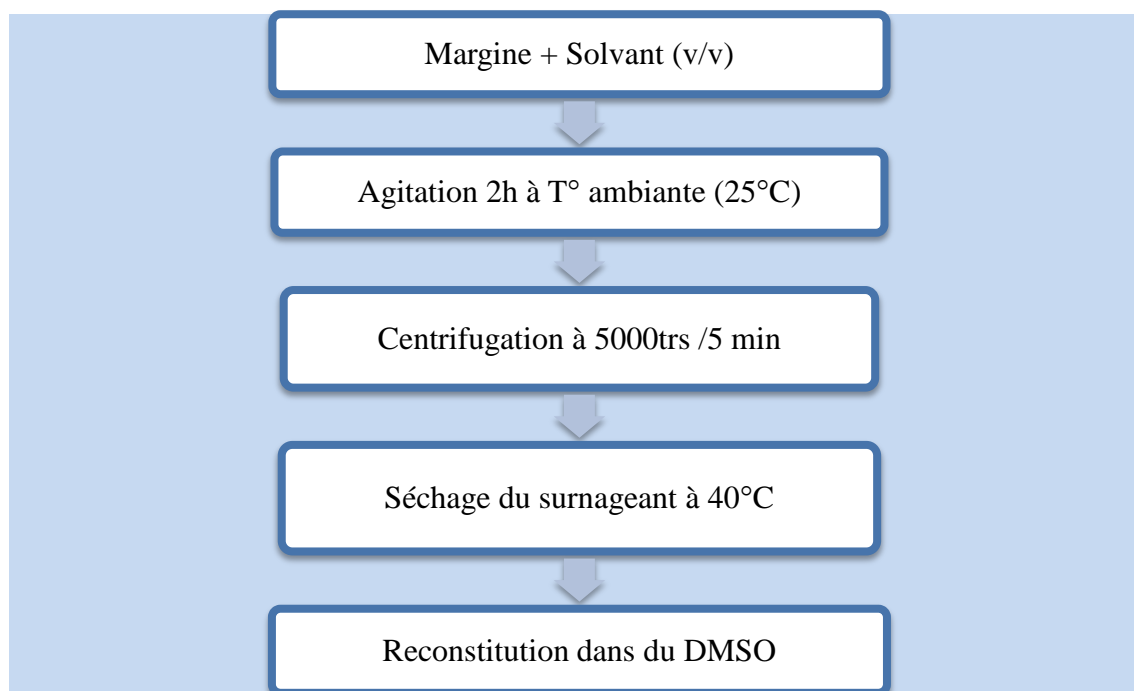


Figure 14: Protocole d'obtention des polyphénols à partir des margines.

Si les extraits polyphénoliques doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant de récupération peut être critiquable car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique (YRJONEN, 2004), Pour cela, nous avons choisi le diméthylesulfoxyde « DMSO » qui est le solvant préférable par la majorité des auteurs, notamment, ALAVI et *al.* (2005), MOHAMMEDI (2006) et OWNAGH et *al.* (2010) qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir puissant.

I.2.2. Analyse quantitative des échantillons

I.2.2.1. Rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage (%) par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

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

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

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

Les valeurs sont la moyenne de deux mesures \pm SD.

I.2.2.2. Quantification des phénols totaux des extraits aqueux et organiques

-Méthode Folin-Ciocalteu

La méthode de Folin-Ciocalteu est considérée comme la meilleure pour la détermination du taux des PPT des extraits de plantes (DJERIDANE *et al.*, 2010) car elle est standardisée, simple, reproductible et les interférences avec la matrice de l'échantillon sont minimisés.

Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (RIBEREAU-GAYON, 1968). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de CP présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 750 nm (HUANG *et al.*, 2005 ; 2013).

La lecture des résultats est effectuée par spectrométrie à 750nm, qui traduira l'intensité de coloration en densité optique. Ces DO seront ensuite converties en concentration de phénols totaux des extraits à l'aide de l'équation ressortie de la courbe d'étalon, exprimée en équivalent d'AG.

Cette courbe d'étalonnage obtenue, en prenant l'acide gallique à différentes concentrations comme standard, montre la linéarité de la réponse du détecteur en fonction des différentes concentrations. Le choix de ce modèle de représentation est fondé sur la méthodologie de plusieurs auteurs, notamment (MUJICA *et al.*, 2009). (Figure 15)

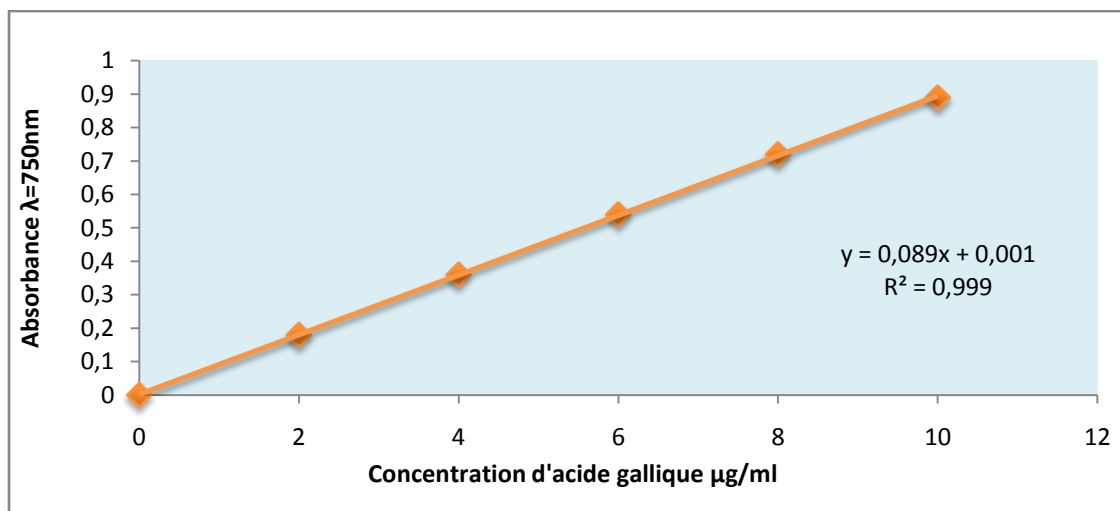


Figure 15 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des PPT en équivalent d'acide gallique.

La gamme étalon est réalisée dans une gamme de 0 à 10 mg/l d'AG.

Enfin pour pouvoir soumettre nos résultats à l'analyse statistique, deux répétitions ont été réalisées pour chaque extrait.

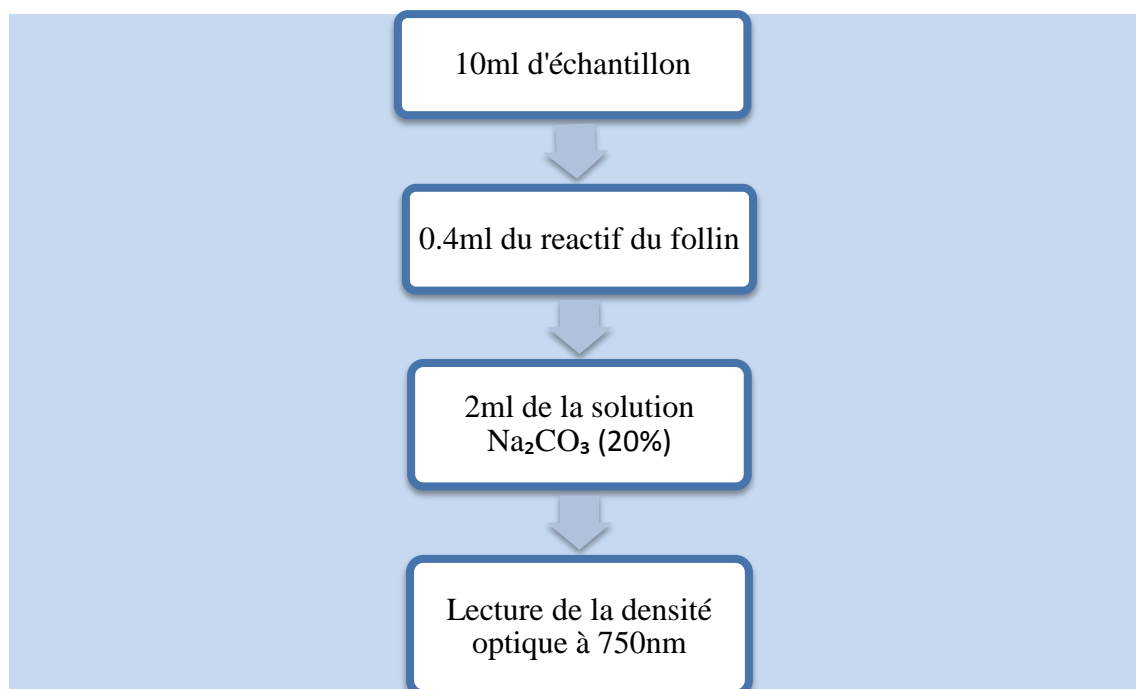


Figure 16: Protocole du dosage des polyphénols totaux.

I.2.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante des extraits aqueux et organiques

-Test de piégeage du radical DPPH•

Le test est basé sur le piégeage de radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et mesure une activité antiradicalaire, traduit par la réduction du DPPH• en DPPH, accompagné d'un virage de couleur de la solution du bleu-violet vers le jaune (MORALES et JIMENEZ-PEREZ, 2001), l'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006).

Ce test s'effectue à température ambiante, permettant ainsi d'éliminer le risque de dégradation thermique des molécules testées, il est rapide et facile à mettre en œuvre.

La capacité de piégeage du DPPH• est déterminée suivant la méthode décrite par BRAND-WILLIAMS et *al.* (1995). 2 ml d'une solution de DPPH• (0,1mM) dans de l'éthanol, sont rajoutés à 20µl des extraits à tester, le mélange est par la suite agité et l'absorbance à 517 nm est mesurée à différents de temps, à un intervalle de 10 minutes, jusqu'à l'obtention du plateau.

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• et une cinétique du suivi de l'oxydation de chaque extrait par le DPPH a été effectuée, suivie d'un tracé de courbes.

Comme témoin, nous avons utilisé du DPPH• à (0,1Mm) dissout dans de l'éthanol (même concentration que les extraits).

L'activité de piégeage du radical DPPH• est calculée en utilisant la formule suivante :

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

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

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

I.2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

• Préparation des précultures

Des repiquages successifs sont effectués à partir des milieux de conservation des souches de référence avant chaque test. Ils sont réalisés dans des bouillons MRS-cystéine à 37°C/18 à 24h.

- **Préparation de la suspension bactérienne**

Après incubation, la culture bactérienne jeune de chaque souche est centrifugée à 4°C 5000trs/5min, suivie de plusieurs lavages à l'eau physiologique, le culot est ensuite récupéré, et remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne obtenue est agitée au vortex pendant quelques secondes pour une bonne homogénéisation, puis standardisée à 10^6 UFC/ml à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm.

Selon MAC FARLAND, il est admis qu'une densité optique (DO) comprise entre 0,08-0,1 correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml, la suspension d'inoculum est diluée au 1/10 pour avoir une concentration de 10^6 germes/ml.

Plusieurs tests différents ont été choisis pour évaluer l'effet antibactérien des différents extraits bruts de feuilles d'oléastre, margines d'olives, et l'AT.

I.2.4.1. Estimation de la biomasse bactérienne sur milieu liquide

Pour chaque souche, nous avons suivis le protocole illustré ci-dessous :

-Ensemencer 1ml de l'inoculum bactérien chargé à 10^6 UFC/ml dans des tubes de 9ml du bouillon MRS-cystéine. Ce milieu est additionné, à chaque fois, l'un des extraits aqueux, T°C ambiante, 40°C et 100°C. Ces extraits ont été incorporés dans les milieux, lors de leur préparation ;

-Deux tubes pour chaque extrait et pour chaque souche ont été réalisés ;

-Un tube témoin, sans la présence de l'extrait (bouillon MRS-cystéine ensemencé) a été réalisé, afin de pouvoir comparer la biomasse obtenue ; Toutes les séries de tubes ont été, ensuite incubées à 37°C/24h ;

-La lecture de résultats est procédée par spectrométrie, où des lectures de DO à 620nm ont été effectuées, en considérant le témoin comme blanc.

I.2.4.2. Dénombrement de colonies sur boites

Le dénombrement de colonies sur boites a été réalisé selon la technique de quatre quadrants, à l'aide d'un compteur de colonies. Seules les boites contenant entre 30 et 300 colonies ont été prises en considération.

Deux dénombrements ont été effectués. Un initial, après la lecture des DO, 100µl sont ensuite prélevés de chaque dilution et étalés sur une gélose MRS, à l'aide d'un râteau stérile, deux répétitions sont réalisées.

Pour le dénombrement final, ces mêmes suspensions bactériennes de MRS-cystéine, ont été remises à l'étuve pour d'autres 24h d'incubation, récupérées, elles subissent plusieurs dilutions décimales allant jusqu'à 10^{-15} , vue la charge indénombrable des premières dilutions,

le même protocole d'étalement de boîtes leur a été effectué, ainsi que le nombre de répétitions.

I.2.4.3. Méthode de diffusion en milieu gélosé (Test de sensibilité)

- **Ensemencement et dépôt des disques**

La méthode adoptée est celle de diffusion de disques décrite par (GULLUCE et *al.*, 2003). Avec la suspension bactérienne standardisée, nous avons ensemencés en surface d'un milieu gélosé MH en stries serrées (répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois), nous avons rechargés l'écouvillon à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche (les répétitions).

Nous avons utilisé des disques de papier WATTMAN stériles de 6 mm de diamètre, imprégnés d'extrait (20µl) et déposés délicatement sur la surface de la gélose de l'ordre de 5 à 6 disques/boîte. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en mm.

Un disque de papier WATTMAN imprégné de DMSO servait de témoin négatif. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture des résultats**

Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 6mm et à l'intérieur de la quelle aucune croissance bactérienne n'est observée, Toutes les déterminations sont faites en duplicata et les zones ont été mesurées en incluant le diamètre du disque (6mm).

Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (CHOI et *al.*, 2006), La sensibilité aux différents extraits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit :

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

I.2.4.4. Détermination des paramètres d'inhibition: CMI, CMB et CMI/CMB

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 24 à 48 heures d'incubation (WAN et *al.*, 1998 ; CANILLAC et MOUREY, 2001).

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

Matériel et Méthodes

Elle est réalisée selon la méthode de micro dilution en milieu liquide (micro-méthode), dans des tubes eppendorffs, elle a pour objectif la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) à partir d'une gamme de concentrations des extraits dans le milieu de culture spécifique de nos souches lactiques.

Une progression géométrique de raison d'1/2 des concentrations d'extraits de margines et feuilles d'olivier sauvage, (tableau XII) a été réalisée dans du DMSO, 100 µl de bouillon MRS-cystéine ensemencé de 10^6 UFC /ml d'inoculum a été par la suite déposé. Les témoins sont réalisés comme suit :

- Témoin négatif : extrait (à différentes dilutions) + milieu de culture ;
- Témoin positif : inoculum bactérien + milieu de culture.

Deux répétitions ont été réalisées pour chaque dilution, ainsi que pour les témoins positifs et négatifs, servant pour l'analyse statistique des échantillons.

Les cultures ont été incubées pendant 24h à 37 °C. Après incubation, la CMI a été déterminée comme étant la plus faible concentration ayant inhibé toute croissance visible.

✓ Préparation de la gamme des dilutions

Tableaux XII : Représentant les dilutions réalisées pour la détermination des CMI.

Rapport de dilution de l'extrait brut	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Pourcentage de dilution	50	25	12,5	6,25	3,12

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

La CMB est déterminée après avoir étalé les bactéries prélevées à partir des puits où nous avons observé visuellement une inhibition de croissance.

✓ Rapport CMB/CMI

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

I.2.5. Etude statistique

Les résultats ont été présentés par la moyenne suivie de l'écart-type ($n = 2$) pour chaque cas. L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel statistique Ri386 version 3.1.1. Pour cette analyse, nous avons utilisé le test de STUDENT pour deux moyennes et le test d'ANOVA à un facteur pour plus de deux moyennes; Il nous permet de vérifier si les échantillons sont issus de la même population ou présentant des différences significatives.

Dans le cas d'une différence significative le test d'ANOVA est suivi par l'analyse complémentaire de Newman-Keuls afin d'établir les différents groupes homogènes. Le niveau de signification était $p 0,05$.

II- Résultats et Discussion

II. Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

✚ Rendement d'extraction des feuilles d'oléastre

Les Rendements d'extraction, aqueuse à différentes températures et organique à température ambiante, des feuilles de l'olivier sont consignés dans le tableau ci-dessous.

L'analyse de la figure 17 nous montre que les rendements d'extraction varient en fonction du solvant organique utilisé pour les extraits organiques, et en fonction de la température de traitement pour les extraits aqueux.

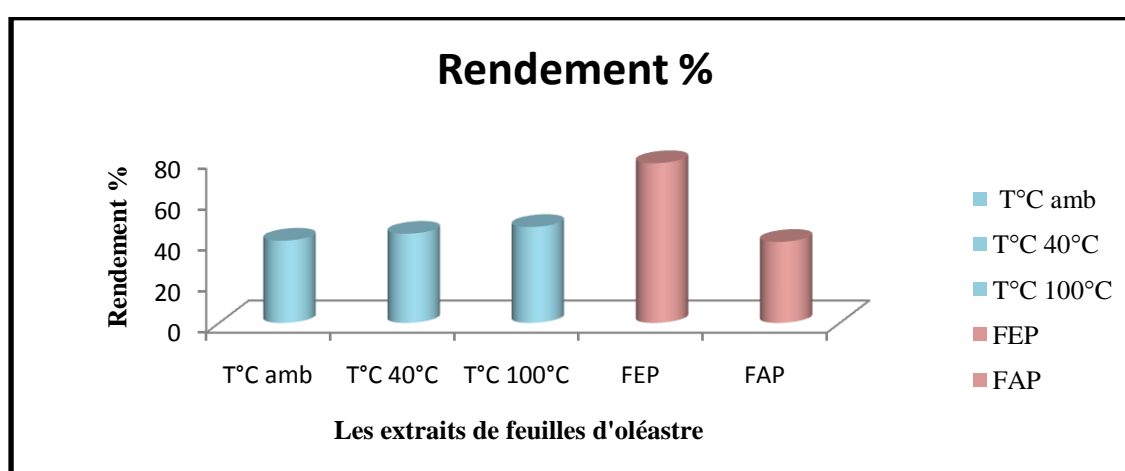


Figure 17 : Rendement des extraits bruts des feuilles d'oléastre (Variété *chamlal*).

FEP : extrait de feuilles d'oléastre à l'éthanol ;

FAP : extrait de feuilles d'oléastre à l'acétate d'éthyle.

En comparant, entre les deux types d'extractions, aqueuse et organique, le meilleur rendement a été obtenu par un solvant, qui est l'éthanol.

Le rendement d'extraction aqueuse de la poudre de feuilles à 100°C (46,87%) est nettement supérieur à ceux obtenus à 40°C et T°C ambiante, avec des valeurs respectives 43,56% et 40,18%.

Pour les extraits organiques, l'extrait FEP obtenu par l'éthanol 80° représente le meilleur rendement d'extraction avec un pourcentage de 78,06% par rapport à FAP (39,59%), obtenus respectivement par l'éthanol 80° et l'acétate d'éthyle.

Le test statistique (ANOVA) a révélé une différence très hautement significative au dessus du seuil 5%.

En fait, SU et ses collaborateurs (2006) ont rapporté que le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température. Cela est expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (ALBANO et MIGUEL, 2010).

Des études ont rapportés que les hauts rendements sont habituellement obtenus avec l'éthanol et le méthanol et leurs mélanges avec l'eau. En effet l'eau joue un rôle important dans le processus d'extraction des polyphénols en augmentant la diffusion des solvants dans les tissus végétaux (ALTIOK et *al.*, 2008).

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

✚ Rendement d'extraction des margines d'olives

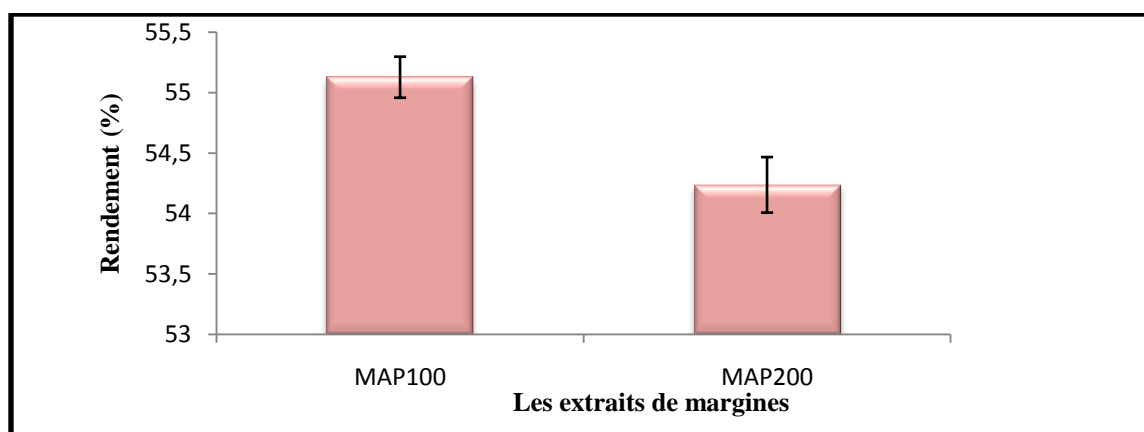


Figure 18 : Rendement des extraits bruts organiques de margines d'olive (Variété *chamlal*).

MAP100 : Extrait de margines à l'acétate d'éthyle, 100ml margines/100ml solvant ;

MAP200 : Extrait de margines à l'acétate d'éthyle 100ml margines/200ml solvant.

Statistiquement il n'y a pas de différence significative de rendement d'extraction en utilisant deux concentrations différentes (p -value $<0,05$).

Le fait que le rendement n'augmente pas au de là des 55% avec l'augmentation de la concentration du solvant, cela est probablement lié à la spécificité du pouvoir d'extraction de l'acétate d'éthyle pour certaines classe phénoliques.

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

II.2. Quantification des composés phénoliques

✚ Teneur en PPT des extraits de feuilles d'oléastre

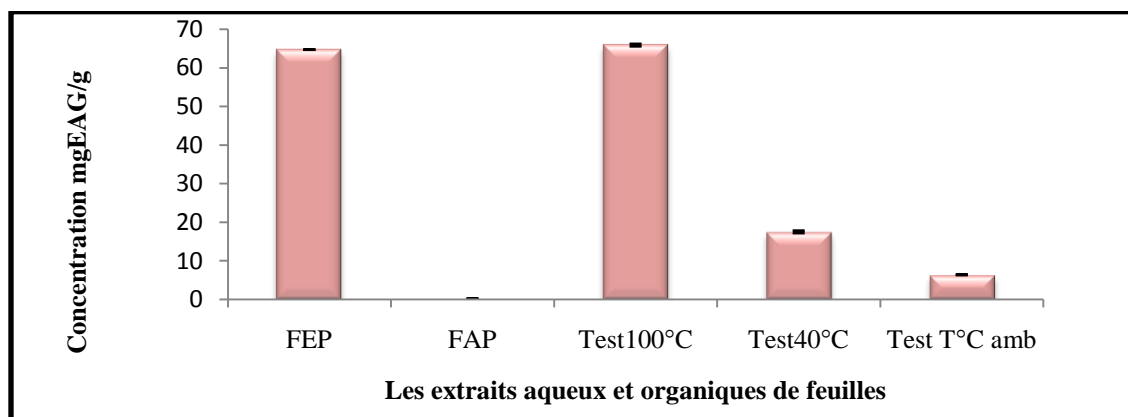


Figure 19 : Teneur en polyphénols totaux des extraits aqueux et organiques de feuilles de l'olivier.

FEP : Extrait de feuilles d'oléastre à l'éthanol ;

FAP : Extrait de feuilles d'oléastre à l'acétate d'éthyle ;

T°C ambiante : Extrait aqueux de feuilles de l'olivier sauvage à température ambiante ;

T°C 40°C : Extrait aqueux de feuilles de l'olivier sauvage à 40°C ;

T°C 100°C : Extrait aqueux de feuilles de l'olivier sauvage à 100°C.

Une différence remarquable a été enregistrée entre les teneurs en PPT des extraits organiques et des extraits aqueux.

Pour les extraits aqueux, on remarque que la teneur en PPT augmente avec l'augmentation de température d'extraction, vu que la différence est très hautement significative entre les différentes concentrations ($p\text{-value} > 5\%$) ; le test complémentaire a classé chaque extrait dans un groupe homogène à part.

Cependant, dans l'extraction organique, la valeur la plus élevée était celle de FEP ($64,71 \pm 0,015$) mgEAG/g de poudre végétale, suivie de l'extrait à l'acétate d'éthyle (FAP) ($0,18 \pm 0,007$) mgEAG/g de poudre végétale, avec une $p\text{-value} > 5\%$ et trois groupes homogènes.

Nos résultats sont parfaitement cohérents avec ceux d'AOUCHICHE et BOUMGHAR (2015), où la fraction eau-éthanol de leurs extraits de feuilles d'oléastre a montré le montant le plus élevé en CP.

Dans une étude, DJERIDANE et *al.* (2007) ont dosé les polyphénols totaux dans un extrait éthanolique (80%), la teneur trouvée était 103,4 mg EAG/g de poudre sèche, ce résultat est relativement très élevé, il est proche de celui trouvé dans notre étude. Cette teneur peut atteindre plus de 450 mg EAG/g d'extrait quand l'extraction est réalisée avec une solution alcoolique à 50 % selon AKROUT et *al.* (2011).

D'après les résultats obtenus, l'éthanol était le meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols, d'ailleurs MOHSEN et AMMAR (2009) et MICHAILOF et *al.* (2008) sont arrivés au même constat.

Ces auteurs ont expliqué cette différence par la polarité de chaque solvant qui permet de séparer les composés de la poudre de feuilles selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et l'affinité que présente chacun d'eux pour une et/ou des familles bien précises de ces substances phénoliques ; permettant ainsi de séparer les PPT selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et triglycosylés). Cette quantité diminue avec la polarité du solvant utilisé, l'éthanol puis l'acétate d'éthyle.

Et selon SEIDEL, (2005), Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité.

De plus, le déroulement de la macération sous agitation pendant un temps étalé et à température ambiante permet, respectivement, l'épuisement du solvant en composés extraits et la prévention de leur altération ou modification probable par la température élevée.

Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif, donnant un taux phénoliques apparent élevé (TAWAHA et *al.*, 2007).

En outre, certaines substances, telles que la vitamine C, les caroténoïdes, les sucres réducteurs et les acides aminés phénoliques, peuvent en réduisant le complexe phosphotungstique-phosphomolybdique interférer et conduire à une surestimation de la teneur en CP (OBIED et *al.*, 2005). En fait cette méthode donne un aperçu sur la qualité réductrice d'un ensemble de composés en plus des CP.

✚ Teneur en PPT des extraits de margines

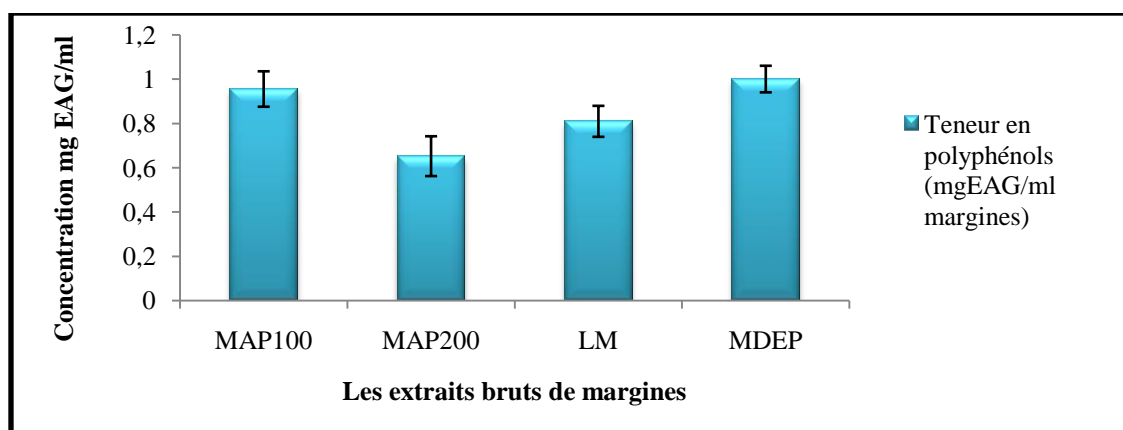


Figure 20 : Teneur en polyphénols totaux des extraits de margines.

MAP100 : Extrait de margines à l'acétate d'éthyle, 100ml margines/100ml solvant ;

MAP200 : Extrait de margines à l'acétate d'éthyle 100ml margines/200ml solvant ;

LM: Lyophilisat de margines;

MDEP : Extrait de margines au diéthyلة éther.

Nous constatons d'après ces résultats que la teneur la plus élevée en polyphénols est obtenue par le diéthyلة éther ($1 \pm 0,17$) mgEAG/ml margines, suivie de l'acétate d'éthyle MAP100 et MAP200 avec ($0,95 \pm 0,15$ et $0,65 \pm 0,15$) mgEAG/ml margines respectivement, puis vient lyophilisat de margines ($0,80 \pm 0,23$) mgEAG/ml margines. Statistiquement ces différences ne sont pas significatives (p -value $< 0,05$).

D'après ces résultats, nous pourrions évoquer que l'augmentation du volume de l'acétate d'éthyle de 100 à 200ml n'a pas affecté la quantité de polyphénols charriée, ainsi que l'utilisation de deux solvants différents (acétate d'éthyle et diéthyلة éther) n'a pas de répercussion sur la teneur de substances phénoliques extraite, cela pourrait être dû au fait que les deux solvants utilisés ont une polarité proche et une affinité vis-à-vis les mêmes classes phénoliques contenues dans les margines.

Selon LIU et al. (2014) l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des formes aglycones ou mono O-glycosides et partiellement di-O-glycoside, tandis que le diéthyلة éther est utilisé pour extraire une quantité considérable d'aglycones. Alors que le butanol peut extraire des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycoside.

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

L'acétate d'éthyle était le meilleur solvant pour l'extraction des PPT des margines d'olives selon AOUCHICHE et BOUMGHAR (2014).

Cette idée a été soutenue par AIT BADDI *et al.* (2008), en démontrant lui aussi que l'acétate d'éthyle exerce un haut pouvoir d'extraction des polyphénols de margines, il contribue également à l'élimination des fractions protéiques, glucidiques et acides organiques qui peuvent interférer avec l'extrait phénolique.

RODI *et al.*, (2002) ont rapportés qu'après extraction de l'huile d'olive, moins de 2% des composés phénoliques du fruit se retrouvent dans celle-ci et plus de 98% passent dans les margines appelées aussi eaux de végétation, par conséquent ce résidu est considéré comme une source importante de polyphénols. Cependant leur qualité et leur quantité dépendent de plusieurs facteurs qui sont en général géographiques, variétaux, saisonniers...etc.

II. 3. Mise en évidence de l'activité antioxydante et pourcentage de piégeage

Jusqu'à présent, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (PRIOR *et al.*, 2005). Dans ce travail nous nous sommes contentés sur l'utilisation de la technique la plus simple : Test DPPH•, qui permet l'analyse rapide de l'activité antioxydante d'un grand nombre d'échantillons et donne des résultats reproductibles (GULÇIN *et al.*, 2010).

✚ Pouvoir antioxydant des extraits de feuilles d'oléastre

Le pouvoir antiradicalaire des différents extraits bruts des feuilles est illustré dans le graphe suivant (Figure 21).

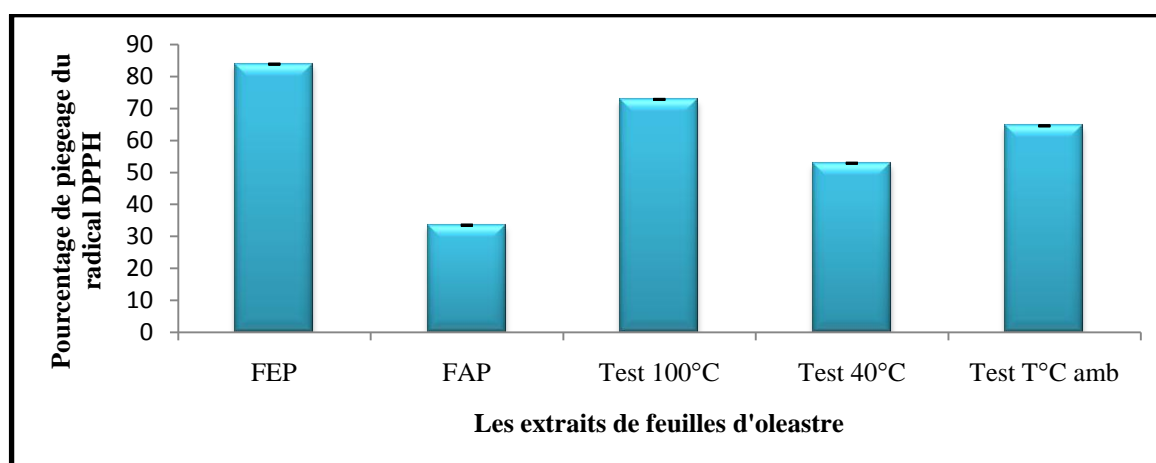


Figure 21: Pourcentage de réduction du radical DPPH• par les extraits de feuilles de l'olivier.

L'activité antioxydante des extraits de l'olivier est différente, par ordre décroissant, FEP 83,69% > Test100°C 72,65 % > T°Camb 64,29% > Test40°C 52,65% > FAP 33,30%.

Résultats et Discussion

Le même ordre a été obtenu statistiquement dont la différence est très hautement significative (p-value>5%) et le test complémentaire Newman-Keuls nous a établi 6 groupes homogènes.

D'après ces résultats, le pouvoir antiradicalaire diffère selon la température utilisée dans l'extraction aqueuse, et le type de solvant pour l'extraction organique, Il paraît que les extraits éthanoliques sont d'excellents piègeurs de radicaux libres avec des pourcentages dépassant les 80% suivi des extraits aqueux à 100°C (72,65 %).

Selon plusieurs auteurs, le pouvoir antiradicalaire des PPT peut être le résultat soit de leur concentration ou de leur composition, par conséquent, nous avons effectué le test de régression linéaire afin de vérifier la relation entre les différents teneurs en polyphénols et leur pouvoir réducteur.

Les résultats de pourcentage d'inhibition du radical DPPH• obtenus, révèlent que les extraits de feuilles de l'olivier possèdent une activité anti radicalaire dose dépendante. En effet, KANG et *al.* (2003) ont suggéré que les extraits des végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité anti radicalaire élevée.

Ce résultat est confirmé par DAMAK et *al.* (2008), qui ont rapporté que la concentration en polyphénols totaux est corrélée significativement avec la capacité antioxydante.

Pareil pour LOZIENE et *al.* (2007), lesquels ont remarqué que la quantité de DPPH• non piégée (résiduel) diminue en fonction des concentrations utilisées ;Confirmant ainsi la dépendance de la capacité antioxydante évaluée généralement par le test de DPPH de la quantité en PPT.

BENSALLAH et *al.*, 2012, ont étudié l'activité antioxydante des feuilles d'une variété de l'olivier cultivé dans la région Chemlali en Tunisie.

Les auteurs ont obtenu en utilisant l'eau/éthanol (30/70) (v/v) comme solvant d'extraction un résultat similaire avec celui que nous avons ressorti, ce qui montre que les feuilles de l'olivier sauvage pourrait être une nouvelle source des antioxydants naturels qui peuvent être exploités dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (SAVARESE et *al.*, 2007).

Elles possèdent la plus forte capacité à piéger les radicaux libres par rapport aux différentes parties de l'arbre, et présentent aussi une concentration importante en composants à haute valeur ajoutée (SAVOURNIN et *al.*, 2001).

En effet, l'oleuropéine et ses dérivés l'hydroxytyrosol et le tyrosol ont montré leur pouvoir antiradicalaire *in vitro* et *in vivo* (VISIOLI et GALLI, 2002 ; VISIOLI et *al.*, 2004).

Résultats et Discussion

Mais le plus important c'est que l'effet antioxydant produit par les extraits de feuilles est toujours le plus fort grâce à la synergie des flavonoïdes, des phénols et de la richesse en Oleuropéine (RAUWALD *et al.*, 1994).

Cette confirmation concorde avec les conclusions de LEE (2009) sur la particularité de l'effet antioxydant des composés contenus dans les extraits de feuilles de l'olivier, et celles de BENAVENTE-GARCIA *et al.* (2000), qui montrent la richesse des feuilles de l'olivier en CP à effet synergique élevé, comme les oleurosides (oleuropéine et verbascoside), les flavones (lutéolin-7-glucose, et diosmétin-7-glucose), les flavonols (rutine), flavan-3-ols (catéchine), et les substituts des phénols (tyrosol, hydroxytyrosol, vanilline, acide vanillique, et acide caféique).

✚ Pouvoir antioxydant des extraits de margines d'olives

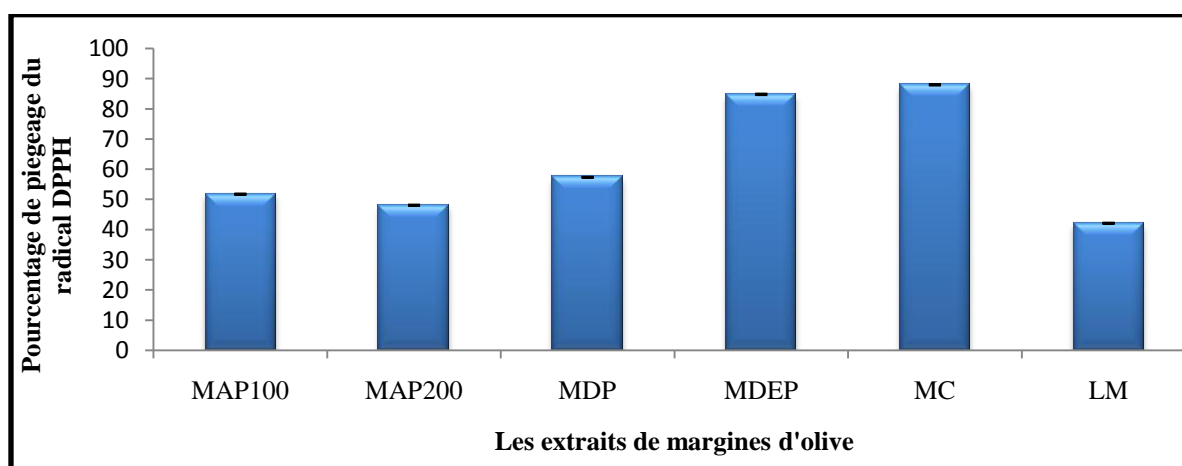


Figure 22: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH• par les extraits de margines.

MAP100 : Extrait de margines à l'acétate d'éthyle, 100ml margines/100ml solvant ;

MAP200 : Extrait de margines à l'acétate d'éthyle 100ml margines/200ml solvant ;

MDEP : Extrait de margines au diéthyle éther v/v ;

LM : Lyophilisat de margines.

Pareil pour les extraits de margines, ils ont montré des activités antiradicalaires différentes classés suivant un ordre décroissant, MC (87,95%) > MDEP (84,64%) > MDP (57,28%) > MAP100 (51,51%) > MAP200 (47,93%) > LM (42,05%).

Le test statistique ANOVA a révélé une différence très hautement significative ($p > 5\%$), et son test complémentaire Newman-Keuls a classé les différents extraits en quatre groupes homogènes.

Les margines sont riches en hydroxytyrosol (HAMDEN *et al.*, 2009) qui possède une activité antioxydante très importante recherchée dans le domaine agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique (MANNA *et al.*, 1999 ; D'ANGELO *et al.*, 2005).

Il est largement répandue dans la littérature que ce n'est pas nécessairement une forte teneur en polyphénols exhibe une activité antioxydante puissante (MOURE *et al.*, 2001).

Cette différence pourrait être attribuée aux divers composés extraits par les solvants de polarité différente, LAFKA *et al.* (2013) ; KANG *et al.* (2003) ont suggéré que les extraits des végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité antiradicalaire élevée.

Il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (HEIM *et al.*, 2002) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (TORRES DE PINEDO *et al.*, 2007), ce qui peut expliquer en partie la faible activité antioxydante du tyrosol qui ne possède qu'un seul groupement hydroxyle (-OH) dans sa structure.

Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (RODRIGUEZ-BERNALDO *et al.*, 2009). Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (KOURI *et al.*, 2007).

Les résultats de KHLIF *et al.* (2015) montrent que les extraits méthanoliques ont une activité antioxydante plus élevée que les extraits à l'acétate d'éthyle, cette proportionnalité entre l'activité antiradicalaire et le type de solvant pourrait être dû à la variation de la composition chimique de nos extraits testés et leurs concentrations (YOU-CHENG HSEU *et al.*, 2008).

✚ Suivi de la cinétique de réduction du radical DPPH.

Les figures ci dessous, montrent l'activité antiradicalaire des extraits de feuilles de l'oléastre et de margines d'olives testés, une cinétique a été établie pour chacun d'entre eux afin de comparer leur vitesse de réduction des radicaux libres.

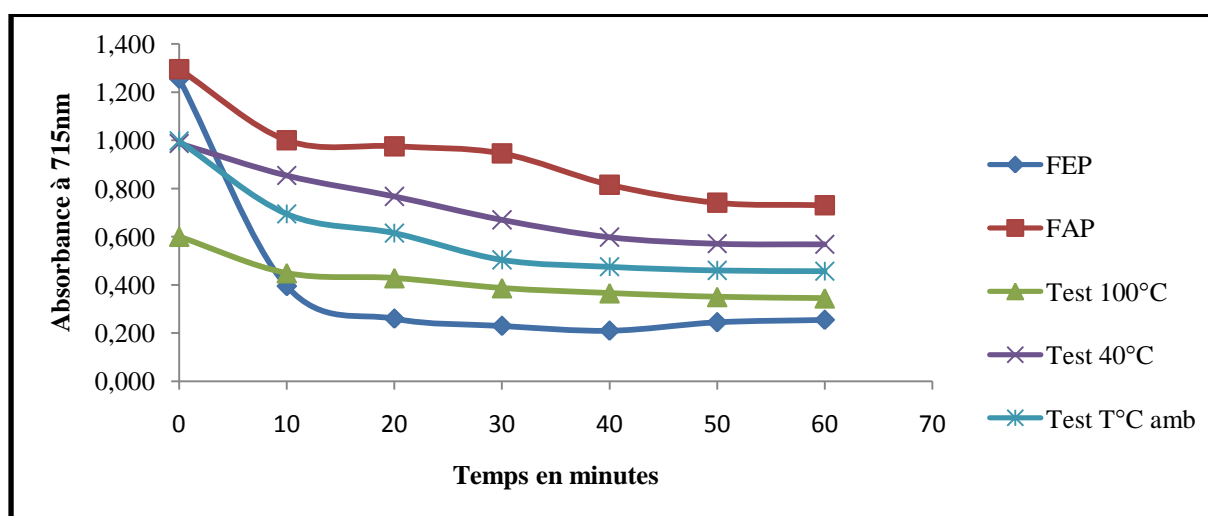


Figure 23: Cinétique de l'activité antioxydante des différents extraits de feuilles d'oléastre.

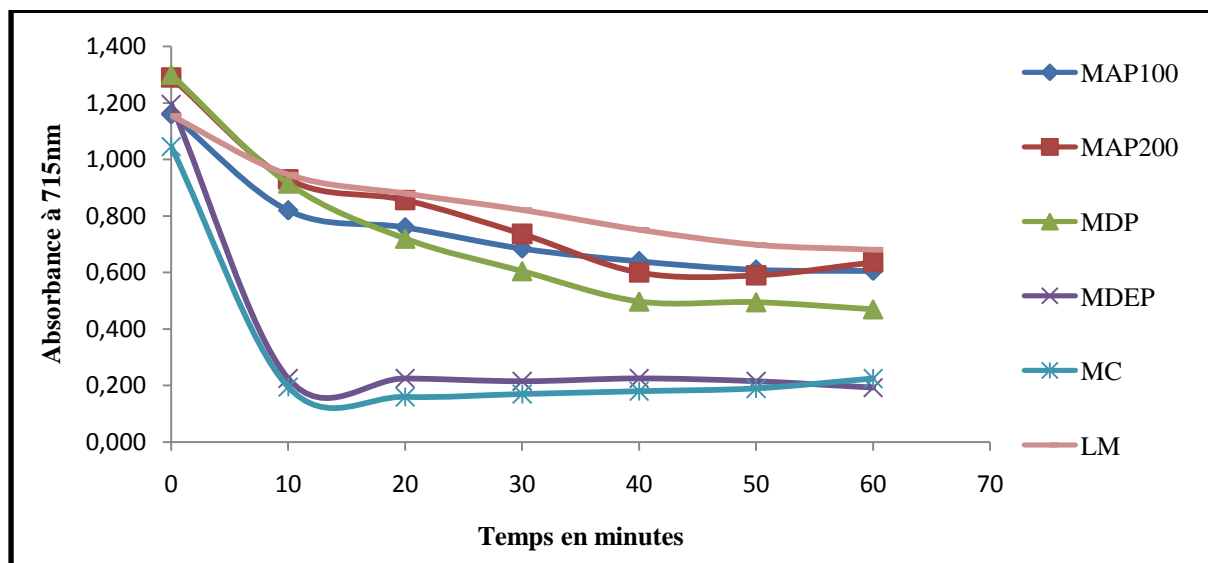


Figure 24: Cinétique de l'activité antioxydante des différents extraits de margines d'olives.

Selon les figures 23 et 24, chaque extrait phénolique présente une cinétique de réduction du radical DPPH· à une vitesse différente et spécifique; une évolution rapide a caractérisée les extraits de margines à l'acétate d'éthyle, l'extrait éthanolique de poudre de feuilles et l'extrait aqueux à 100°C.

Ces mêmes résultats ont été trouvés par AOUCHICHE et BOUMGHAR (2015), avec des extraits de feuilles de l'olivier sauvage (*Chamlal*) à l'éthanol et de margines à l'acétate d'éthyle.

Généralement, un bon inhibiteur est un agent ayant une activité antioxydante qui varie proportionnellement avec sa concentration (ANTOLOVICH *et al.*, 2004), ce qui est le cas de tous les extraits testés.

D'après BOUZID *et al.* (2011) et GRESELE *et al.* (2011) le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction sont influencés par plusieurs facteurs, notamment les conditions de réaction (temps, rapport antioxydant/DPPH, type de solvant utilisé et le PH).

II.4. Viabilité des probiotiques en présence des extraits bruts

II.4.1. Estimation de la biomasse cellulaire

Les trois extraits aqueux de feuilles d'oléastre ont été testés sur toutes nos souches probiotiques ; La figure 25 représente les résultats des biomasses obtenues sur milieux liquides des tests 100°C, 40°C et température ambiante (25°C).

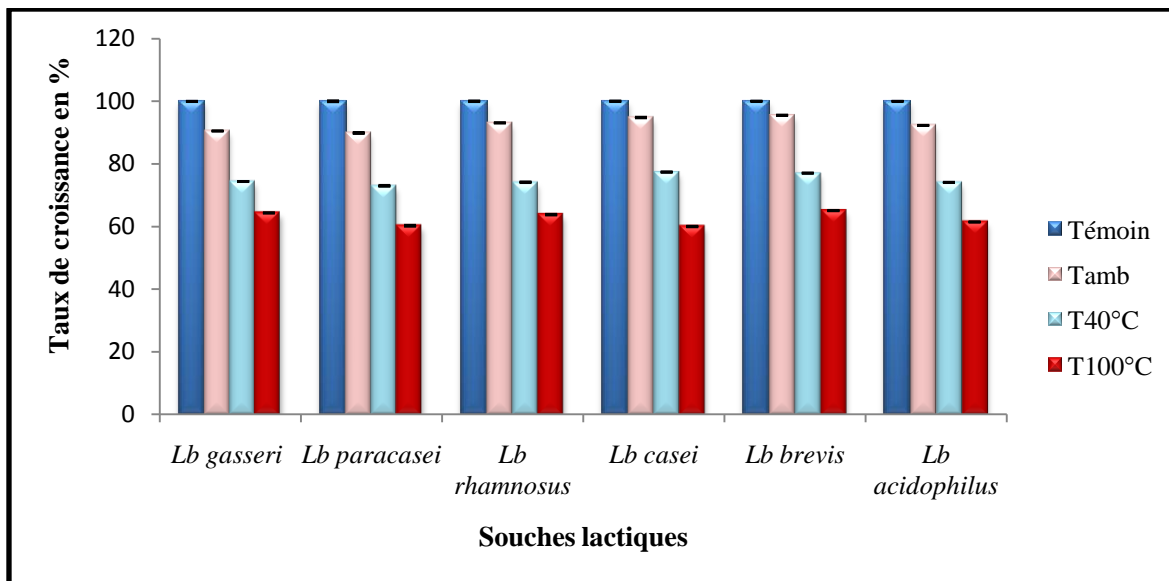


Figure 25 : Taux de croissance (biomasse) des bactéries probiotiques en présence des extraits aqueux de feuilles d'oléastre.

T°C ambiante : Extrait aqueux de feuilles de l'olivier sauvage à température ambiante ;

T°C 40°C : Extrait aqueux de feuilles de l'olivier sauvage à 40°C ;

T°C 100°C : Extrait aqueux de feuilles de l'olivier sauvage à 100°C.

Nous remarquons que le comportement des six souches probiotiques est similaire, il est caractérisé pas une diminution de la biomasse cellulaire en fonction de l'augmentation de la température d'extraction. Ceci pourrait être dû au fait qu'elles appartiennent au même genre (*Lactobacillus*).

Comparant le taux de croissance des bactéries lactiques aux teneurs des PPT des différents extraits aqueux, nous constatons qu'il y a une relation inversement proportionnelle entre eux.

Les extraits à 100°C (60%) montrent une activité inhibitrice plus importante que ceux de 40°C (75%) et de température ambiante (92%).

Cette différence est très hautement significative entre les actions inhibitrices des extraits sur chaque souche bactérienne, le test complémentaire Newman-Keuls a classé à chaque fois les extraits dans trois groupes homogènes.

Dans une étude similaire de JUAN M. RODRIGUEZ et *al.* (2010) qui porte sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne d'acides phénoliques sur *Lb. brevis* LCH23 et d'autres souches commensales confirme nos résultats, où toutes les souches étudiées ont montré des sensibilités vis-à-vis des composés phénoliques avec de légères différences entre leurs courbes de croissances établies.

Ces mêmes auteurs, ont rapporté que les acides 4-Hydroxybenzoïques et phénylpropioniques sont les composés les plus actifs contre toutes les souches Gram positif, aussi le nombre et la position des substitutions dans l'anneau de benzène des acides phénoliques influencent leur pouvoir antimicrobien contre *Lactobacillus*.

CAROLINA C.(2010) a expliqué la sensibilité de ces souches probiotiques vis-à-vis des extraits phénoliques par le fait que le Genre *Lactobacillus* est dépourvu d'une couche externe qui va lui procurer plus de résistance aux agressions extérieures, et qui faciliterait la diffusion des acides phénoliques par la paroi cellulaire, l'acidification intracellulaire, menant donc à la mort cellulaire (SHAN *et al.*, 2007).

D'autres interprètent cette sensibilité par la nature de leurs membranes bactérienne (perméable à la plupart des agents biocides) (FAUCHER et AVRIL, 2002).

Cependant L'AURA (2008) ; BRAUNE et BLAUT (2011), dans leur étude ont quantifié l'activité de deux enzymes microbiennes β -glucosidase et β -glucuronidase parce que l'ont considéré que ces deux enzymes sont les premières intervenant dans le métabolisme des flavonols glycosylés.

De plus SCHNEIDER, COLLINS ET BLAUT (1999) ont lié le phénomène de la croissance de quelques souches de probiotiques étudiées (*Lb. acidophilus* et *Lb. paracasei*) en présence des extraits bruts de thé dans leurs milieux de culture à leur pouvoir de puiser leur énergie de la bioconversion des polyphénols pour survivre, à l'aide de deux enzymes, β -glucosidase et β -glucuronidase.

La relation entre la saturation des chaînes polyphénoliques et le potentiel antimicrobien exercé contre les bactéries lactiques était peu claire et pas trop abordé.

II.4.2. Dénombrement des cellules viables sur boîtes

- Dénombrement initial

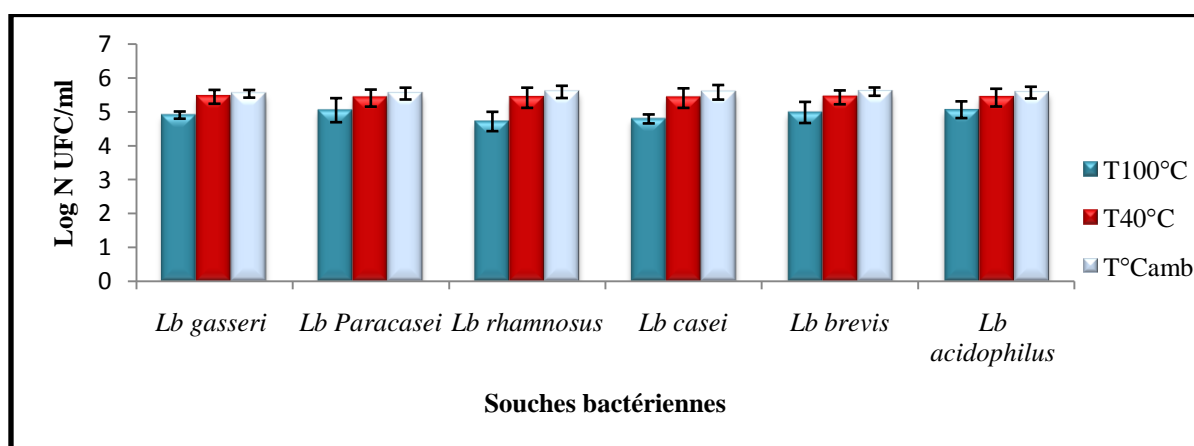


Figure 26 : Dénombrement initial des cellules viables en unités formant colonies.

• Dénombrement final

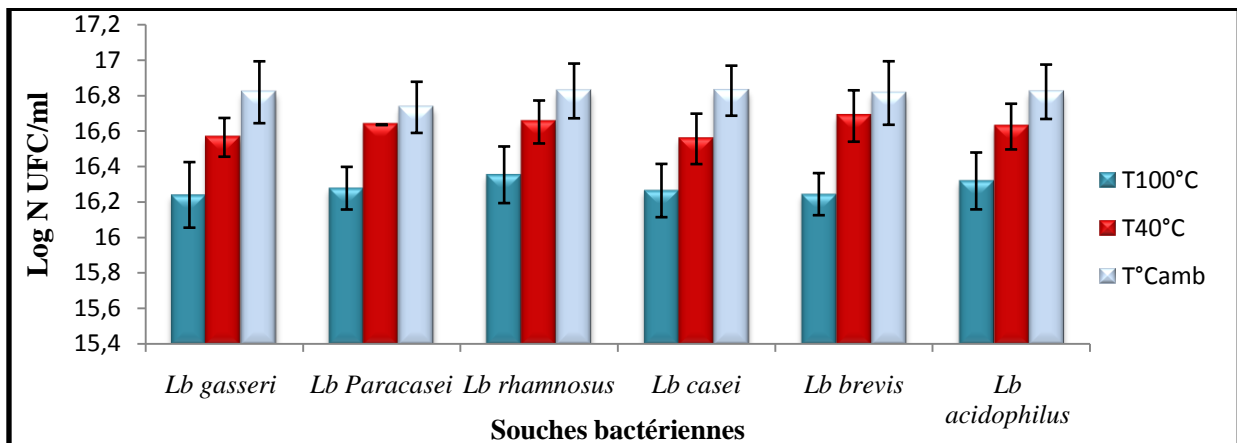


Figure 27: Dénombrement final de cellules viables en unités formant colonies.

T100°C : Extrait aqueux de feuilles d'oléastre à 100°C ;

T40°C : Extrait aqueux de feuilles d'oléastre à 40°C ;

T°C Camb : Extrait aqueux de feuilles d'oléastre à T°C ambiante.

Les résultats dans les figures 26 et 27 montrent que la croissance microbienne des six souches testées diffèrent en présence des trois extraits aqueux, par ailleurs nous avons enregistré une augmentation de l'UFC au cours du temps montrant la viabilité des cellules en question.

Le nombre des cellules viables diminue en fonction de l'augmentation la température d'extraction correspondant aux teneurs croissantes des PPT.

La différence entre les actions inhibitrices des extraits aqueux sur chaque souche bactérienne est très hautement significative ($p > 0,05$), le test complémentaire Newman-Keuls a classé à chaque fois les extraits dans trois groupes homogènes.

Par ailleurs, la différence entre l'effet de chaque extrait sur les souches entre elles n'est pas significative avec un seuil $< 5\%$.

Cette viabilité similaire a été confirmée par CEYLAN et FUNG (2004), en étudiant l'effet des infusions du thé sur des bactéries probiotiques (*L. acidophilus* L10 et *L. paracasei* L26).

Nos résultats sont en parfaite concordance avec ceux trouvés par AOUIDI (2012) dans son étude sur *Lb rhamnosus* et *Lb plantarum*, concernant l'indépendance de la souche testée et la dose utilisée sur l'augmentation de l'UFC au cours du temps.

L'effet antimicrobien de l'extrait de feuilles reporté dans ce travail confirme les travaux précédents de PEREIRA et al. (2007), SUDJANA et al. (2009) et LEE and LEE (2010) qui ont utilisé des tests *in vitro* appliqués sur une large gamme de microorganismes.

Selon (LARA-VILLOSLADA et *al.*, 2007) les hautes concentrations d'acides phénoliques (1000 mg/ml) peuvent limiter la viabilité *in vivo* des Lactobacilles. Cependant, plus d'études sont exigées pour élucider l'influence d'acides phénoliques sur la survie et les activités probiotiques dans des écosystèmes complexes comme l'intestin.

II.5. Méthode de diffusion sur agar

L'activité antibactérienne des extraits bruts (feuilles de l'olivier, margines), et l'AT a été évaluée dans cette étude par méthode des disques vis-à-vis les six souches lactiques étudiées, après 24 à 48 heures d'incubation à leur température optimale de croissance. Cette méthode permet de tester différents composés contre un seul microorganisme (RIOS et RECIO, 2005).

Les résultats des tests de sensibilité des espèces bactériennes aux extraits phénoliques biologiques et à L'AT sont consignés dans les tableaux ci-dessous.

Sensibilité bactérienne aux extraits de feuilles d'oléastre

La mesure des halos d'inhibition nous a permis de classer les bactéries suivant leur degré de sensibilité vis-à-vis des extraits.

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

Les diamètres des zones d'inhibitions provoqués par les extraits de feuilles de l'olivier sauvage sont illustrés dans le tableau suivant :

Résultats et Discussion

Tableau XIII: Diamètres des zones d'inhibition (mm) provoquées par les extraits de feuilles d'oléastre.

	T	FEP	Er	FE	FA
<i>Lb. gasseri</i>	14,25±0,35	13,3±0,42	—	12,5±0	—
	+	+	-	+	-
<i>Lb. paracasei</i>	15,25±0,35	15,25± 0,35	—	12,5± 0	—
	++	++	-	+	-
<i>Lb. rhamnosus</i>	11,25 ±1,76	—	8,6± 0,14	—	—
	+	-	+	-	-
<i>Lb. casei</i>	13,45± 0,35	14,95±0,07	—	12 ±0	—
	+	+	-	+	-
<i>Lb. brevis</i>	14 ± 0,42	13,65 ± 0,21	—	12,55 ± 0,07	—
	+	+	-	+	-
<i>Lb. acidophilus</i>	16,25± 0,35	13,75± 0,35	—	12,95 ±0,07	—
	++	+	-	+	-

(-) : pas de zone d'inhibition.

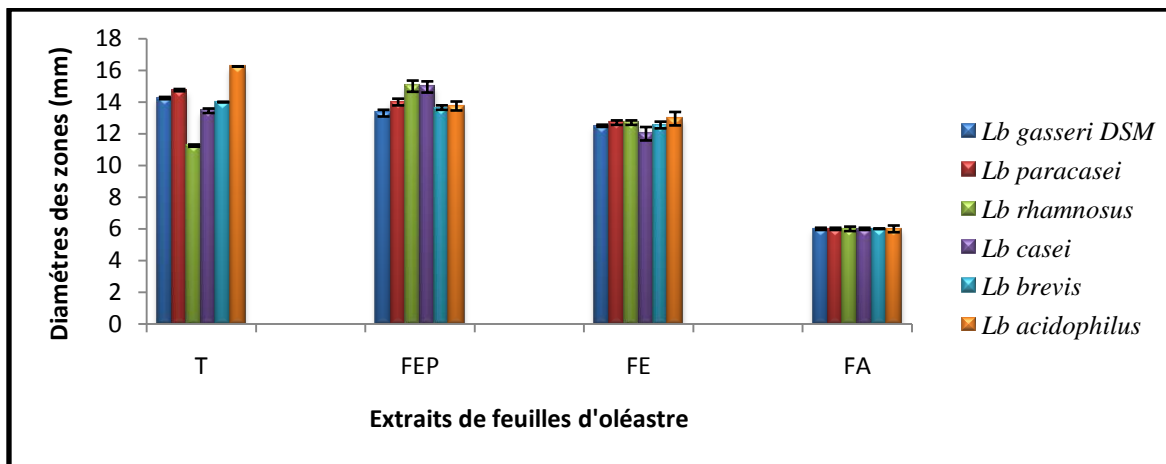


Figure 28 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) exercés par les extraits bruts de feuilles de d'oléastre sur les six souches probiotiques.

La figure 28 montre que l'ensemble des bactéries lactiques étudiées ont un comportement similaire vis-à-vis de chaque extrait testé, cela a été confirmé statistiquement où $p\text{-value} < 0.05$.

Nous remarquons aussi que les six souches probiotiques étaient résistantes à l'extrait organique obtenu par l'acétate d'éthyle avec un diamètre de 6mm, Cependant leur sensibilité vis-à-vis des autres extraits est considérée moyenne du fait qu'un diamètre supérieur à 14mm n'est obtenu qu'avec deux extraits FEP et AT à l'égard de deux souches seulement *Lb. acidophilus* et *Lb. paracasei*.

Nous constatons également que la résistance des probiotiques étudiés vis-à-vis les extraits biologiques utilisés (FEP, FE et MA) est meilleure par rapport à l'extrait synthétique (AT).

L'analyse statistique a révélé que la différence entre les actions inhibitrices des extraits sur chaque souche bactérienne est très hautement significative; le test complémentaire Newman-Keuls a classé à chaque fois les extraits dans quatre groupes homogènes.

La forte activité antibactérienne obtenue par l'AT avec des diamètres des zones d'inhibitions > 13 mm, nous a permis de dire que ce CP synthétique est très actif vis-à-vis de toutes les souches bactériennes. Comparativement aux résultats obtenus par MADI (2009), l'AT possède un effet considérable et important sur *S. aureus* (15 mm), ce qui est en accord avec notre résultat du fait qu'elle est Gram positif.

Ainsi les résultats obtenus par AOUCHICHE et BOUMGHAR (2015) montrent que l'AT exerce un large spectre d'activité, car il agit sur toutes les bactéries Gram positif et négatif, mais généralement le degré de sensibilité diffère d'une souche à une autre.

Résultats et Discussion

L'AT, par son action antimicrobienne forte n'est pas à la faveur des six bactéries de la microflore intestinale étudiées, cependant sa substitution par des polyphénols biologiques serait une alternative préconisée.

Selon CUEVA *et al.*, 2010, les acides phénoliques synthétiques exercent une activité antibactérienne importante contre plusieurs bactéries Gram positif.

Pour le degré de sensibilité de chaque microorganisme, nous pourrions admettre que les six bactéries étudiées ont le même comportement vis-à-vis les extraits phénoliques avec de légères nuances au sein des différentes espèces, cette réaction est interprétée par l'appartenance commune de ces dernières au même genre bactérien (les lactobacilles). Par conséquent, on ne pourra pas ressortir les plus sensibles et les plus résistantes. Par ailleurs, avec les extraits organiques du laurier noble, ces mêmes auteurs ont déduit que ces derniers agissent sur une large gamme de bactéries pathogènes (gram positif et négatif).

D'autres auteurs ont avancé que l'activité antibactérienne des composés phénoliques est due probablement à leur habilité à se combiner aux protéines solubles extracellulaire et ainsi aux parois cellulaires bactériennes (TSUCHIYA *et al.*, 1996).

A partir de ces résultats, on peut déduire et confirmer le pouvoir antibactérien des polyphénols, principalement l'AT. Par ailleurs, l'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants qui deviennent inactifs individuellement (SARKER *et al.*, 2005).

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

Résultats et Discussion

✚ Sensibilité bactérienne aux extraits de margines

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

Tableau XIV : Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne \pm SD) provoquées par les extraits de margines.

Extraits/ souches	L	MAP100	MAP200	MA10%200	MA10% 100	MDEP	M
<i>Lb. gasseri</i>	—	11,15 \pm 0,21	10,2 \pm 0,28	8,2 \pm 0,42	12 \pm 0	11,15 \pm 0,21	11,6 \pm 0,14
	-	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i>	—	11,6 \pm 0,14	11,7 \pm 0,14	10,65 \pm 0,21	10,9 \pm 0,14	11,4 \pm 0	11,6 \pm 0
	-	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. rhamnosus</i>	13,2 \pm 0,28	9,5 \pm 0,42	—	12,9 \pm 0,14	10,75 \pm 0,07	9,6 \pm 0,14	10,7 \pm 0
	+	+	-	+	+	+	+
<i>Lb. casei</i>	8,25 \pm 0,35	10,8 \pm 0,14	12,6 \pm 0,14	7,9 \pm 0,14	9,1 \pm 0,28	10,65 \pm 0,07	12,35 \pm 0,07
	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lb. brevis</i>	8,45 \pm 0,21	11,2 \pm 0,14	12,25 \pm 0,35	11,1 \pm 0,14	12,55 \pm 0,07	11,3 \pm 0,14	13,05 \pm 0,07
	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. acidophilus</i>	8,85 \pm 0,21	14,25 \pm 0,35	12,15 \pm 0,35	9,55 \pm 0,07	12,7 \pm 0,14	11,7 \pm 0,14	13,45 \pm 0,07
	+	+	+	+	+	+	+

(-) : pas de zone d'inhibition.

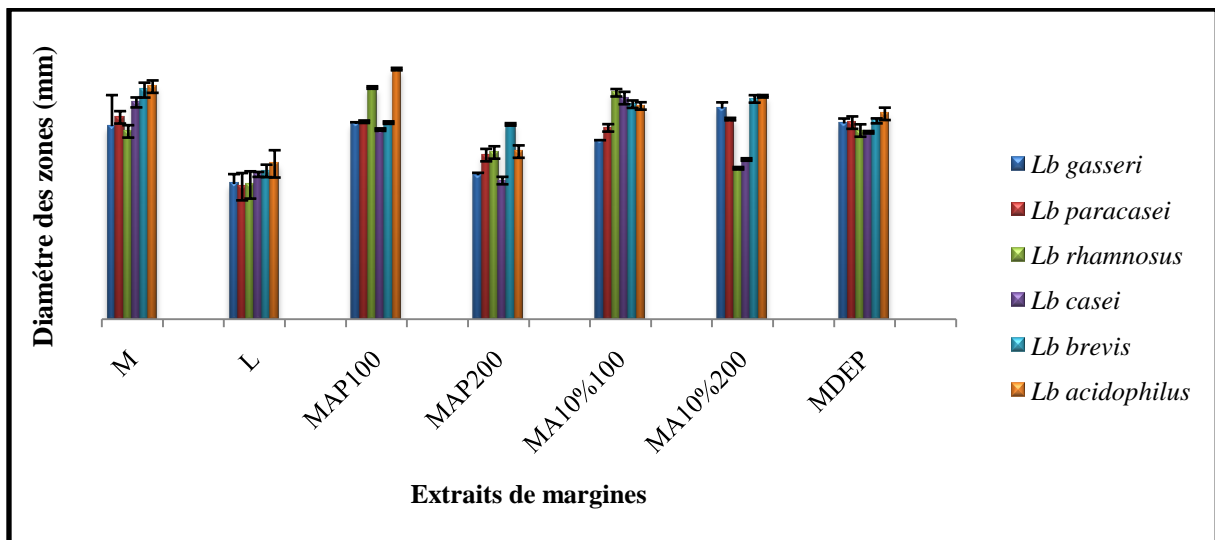


Figure 29 : Diamètres des zones d’inhibition provoqués par les extraits de margines sur six les souches de bactéries lactiques.

D’après la figure 29, chaque extrait a le même effet inhibiteur sur les six souches probiotiques testées avec une $p\text{-value} < 0,05$, par ailleurs la différence est très hautement significative entre l’action de chaque extrait sur l’ensemble des souches.

Selon les représentations du tableau XXI, l’ensemble des extraits de margines présentent un large spectre d’activité vis-à-vis de toutes les souches bactériennes probiotiques, avec des diamètres qui varient de $(7,9 \pm 0,14)$ à $(14,25 \pm 0,35)$ mm, ce qui nous amène à dire que cette différence de sensibilité des souches pourrait être dose-dépendante, sachant que les concentrations sont différentes, leur gamme varie de $(13,03 \mu\text{g}/20\mu\text{l})$ à $(525,28 \mu\text{g}/20\mu\text{l})$.

En plus, de l’influence de la concentration sur la sensibilité des souches, également, on peut déduire qu’il existe des CP actifs, généralement sur toutes les souches, (composition-dépendance) et particulièrement sur les bactéries Gram positif qui sont sensibles aux extraits de feuilles de l’olivier.

LEE et al. (2006) ont observé une certaine inhibition pour *L. casei* par l’acide phénylpropionique (62%), 4-hydroxy phénylacétique (19%) et des acides 4-hydroxypropioniques (19%) à une concentration de 1000 mg/ml. Cependant, *L. rhamnosus* était plus résistante (10 % d’inhibition) à l’action des mêmes acides.

Donc on ne peut pas négliger l’effet de ces extraits, et on peut le référencier aux concentrations déposées dans le disque et/ou la qualité ciblé en CP.

Les substances phénoliques contenues dans les margines sont potentiellement toxiques et inhibent le développement des micro-organismes (VERCAUTEREN, 1998). Le degré de toxicité des polyphénols dépend de leur nature et de leur degré de polymérisation (BECCARI et al., 1996). Ces composés agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (RANALLI, 1991).

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

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

Des travaux similaires réalisés par AOUCHICHE et BOUMGHAR (2015), sur des souches pathogènes ont révélé une sensibilité plus importante des souches appartenant au gram positif (*B. thermosphacta* CIP 103251 et *B. cereus*) que celles des gram négatif (*S. Aureus* ATCC 25923, et *P. aeruginosa* ATCC 27853) ayant une résistance totale pour tous les extraits testés ; ainsi leurs différents extraits de margines et feuilles d'olives se sont avérés plus efficace contre les bactéries pathogènes gram positif que gram négatif.

Confirmant les résultats précédents, il a été constaté que la force et le spectre de l'activité antibactérienne varient selon le type d'extrait, la qualité et quantité en polyphénols existant dans le volume déposé par chaque disque.

II.6. Détermination des paramètres d'inhibition CMI, CMB et CMI/CMB

Nous rapportons dans cette partie les CMI de nos extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide.

Elle correspond à la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance visible du germe en 24H.

✚ Extraits bruts de feuilles d'oléastre

Les CMI obtenues par les extraits de feuilles de l'olivier sont montrées dans les tableaux ci-dessous :

Tableau XV : Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en µg/ml) retenues par les composés phénoliques de feuilles d'oléastre.

Extraits	Souches bactériennes	CMI (µg/ml)
FEP	<i>Lb. gasseri</i>	5091,29
	<i>Lb. paracasei</i>	1272,82
	<i>Lb. rhamnosus</i>	2545,64
	<i>Lb. casei</i>	636,41
	<i>Lb. brevis</i>	5091,29
	<i>Lb. acidophilus</i>	5091,29

La classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI : (ALIGIANNIS et ses collaborateurs, 2001 in FABRI et al., 2009)

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

D'après le tableau XV et la classification présentés ci-dessus, l'extrait organique FEP a exercé une inhibition modérée sur *Lb. Brevis*, et une forte inhibition sur les cinq autres souches (*Lb. gasseri*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*).

Pour vérifier la nature de l'action inhibitrice (CMI) de l'extrait éthanolique, sur les six souches probiotiques, si elle est bactériostatique ou bactéricide (CMI/CMB), nous nous sommes intéressés à déterminer la CMB.

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

Résultats et Discussion

Tableau XVI : Les CMB et la nature de l'activité obtenue par les extraits de feuilles de l'olivier.

Extraits	Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
FEP	<i>Lb. gasseri</i>	1/4	1/4	1	Bactéricide
	<i>Lb. paracasei</i>	1/16	1/32	2	Bactériostatique
	<i>Lb. rhamnosus</i>	1/8	ND	ND	ND
	<i>Lb. casei</i>	1/32	1/64	2	Bactériostatique
	<i>Lb. brevis</i>	1/4	1/8	2	Bactériostatique
	<i>Lb. acidophilus</i>	1/4	1/16	4	Bactériostatique

ND : non déterminé.

FEP : Extrait de feuilles à l'éthanol.

Il ressort de ce tableau que l'action inhibitrice exercée par l'extrait de feuilles FEP est bactériostatique sur toutes les souches excepté *Lb. gasseri*, où les cellules bactériennes ont été complètement détruites.

✚ Les CMI retenues par les extraits de margines

Les CMI obtenues par les extraits de margines sont montrées dans le tableau ci-dessous :

Tableau XVII : Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en µg/ml) retenues par les extraits de margines.

Extraits	Souches	CMI (µg/ml)
MAP100	<i>Lb. gasseri</i>	421,34
	<i>Lb. paracasei</i>	421,34
	<i>Lb. rhamnosus</i>	421,34
	<i>Lb. casei</i>	421,34
	<i>Lb. brevis</i>	210,674
	<i>Lb. acidophilus</i>	421,34
	<i>Lb. gasseri</i>	125

Résultats et Discussion

MDEP	<i>Lb. paracasei</i>	31,25
	<i>Lb. rhamnosus</i>	62,5
	<i>Lb. casei</i>	62,5
	<i>Lb. brevis</i>	125
	<i>Lb. acidophilus</i>	125

MAP100 : Extrait de margines à l'acétate d'éthyle v/v ;

MDEP : Extrait de margines au diéthyle éther v/v.

En ce qui concerne les concentrations retenues par les deux extraits de margines, nous remarquons que toutes les valeurs sont inférieures à 500µg/ml; selon la classification précédente de ALIGIANNIS et ses collaborateurs (2001), nous déduisons que nos extraits de margines exercent une forte inhibition vis-à-vis les six bactéries probiotiques.

Pour les CMI obtenues avec l'AT réalisées dans une étude similaire par AOUCHICHE et BOUMGHAR (2015) montrent qu'il exerce une forte inhibition (CMI ≤ 500 µg/ml) vis-à-vis des souches bactériennes *P. marginalis* DSM 13124 (gram négatif) et *B. thermosphacta* CIP 103251 et une inhibition modérée pour *S. aureus* ATCC43300 (gram positif).

Selon RAMTIN et al. (2013) et DAI et al. (2013), les Gram positifs sont plus sensibles aux extraits de margines que Gram négatif.

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

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

Extraits	Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
MAP100	<i>Lb. gasseri</i>	1/8	¼	2	Bactériostatique
	<i>Lb. paracasei</i>	1/8	1/16	2	Bactériostatique
	<i>Lb. rhamnosus</i>	1/8	1/16	2	Bactériostatique
	<i>Lb. casei</i>	1/8	1/8	1	Bactéricide
	<i>Lb. brevis</i>	1/16	1/64	4	Bactériostatique
	<i>Lb. acidophilus</i>	1/8	1/8	1	Bactéricide
	<i>Lb. gasseri</i>	1/4	1/8	2	Bactériostatique
	<i>Lb. paracasei</i>	1/16	1/64	4	Bactériostatique

Résultats et Discussion

MDEP	<i>Lb. rhamnosus</i>	1/8	1/64	8	Bactériostatique
	<i>Lb. casei</i>	1/8	ND	ND	ND
	<i>Lb. brevis</i>	1/4	1/64	16	Bactériostatique
	<i>Lb. acidophilus</i>	1/4	1/32	8	Bactériostatique

L'interprétation des rapports CMI/CMB obtenus ne montrent pas beaucoup de variabilité, car la majorité des actions des deux extraits de margines vis-à-vis de toutes les souches étaient bactériostatique, à l'exception de l'extrait MAP100, qui a exercé un effet bactéricide à l'égard de *Lb. casei* et *Lb. acidophilus*.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Dans le présent travail, des tests biochimiques et microbiologiques ont été effectués avec les différents extraits aqueux et organiques obtenus avec les feuilles d'*Olea europaea* et les margines d'olives, pour pouvoir déterminer les activités antioxydantes et antimicrobiennes de nos extraits ainsi que de cerner le comportement et la viabilité des souches probiotiques testées vis-à-vis ces derniers.

Les extractions aqueuses et organiques ont permis d'obtenir des rendements qui diffèrent avec l'abaissement de température pour les extraits aqueux, et en fonction de la polarité du solvant utilisé, pour l'extraction organique; où nous avons obtenu le meilleur rendement avec l'éthanol (FEP=78,06%) et avec la température 100°C (46,87%).

La teneur en composés phénoliques totaux, était conséquente, nous avons confirmé nos résultats précédents, avec des taux de $(64,71 \pm 0,015)$ et de $(65,89 \pm 0,31)$ mg EAG/g de poudre végétale, pour FEP et T°C 100°C, respectivement. En raison de la polarité élevée de l'éthanol, pour le premier, et la température favorisante pour le second, cela avec les extraits bruts de feuilles d'oléastre.

Les extraits polyphénoliques de margines d'olives ont été marqués par une similarité de concentrations entre les extraits à l'aide d'acétate d'éthyle et diéthyle éther avec $(0,95 \pm 0,15)$ et $(1 \pm 0,17)$ (mgEAG/ml margines) respectivement.

La teneur des PPT dépend de la résultante de plusieurs facteurs: le type de solvant et sa polarité, la température de l'extraction, ainsi que le contenu hétérogène des extraits en différentes classes de composés phénoliques et leurs affinités avec l'extrait en question.

La capacité antioxydante la plus élevée a été observée dans les extraits les plus polaires, il s'agit en occurrence de l'éthanol et de l'acétate d'éthyle.

L'activité antioxydante permet de déduire que les deux sous-produits oléicoles étudiés présentent une source prometteuse de substances antioxydantes bioactives liée à leur contenu considérable en polyphénols.

Le pourcentage de réduction du radical DPPH• le plus élevé a été enregistré pour FEP avec 84,43% pour l'échantillon de poudre de feuilles ; et pour MAP100, MC, MDEP avec 87,88%, 88,23%, 83,59% respectivement, pour les extraits de margines d'olives.

Les résultats de test de sensibilité déterminée sur six souches probiotiques indiquent que la plupart des extraits possèdent une activité sur toutes les souches testées, elles ne manifestent une résistance qu'avec l'extrait FAP.

Les résultats de test de viabilité et de biomasse cellulaire sont inversement proportionnels avec la température d'extraction des trois extraits aqueux ($T^{\circ}C\ 100 > T^{\circ}C\ 40 < T^{\circ}C\ ambiant$).

En outre, la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents extraits testés montre que FEP exerce une faible inhibition à des concentrations qui varient de 636,41 à 5091,29 µg/ml vis-à-vis des six souches lactiques faisant l'objet de notre

Conclusion

étude, par contre MAP100 et MDEP ont un fort pouvoir inhibiteur avec des CMI entre 210,67 à 421,34 µg/ml et entre 31,25 et 125 µg/ml respectivement.

Les natures d'inhibitions ont été déduites après calcul du rapport CMI/CMB, et qu'était bactériostatique pour la majorité des souches excepté *Lb gasseri* pour FEP et *Lb acidophilus*, *Lb casei* pour MAP100.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue de les identifier.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement actives. Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydantes et des extraits de feuilles d'oléastre et margines d'olives, ainsi que leurs interactions avec le microbiote intestinal.

Les systèmes technologiques industriels peuvent donc exploiter les margines qui sont considérées comme une précieuse matière première très riche en polyphénols, afin de les employer à la place des antioxydants synthétiques dangereux. Suite à cette valorisation de ces sous-produits, l'impact environnemental va être réduit, ce qui mènerait les pays producteurs d'huile d'olive à profiter de cette matière première en tant que source économiquement non chère mais riche en polyphénols.

*Références
bibliographiques*

A

AFONSO V., CHAMPY R., MITROVIC D., COLLIN P., LOMRI A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. 637-638. *Separation and Purification Technology*. 62, 342-348.

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

AISSAM H. (2003). Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat nationale. *Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Fes.* 156p.

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

AIT-BELGNAOUI A., LAMINE F., HAN W., EUTAMENE H., FIORAMONTI J., BUENO L. et THEODOROU V. (2005). A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats. *Nutr. Ali. Fonct.* 3, 59-63.

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

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

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

ALTIOK E., DENIZ B., OGUZ B., SEMRA Ü. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea L.*) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62, 342-348.

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

AMARAL C., MARCO S., LUCA S., JOAO C., ANTONIO L., CRESPI, MARIA DO ROSARIO A.A., CELIA P.B. (2008). Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal. *Bioresource Technology*. 99, 7215-7223.

Références bibliographiques

AMMOR M.S. et MAYO B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production. *Meat. Science.*76, 138-146.

ANDERSON C. M., HALLBERG A., HOGBERG T. (1996). Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res.* 28, 65-180.

AOUCHICHE R., BOUMGHAR N. (2015). Evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante d'extrait de feuilles de laurier et de sous-produits de l'olivier. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Algérie.

ARTAUD M. (2008). L'olivier et ses contributions dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique. 06-07.

ARANDA S., MONTES-BORREGO M., JIMENEZ-DIAZ R.M., LANDA B.B. (2011). Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea L.* subsp *europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticilliumdahliae*. *Plant Soil* 343, 329–345.

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

ATLAN D., BEAL C., CHAMPONIER-VERGES M.C., CHAPOT-CHARTIER M.P., CHOUAYEKH H., COCAIGN-BOUSQUET M., DEGHORAIN M., GADU P., GILBERT C., GOFFIN P., GUEDON E., GUILLOUARD I., GUZZO J., JUILLARD V., LADERO V., LINDLEY N., LORTAL S., LOUBIERE P., MAGUIN E., MONNET C., MONNET V., RUL F., TOURDOT-MARECHAL R. et YVON M. (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. *In: Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc, Lavoisier.* Paris. 271-447.

AURA A.M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds. *Phytochem. Rev.* 7, 407-429.

AXELSSON L. (2004). Classification and physiology. *In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). *3e Ed., Marcel Dekker, Inc.* New York. 1-66.

B

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

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

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

Références bibliographiques

- BEAL C., MARIN M., FONTAINE E., FONSECA F. et OBERT J.P. (2008).** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F.M.). *Tec & Doc*, Lavoisier. Paris. 661-765.
- BECCARI M., BONEMAZZI F., MAJONE M., RICCARDI C. (1996).** Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive-oil milleffluent. *Water Research*, 30(1), 183-9.
- BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., LORENTE J., ORTUNO A. et DEL RIO J.A. (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea L.* leaves, *Food Chem*, 68, pp 457-462.
- BENBROOK C.M. (2005).** Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Rapport sur l'état des connaissances scientifiques. *The Organic Center for Education and Promotion*. 45.
- BENDINI A.L. CERRETANI S., VECCHI A., CARRASCO-PANCORBO G. LERCKER. (2006).** Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil Phenolics on Oxidative Stability in the Presence or Absence of Copper Ions. *J. Agric. Food Chem*. 54, 4880-4887.
- BETA T., NAM S., DEXTER J.E. et SAPIRSTEIN H.D. (2005).** Phenolic content and antioxydants Activity of Pearled wheat and Roller-Milled. Fractions. *Cereal chem.*82 (4), pp 390- 393.
- BITONTI M.B., CHIAPETTA A., INNOCENT A.M., MUZZALUPO I. et UCELLA N. (2000).** Biophenol functionality and distribution in *Olea europaea L.* Drupes. *Olivo & Olio*. 3(1/2), 20-29.
- BLAUT M., CLAVEL T. (2007).** Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J. Nutr*. 137, 751-755.
- BOUAZIZ M., SAYADI S. (2005).** Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 107, 497-504.
- BOUAZIZ M., FKI I., JEMAI H., AYADI M., 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 S. I., KECHAOU N. (2009).** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products*. Article in press.
- BOURKHIS B., OUHSSINE M, HNACHM., BOURKHIS M., SATRANI B., FARAH A. (2007).** Composition chimique et bio activité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis Articulata*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, 75-84.
- BOSSOKPI I.P.L. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagaraxanthoxyloïdes* LAM (*Rutaceae*). Thèse de pharmacie, Bamako. 133 p.

Références bibliographiques

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

BOUZID W., YAHIYAI M., ABDAIDDEM M.C., ABERKANE A., AYACHI. (2011). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *l'aubépine monoxygéné*. *Leban. Scien. J.* 12, 1-8.

BRETON C., PINATEL C., MEDAIL F., BONHOMME F., BERVILLE A. (2008). Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. 524-200.

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

BRUNETON J. (1993). Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 2^{ème} édition, Lavoisier Techniques et Documentaires, Paris.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie : Phytochimie, Plants Médicinales. 3^{ème} édition, Lavoisier Techniques et Documentaires, Paris.

C

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

CARDONA F., ANDRES-LACUEVA C., TULIPANI S., TINAHONES F J., QUEIRO-ORTUNO M.I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr Biochem.* 2013 Aug; 24 (8): 1415-22.

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

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

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

CAVINA M. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydante et anti radicalaire : « *Tinospora crispa* (*Menispermaceae*). *Merremia emerginata* (*Convolvulaceae*) et *Orpheanandra* (*Annonaceae*). Thèse de Doctorat. Université de l'Indonésie, 10-19.

Références bibliographiques

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

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

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

CHOI, S.H., GU, M.B.(2001). Phenolic toxicity detection and classification through the use of a recombinant bioluminescent *Escherichia coli*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 248e255.

CHOUCHENE A. (2010). Etude expérimentale et théorique de procédés de valorisation de sous-produits oléicoles par voies thermique et physico-chimique. *Food and Nutrition*. Université de Haute Alsace - Mulhouse, France.

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

CLIFFORD M.N. (2000). Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 8, 1063-1072.

COLLINS M.D., SAMELIS J., METAXOPOULOS J. et WALLBANKS S. (1993). Taxonomic studies of some *Leuconostoc* like organisms from fermented sausages, description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc* paramesenteroides group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 595-603.

COWAN M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (4), 564-582.

CROZIER A., CLIFFORD M.N., ASHIHARA H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

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

D

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

Références bibliographiques

D'ANNIBALE A., CASA R., PIERUCCHETTI F., RICCI M., MARABOTTINI R. (2004). *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*. 54, 887-894.

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

DE MARCO E., MARIA S., ANTONELLO P., RAFFAELE S. (2007). Characterisation and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chemistry*. 104, 858-867.

DENOUE D.C. (2004). Safety of novel probiotic bacteria. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouweland A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. *New York*. 531-546.

DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F., MICHAUD P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 1538, 1532-1552.

DICKO M.H., GRUPPEN H., TRAORE A.S., ALPHONS G.J., WILLEM J.H., BERKEL V. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 1 (1), pp. 21-38, April.

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

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

DOVERI S., BALDONI L. (2007). Olive in Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Ed C. Kole. Volume 4: Fruits and Nuts. 253- 264.

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

DPV. Direction de la production végétale. (2009). Département lié au ministère de l'agriculture, Rabat, Maroc.

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

Références bibliographiques

E

EDENHARDER R., GRÜNHAGE D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumenehydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 540, 1-18.

EKOUMOU C. (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de cinq recettes traditionnelle utilisés dans le traitement des infections Urinaire et la Cystite. Thèse Pharmacie, Bamako.145.

EL HAJJOUJI H., FAKHAREDINE N., BADDI G.A., WINTERTON P., BAILLY J.R., REVEL J.C., HAFIDI M. (2007). Treatment of olive mill waste water by aerobic biodegradation: an analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresource Technology.* 98, 3513-3520

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

F

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

FAVIER A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies à potentiel thérapeutiques. *Actualités en chimie.*108-115.

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

FIESTA ROS DE URSINO J.A., BORJA R. (1992). Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain *Grasas. Y. Aceites.* 2, 101-106.

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

G

GAMMOUDIA A. DANDANAA H. CHAHEDA S. FERCHICHIA S. ERNEZB A. MILED A. (2013). Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. Immuno-analyse et biologie spécialisée. 28,39-42.

Références bibliographiques

GAO K., XU A., KRUL C., VENEMA K., LIU Y., NIU Y.T., LU J.X., BENSOUSSAN L., SEERAM N.P., HEBER D., HENNING S.M.(2006).Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J. Nutr.* 136, 52-57.

GAUCHE E., HAUSSWIRTH C. (2006). Stress oxydant, Complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité.* 58, 43-66.

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

GBASSI K.G., VANDAMME T., YOLOU S.F., MARCHIONI E. (2011). In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *Int. Dairy J.* 21, 97-102.

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

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

GU R.X., YANG Z.Q., LI Z.H., CHEN S.L., LUO Z.L. (2008). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe.*14, 313-317.

GUARNER F., KHAN A.G., GARISH J., ELIAKIM R., GANGL A., THOMSON A., KRABSHUIS J. Le MAIR T. (2008). Recommandation Pratique: Probiotiques et Prébiotiques. WGO Practice Guidelines.3.

GUIGNARD J.L. 2000.Biochimie végétal 2^{ème} édition Dunod. 188 p.

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

GUIRO J.P., ROSEC J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237-251

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

H

HADDAD JHON J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors, Cellular Signalling Volume 14, Issue 11, November 2002; 879-897.

Références bibliographiques

HADI M. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse doctorat*. Université Louis Pasteur: 155 P.

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

HASSAN A.N., FRANK J.F. (2001). Starter Cultures and their use. In: Applied Dairy Microbiology (Marth E.H. et Steele J.L.) 2e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205

HAYOUNI E.A., ABEDRABBA M., BOUX M., HAMDY M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercuscoccifera* L. and *Juniperusphoenicea* L. fruit extracts. Food.

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

HENNEBELLE T., SAHPAZ S., BAILLEUL F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif, *Phytothérapie*. 1, 3-6.

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

HO T.N.T., TUAN N., DESCHAMPS A., CAUBET R., (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology.134-142.

HODEK P., TREFIL P., STIBOROVA M. (2002).Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450.*Chem. Biol. Interact.* 139, 1-21.

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

HOGG T. (2005). Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd. 188-190.

J

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

Références bibliographiques

JENNER A.M., RAFTER J., HALLIWELL B. (2005). Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds more options. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 763-772.

K

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

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

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

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

KHALID N.M., MARTH E.H. (1990). Lactobacilli, their enzymes and role. In: Ripening and spoilage of cheese. *Rev. Dairy Sci.* 73, 158-167.

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

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

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

KSOURI R., MEGDICHE W., DEBEZ A., FALLEH H., GRIGNON C., ABDELLY C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakilemaritima*. *Plant. Physiol Bioch.* 45,244-249.

L

LABIOU H., ELMOUALDI L., EI YACHIOUI M., OUHSSINE M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144, 237-250.

LAFKA T.A., LAZOU A.E., SINANOGLU J.V. & LAZOS E.S. (2011). Phenolic and

Références bibliographiques

antioxidants potential of olive oil mill wastes. *Food. Chem*, 125, 92-98.

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

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

LAMOUREUX L. (2000). Exploitation de l'activité β -galactosidase de cultures de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. National Library of Canada. 23-47.

LECLEC H., GAILLARD F.L., SIMONET M. (1994). Les grands groupes de bactéries. In : Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien. DOIN. Paris. 445.

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

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

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

LEE-HUANG S., ZHANG L., CHANG Y.T. and HUANG P.L. (2003). Anti-HIV 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, 1029-1037.

LEROY F., DE VUYST L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre. Food Sci. Technol.* 15, 67-78.

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

LEVEAU J.Y., BOUIX M. (1993). Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 85-87.

LEVERVE X. (2009). Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* Volume 44, Issue. 5, 219–224.

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

Références bibliographiques

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

LUGASI A., HÓVÁRI J., SÁGI K.V. & BIRO L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J. Acta.biologica.szegediensis.*47 (1-4):119-125. (Cited in Mohammedi Z, 2005).

M

MACHEIX J.J., FLEURIET A. & JAY-ALLEMAND C.H. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de metabolites secondaires d'importance économique. PPTUR Lausanne.

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

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

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

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

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

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

MARTIN R., OLIVARES, M., MARTIN, M.L., FERNANDEZ, L., XAUS, J., RODRIGUEZ, J.M., (2005a).Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.*21, 8e17.

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

Références bibliographiques

- MÄYRÄ-MÄKINEN A., BIGRET M. (2004).** Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 73-102.
- MOHSEN S.M., AMMAR A.S.M. (2009).** Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem*, 112, 595-598.
- MOLINA-AICAIDE E. (2008).** Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 142, 317-329.
- MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E., ROURA S.I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, 38p, 565-570.
- MORI A., NISHINO C., ENOKI N., TAWATA S. (1987).** Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26, 2231-2234.
- MOUSOUNI A. (2011).** Etude de fiabilités de nouvelles techniques pour la valorisation du déchet dans le secteur agroalimentaire au Maghreb. *REME*, 1-51.
- MOZZI F., RAYA R.R., VIGNOLO G.M. 2010.** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell. Publishing. 13.
- MICOL V., CATURLA N., PEREZ-FONS L., MAS V., PEREZ L. & ESTEPA A. (2005).** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antivir Res.* 66, 129-136.
- MIDELETON E., KANDASWAMI C., THEOHARIDES T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 52, 673-839.
- MILAN H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en Sciences Domaine : Pharmacochimie, Université Louis Pasteur Strasbourg I.
- MILLETTE M., LUQUET F.M., RUIZ M.T. 2008.** Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Sci. Technol.* 88, 695-705.

N

- NACZK M., SHAHIDI F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *J. of Chromatography A*, 1054, 95-111.
- NEFZAOU I. A. (1984).** Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier. *In* : Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Étude FAO production et santé animales 43, Rome.

Références bibliographiques

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

NEFZAOUI A. (1995). Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course. Syria 12-23 March 1995.

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

NOUSIAINEN J., JAVANAINEN P., SETALA J., WRIGHT A.V. (2004). Lactic acid bacteria as animal probiotics. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 547-560.

O

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

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

OUALLAGUI Z., HAN J., ISODA H., SAYADI S. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (1), 179-184.

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

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

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

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

Références bibliographiques

P

PALOMARES I.C., PEREZ-MORALES R., ACEDO-FELIX E. (2007). Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 49(3-4): 46-54.

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

PERCIVAL M. (1997). Choosing a probiotic supplement. *Clin. Nutr. Insights.* 6(1): 95-100.

PEREIRA A.P., FERREIRA I., MARCELINO F., VALENTAO P., ANDRADE P.B., POT B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 1-106.

PERRINJAQUET-MOCSETTI T., BUSJAHN A., SCHMIDLIN C., SCHMIDT A., BRADL B., AYDOGAN C. (2008). Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research.* 22, 1239-1242.

PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGHI M. (1998). Bactéries lactiques. In : *Manuel de bactériologie alimentaire* (Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.). Polytechnica. Paris. 235-260.

PILET M.F., MAGRAS C., FEDERIGHI M. (2005). Bactéries lactiques. In : *bactériologie alimentaire* (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240.

R

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

RANNALI A. (1991). L'effluent des huiles d'olives : propositions en vue de son utilisation et son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. *Olivae.* 39, 18-34.

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

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

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

Références bibliographiques

REYES-GAVILAN C.G., SUAREZ A., FERNANDEZ-GARCIA M., MARGOLLES A., GUEIMONDE M., RUAS-MADIEDO P. (2011). Adhesion of bile-adapted Bifidobacterium strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res. Microbiol.* 162, 514-519.

RODRIGUEZ-BERNALDO., DE QUIRS A., LAGE-YUSTY M.A., LOPEZ HERNANDEZ J. (2009). HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, 42, 1018-1022.

RODRIGUEZ J.M., MARTÍNEZ M.I., HORN N., DODD H.M. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 101-116.

ROKKA S., RANTAMAKI P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur. Food Res. Technol.* 213, 1-12.

S

SAARELA M., MOGENSEN G., FONDEN R., MATTO J., MATTILA-SANDHOLM T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197-215.

SAKANAKA S., JUNEJA L.R. & TANIGUCHI M. (2000). Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *J. Bio. Sci. Bio. eng.* 90(1), 81-85.

SAKOUHI F., HARRABI S., ABSALON C., SBEI K., BOUKHCHINA S., KALLEL H. (2008). α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives: Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*. 108, 833-839.

SANDHAR H.K., KUMAR B., PRASHER S., TIWARI P., SALHAN M. & SHARMA P. (2011). A Review of, Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1, 25-41.

SANTOS-BUELGA C.A., SCALBERT. (2000). "Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health." *J Sci Food Agric.* 80, 1094-1117.

SARKER S.D., LATIF Z & GRAY A.I. (2005). Natural Product Isolation. In: Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), 1- 23.

SAVARESE T.M., STROHSNITTER W.C., LOW H.P., LIU Q., BAIK I., OKULICZ W., CHELMOW D.P., LAGIOU P., QUESENBERRY P.J., NOLLER K.L., HSIEH C.C. (2007). Correlation of umbilical cord blood hormones and growth factors with stem cell potential: implications for the prenatal origin of breast cancer hypothesis. *Breast Cancer Res* 9: R29.

SAVOURNIN C., BAGHDIKIAN B., ELIAS R., DARGOUTH-KESRAOUI F., BOUKEF K. et BALANSARD G., AGRIC J. (2001). *Food Chem*, 49, p 618.

Références bibliographiques

SCALBERT A., WILLIAMSON G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45, 287-306.

SCHLEIFER K.H. (1987). Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters*. 46, 201-203.

SEABRA R., ESTEVINHO L., BENTO A., PERIERA J.A. (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea L. Cv. Cobrançosa*) Leaves. *Molécules*, 12, 1153-1162.

SEIDEL V. (2005). Initial and Bulk Extraction *In*: Sarker S D. Latif Z and Gray A I. *Natural Products isolation. Humana Press (Totowa)*, 27-37.

SERAPHIM P., MARIA G.P., STYLIANOS F., MICHAEL K., GEORGE A. (2008). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive (mill wastewater-based media). *Bioresource Technology*. 99: 2419-2428.

SERVILI M., MONTEODORO G. (2002). Contribution of phenolic compounds in virgin olive oil quality. *European J. of lipid Science and Technology*. 104, 602-613.

SERVILI M., SELVAGGINI R., ESPOSTO S., TATICCHI A., MONTEODORO G., MOROZZI G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols : agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Review. J. of Chromatography, (A)*. 1054, 113-127.

SERVILI M., ESPOSTO R. S., FABIANI S., URBANI A., TATICCHI F., MARIUCCI R., SELVAGGINI., MONTEODORO G.F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Review. Inflammopharmacology*. 117, 112-119.

SHAH N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17, 1262-1277.

SHAN B., CAI Y.Z., BROOKS J.D. & CORKE H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 112-119.

SIDHOUM M. (2011). Contribution à l'étude pédologique et génétique de quelques variétés de l'olivier dans la wilaya de Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen. Algérie.

SILVA B. S., GOMES L., FAUSTO L., BRONZE M., ANA V.C. & VILAS BOAS L. (2010). Sarcosinoids in olive seed: characterization of nuzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Food Science. Technology*. 61 (2), 157-164.

SPICHTIGER R.E et al. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs. Edition Presses polytechniques et universitaires romandes. 2^{ème} édition, pp 418.

STEVENSON D.E., HURST R.D. (2007). Polyphenolic phytochemicals just antioxidant or much more, *Cell Mol. Life Sci.* 64, 2900-2916.

Références bibliographiques

STILES M.E., HOLZAPFEL W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29.

STREIT F., CORRIEU G., BEAL C. (2007). Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* 128, 659-667.

SU X., DUAN J., JIAN Y., SHI J. & KAKUDA Y. (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *J. of Food Composition and Analysis*, 19, 348-353.

SUDJANA AN., D'ORAZIO C., RYAN V., RASOOL N., Ng J., ISLAM N., RILEY TV. & HAMMER KA. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *I. J. Antimicrob. Agents*, 33, 461- 463.

T

TAMINE A.Y. (2002). Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson R.K.). 3e Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York. 261-366.

TAWAHA K., ALALI F.Q., GHARAIBEH M., MOHAMMAD M., EL- ELIMAT T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem*, (in press).

TEMMERMAN R., POT B., HUYS G., SWINGS J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 1-10.

TERRAL J.F., ARNOLD- SIMARD G. (1996). Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Res.* 46, 176-85.

THUILEN., FILLE M., NAGL M. (2003). Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health*, 206, 217-221

TIAN F., LI B., JI B., YANG J., ZHANG G., CHEN Y. & LUO Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Gallachinen sis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113, 173-179.

TITIEK F.D., ENDANG S.R., DJOKO W., SLAMET S. (1996). Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* sp. TGR-2 isolated from Growol. *Indonesian Food Nutr. Prog.* 3(2), 29-34.

TOMAS-BARBERAN F.A., CLIFFORD M.N. 2000. "Dietary hydroxybenzoic acid derivatives: nature, occurrence and dietary burden." *J Sci Food Agric.* 80, 1024-1032.

TORRES DE PINEDO A., PEN ALVER P., MORALES J.C. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant: structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 103, 55-61.

Références bibliographiques

TZOUNIS X., VULEVIC J., KUHNLE G.G.C., GEORGE T., LLEONCZAK J., GIBSON G.R., KWIK-URIBE C., SPENCER J.P.E. (2008). Flavonol monomer-induced changes to the human fecal microflora. *Br. J. Nutr.* 99, 782-792.

V

VAN ANTWERPEN P. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Criblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène / chlorure. *Thèse de doctorat al Sciences Pharmaceutiques, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.*

VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DE VOS P., KERESTERS K., SWINGS J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol.Rev.* 60, 407.

VERCAUTEREN J., CHEZE C., TRIAUD J. (1998). Polyphénols. 18th international conference on polyphenols, N°87. Ed. IRNA

VISIOLI F., ROMANI A., MULINACCI N., ZARINI S., CONTE D., VINCIERI F. et GALLI C. (1999). Antioxidants and other biological activities of olive mill waste waters. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3397-3401.

VISIOLI F., Galli C. (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Critical Reviews of food Science and Nutrition.* 42(3), 209-221.

VISIOLI F., CARUSO D., GRANDE S., BOSISIO R., VILLA M., GALLI G., SIRTORI C. & GALLI C. (2004). Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extravirgin olive oil in mildly dyslipidémie patients. *Eur. J. Clin. Nutr.* 6, 1-7.

W

WILLIAMSON G. & MANACH C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. *Review of 93 intervention studies.* *Am J* 255S.

Y

YAO L.H., JIANG Y.M., SHI J., TOMAS-BARBERAN F.A., DATTA N., SINGANUSONG R., CHEN S.S. 2004. Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.* 59, 113-122.

YOU-CHENG H., WEN-HUEI C., CHEE-SHAN C., Jiunn-Wang L., JIUNN-WANG H., CHIN-JUNG H., FUNG-JOU L., YI-CHEN C., HSENG-KUANG H., HSENG-KUANG H., JIA-JIUAN W., Hsin-Ling Y. (2008). Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 105–114.

Références bibliographiques

YU R., MANDLEKAR S., TONY KONG A.N. (2000). "Molecular mechanisms of butylatedhydroxyanisoleinduced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c". *Molecular Pharmacology*. 58, 431- 437.EPHE.

Z

ZBAKH H & EL ABBASSI A. (2012). Potential use of mill wastewater in the preparation of functional beverages. *J. funct. foods*, 4, 53-65.

Annexes

Annexe

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

✚ Eau physiologique stérile (composition en g/l)

- Chlorure de sodium (NaCl).....9 g.
- Eau distillée.....1000 ml.
- pH=7
- Stérilisation à 120°C/15 mn.

✚ Milieu MRS

- Peptone 10g
- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure 5g
- Glucose 20g
- Tween 80..... 1ml
- Phosphate bipotassique 2g
- Acétate de sodium 5g
- Citrate d'ammonium 2g
- Sulfate de magnésium, 7 H₂O 0.2g
- Sulfate de manganèse, 4 H₂O 0.5g
- Agar 15g
- Eau distillée 1000ml
- pH= 6.5
- Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 15 min.

✚ Gélose Muller Hinton (composition en g/l)

- Extraits de viande.....3 g.
- Amidon.....1,5 g.
- Hydrolysa acide de caséine.....17,5 g.
- Agar.....18 g.
- pH=7,4.

Annexe 02 : Tableaux des résultats

Tableau I : Résultats du rendement (%) d'extraction des extraits bruts aqueux et organiques de feuilles de l'olivier.

	Extraits	Rendement %
Extraits aqueux	T°C ambiante	40,18
	T°C 40°C	43,56
	T°C 100°C	46,87
Extraits organiques	FEP	78,06
	FAP	71,70

Tableau II : Résultats du rendement (%) d'extraction des extraits bruts organiques de margines d'olive.

Extraits	Rendement %
MAP100	55,12
MAP200	54,23

Tableau III : Teneur en PPT des extraits de feuilles d'oléastre (Variété *chamlal*) : exprimée en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g) de matériel végétal.

	Extraits	Teneur en polyphénols (mgEAG/g)	Teneur en polyphénols (gEAG/100g)
Extraits aqueux	T°C ambiante	6,40± 0.07	0.64± 0.007
	T°C 40°C	17,52± 0.31	1.752 ± 0.031
	T°C 100°C	65,89 ± 0.31	6.589 ± 0,031
Extraits organiques	FEP	64,71 ± 0.015	6.471 ± 0,0015
	FAP	0,18± 0.007	0.018 ± 0.0007

Tableau IV : Résultats du dosage des PPT des extraits de margines exprimés en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g) de MS.

Extraits	Teneur en polyphénols (mg EAG/g de MS)	Teneur en polyphénols (mgEAG/ml margines)
MAP100	135.41 ± 0,15	0.95± 0.15
MAP200	99.38 ± 0,55	0.65 ± 0.15
LM	231.8 ± 0.66	0.80± 0,23
MDEP	266.5± 0.19	1± 0.17

Tableau V : Concentrations en PPT des extraits de feuilles de l'olivier déposés dans le disque.

Extraits	Concentration µg/20µl
FEP	701.12± 0,015
FAP	1.90 ±0,007
FE10	814.60± 0,047

Tableau VI : Concentrations en PPT des extraits de margines déposés dans le disque.

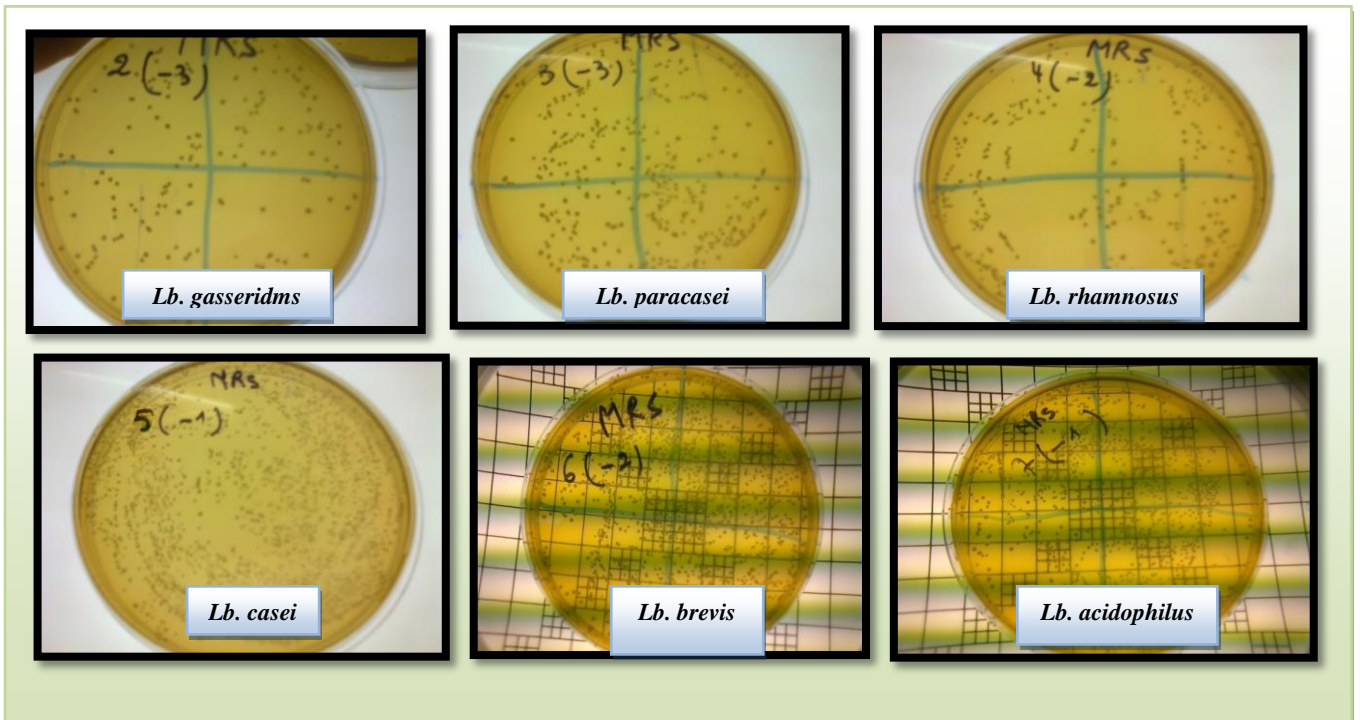
Extrait	Concentration µg/20µl
LM	16,1797753
MDP	11,6853933
MC	13,0337079
MDEP	20
MAP200	213,48
MA10(100)	134,83
MAP100	525,28
MA10(200)	521,35

Tableau VII : Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en $\mu\text{g/ml}$) retenues par les extraits de feuilles de l'olivier et les margines.

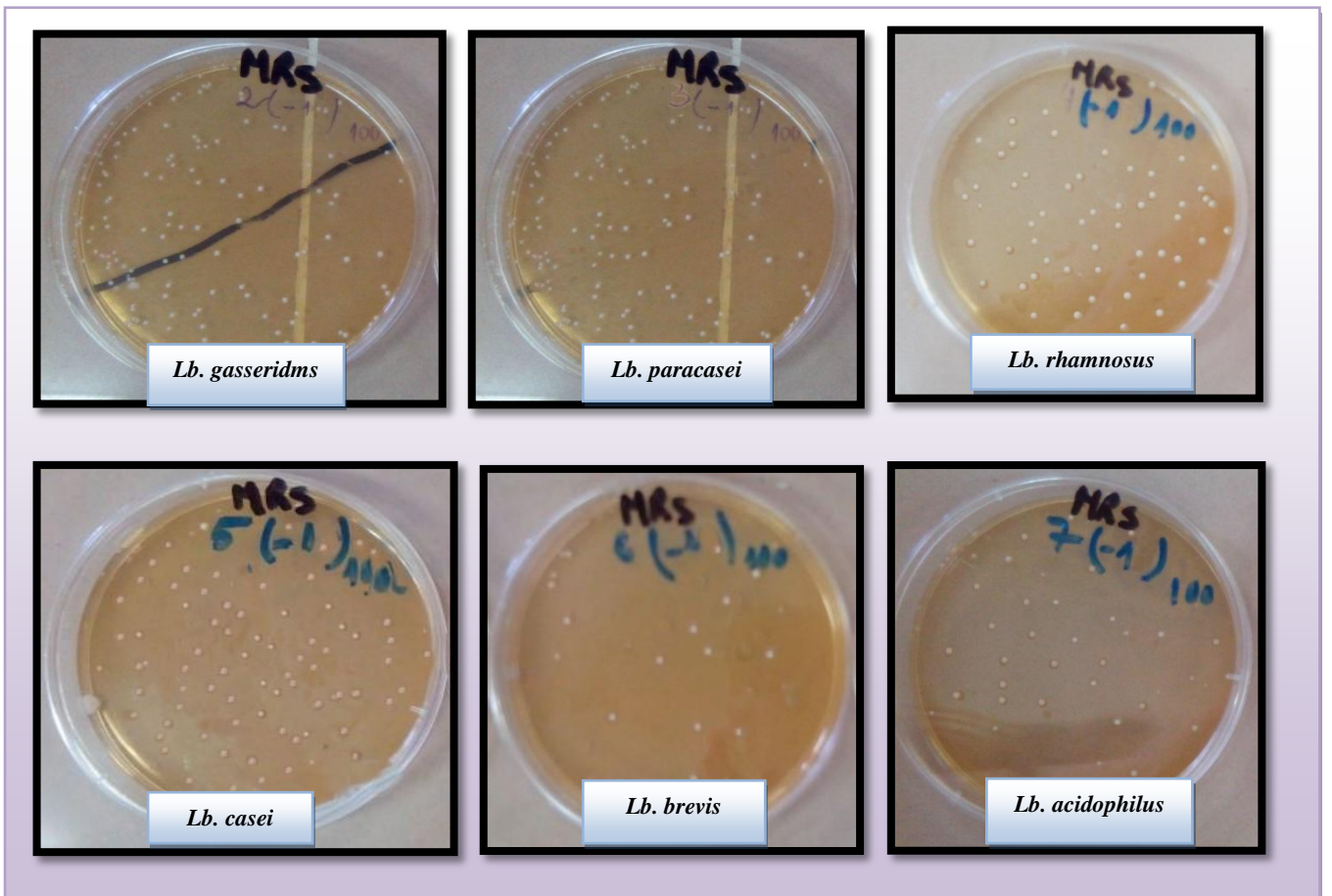
Extraits	Concentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
FEP	40,7303371
MAP100	6,74157303
MDEP	1

Annexe 03 :

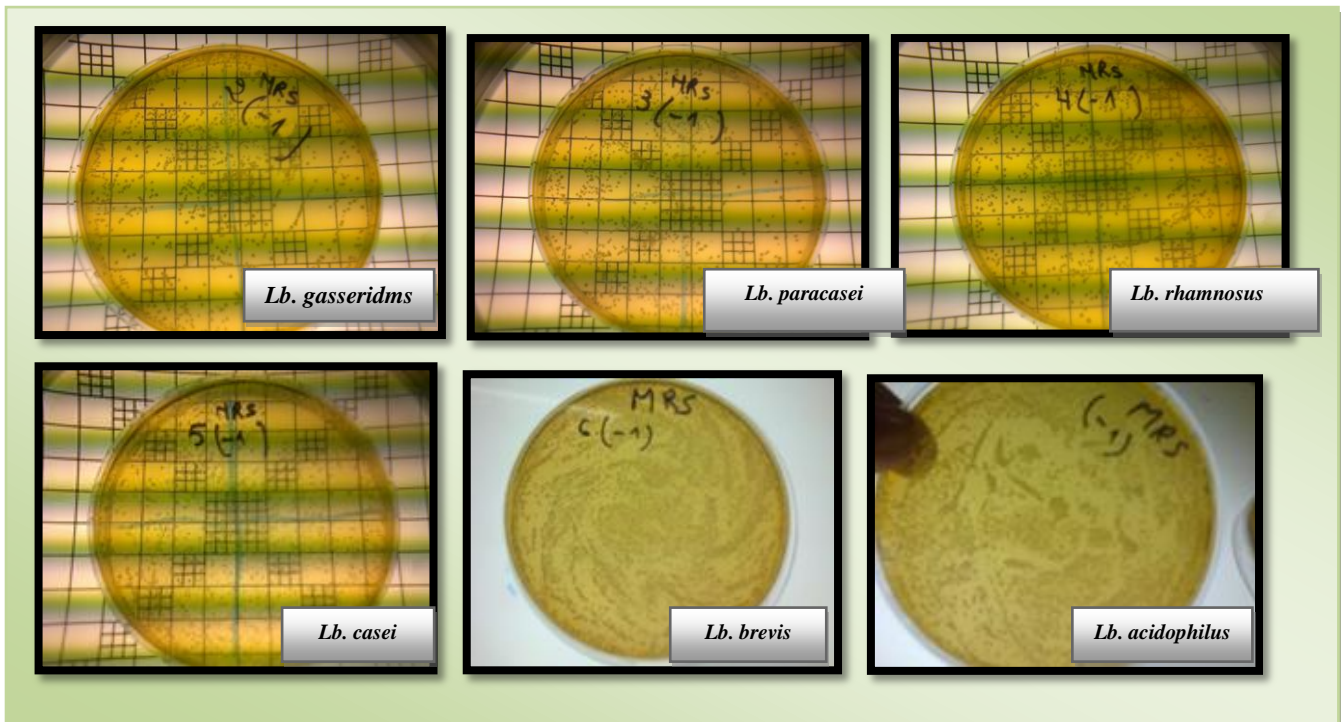
- ✚ Dénombrement initial de l'extrait aqueux de feuilles d'oléastre température ambiante.



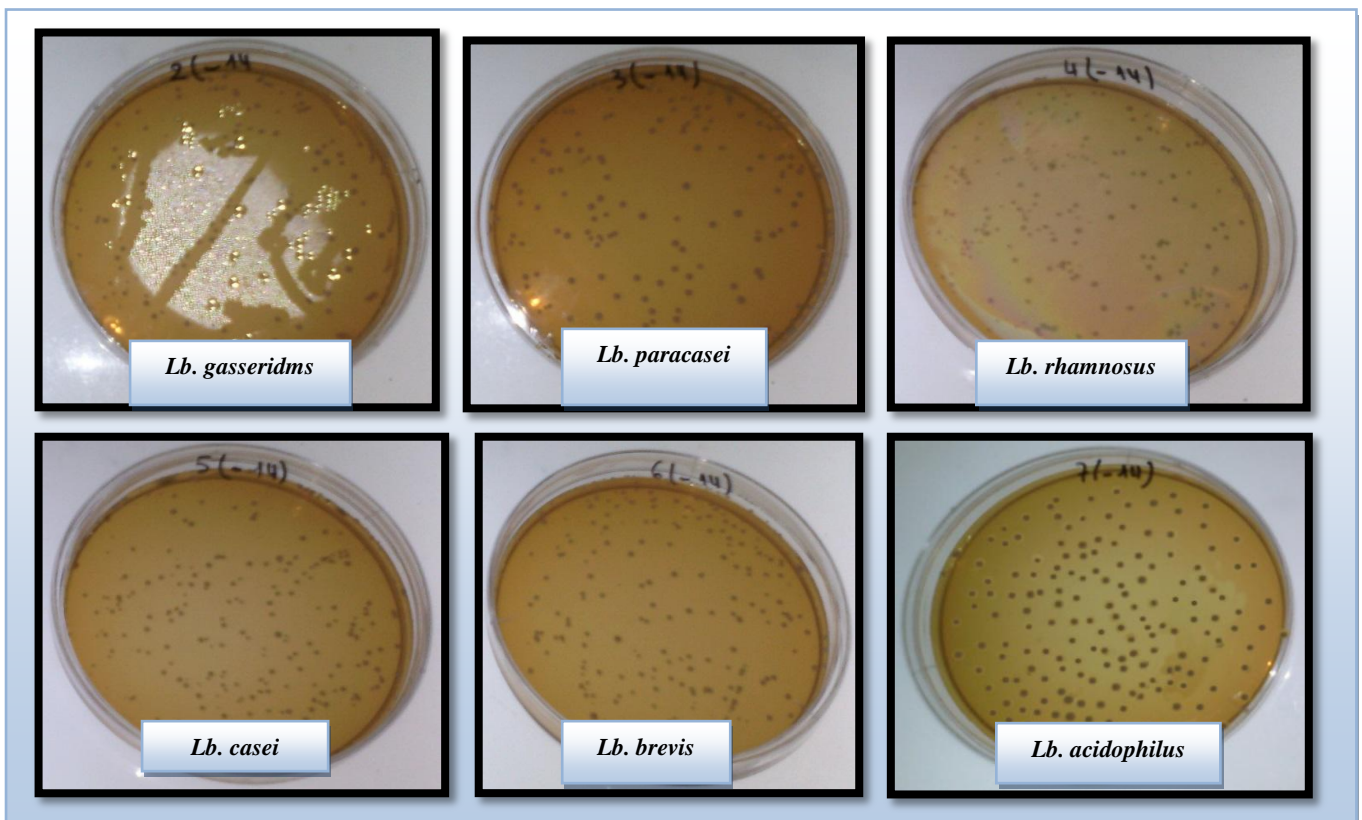
- ✚ Dénombrement initial de l'extrait aqueux de feuilles d'oléastre T=100°C.



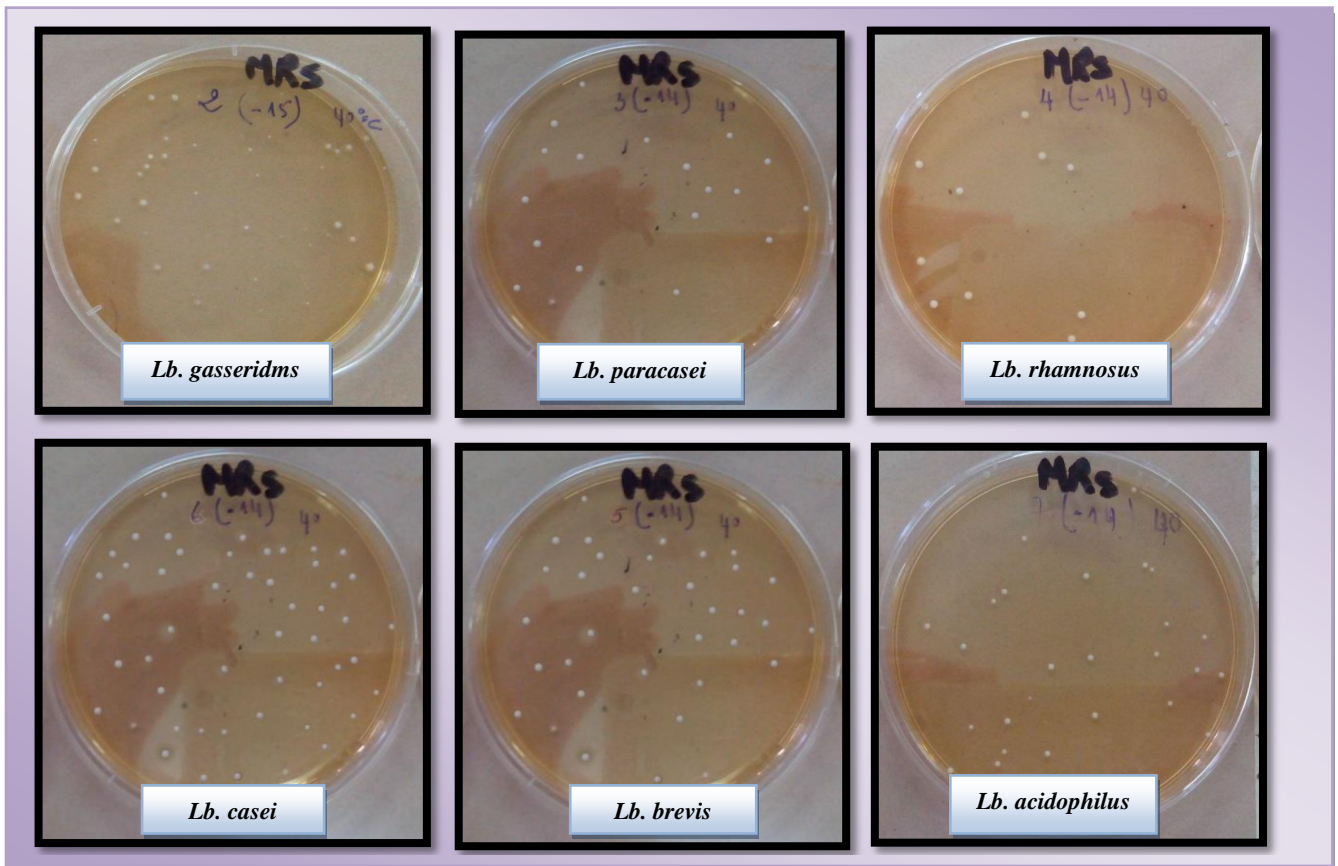
✚ Dénombrement initial de l'extrait aqueux de feuilles d'oléastre à T=40°C.



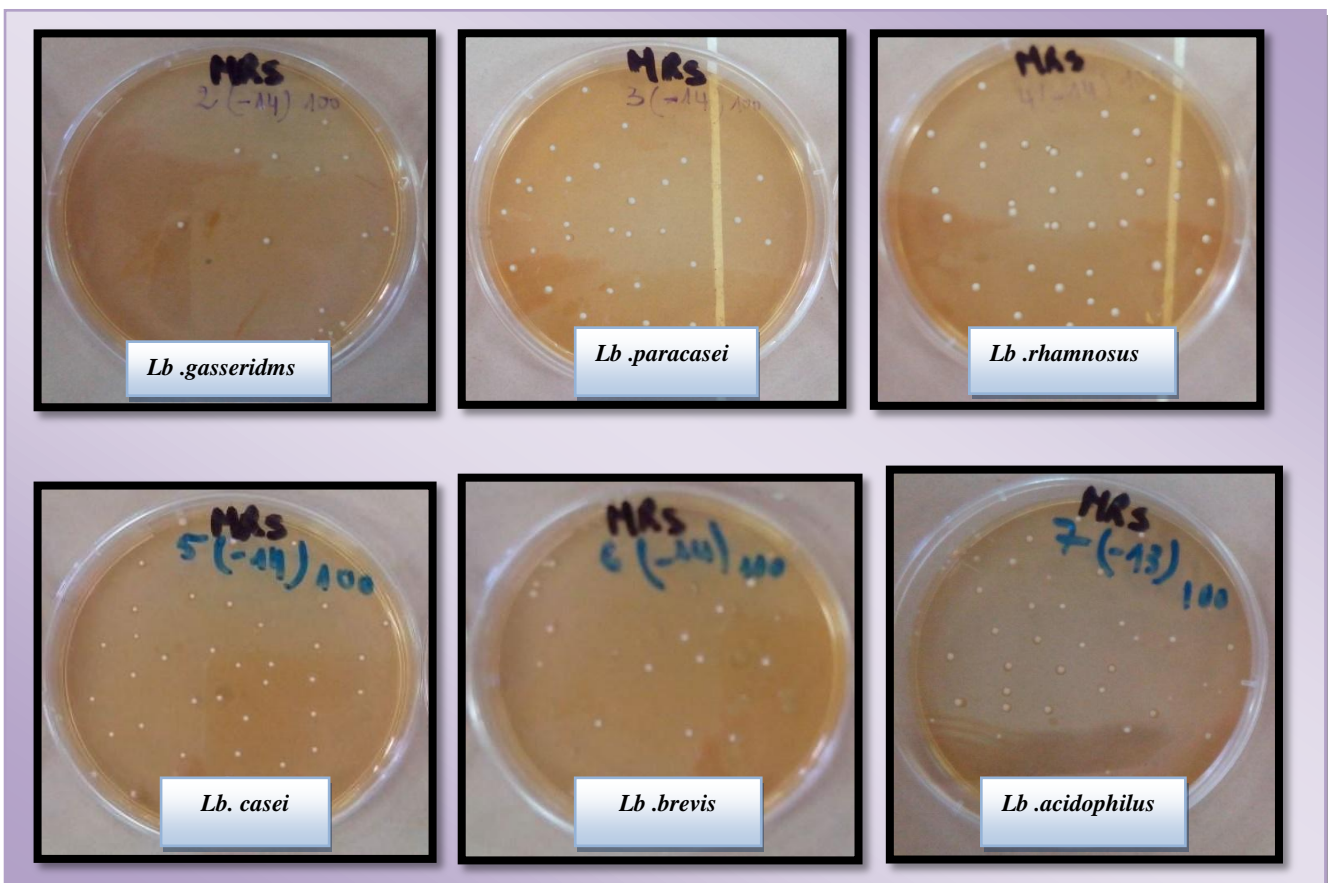
✚ Dénombrement final de l'extrait aqueux de feuilles d'oléastre à température ambiante.



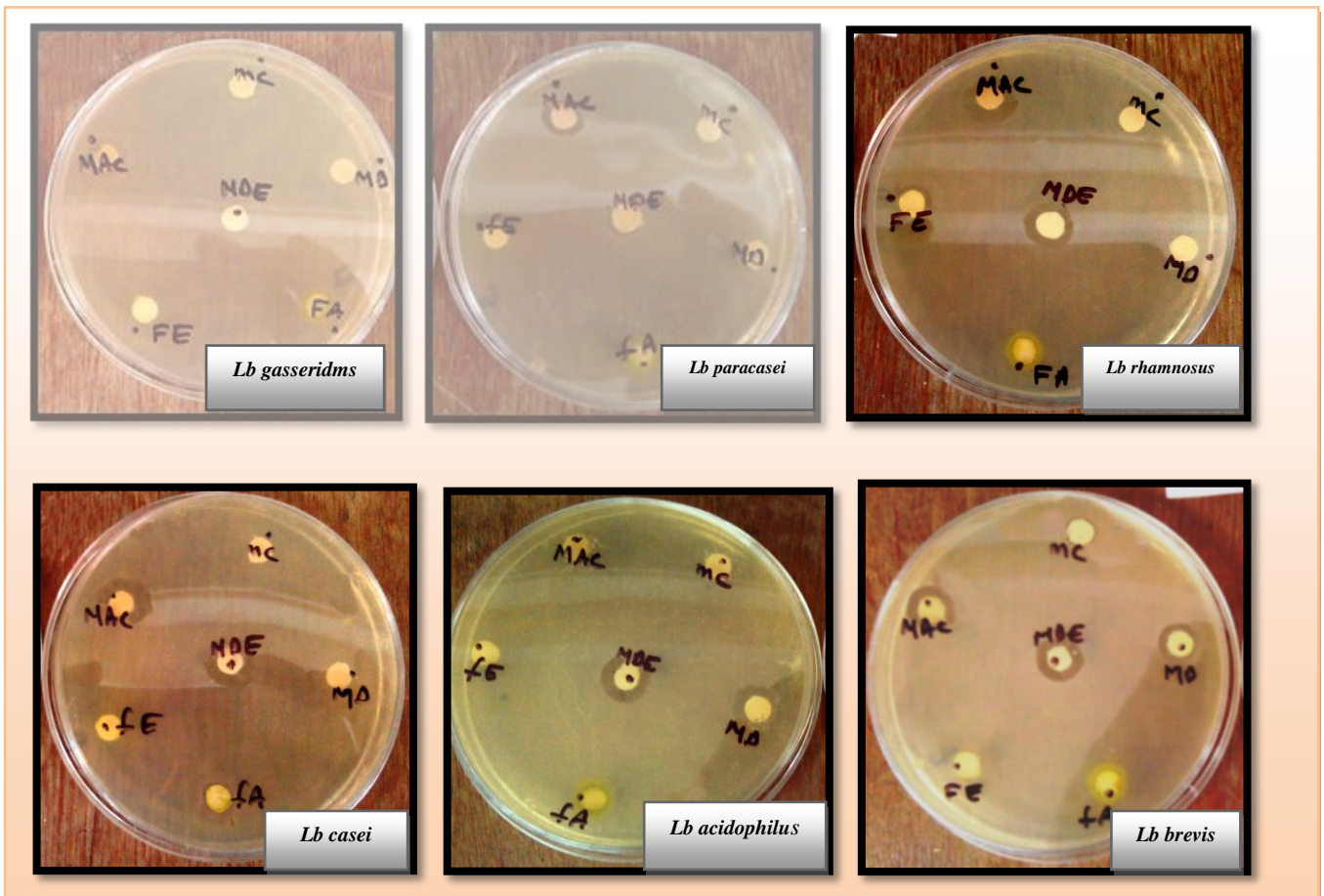
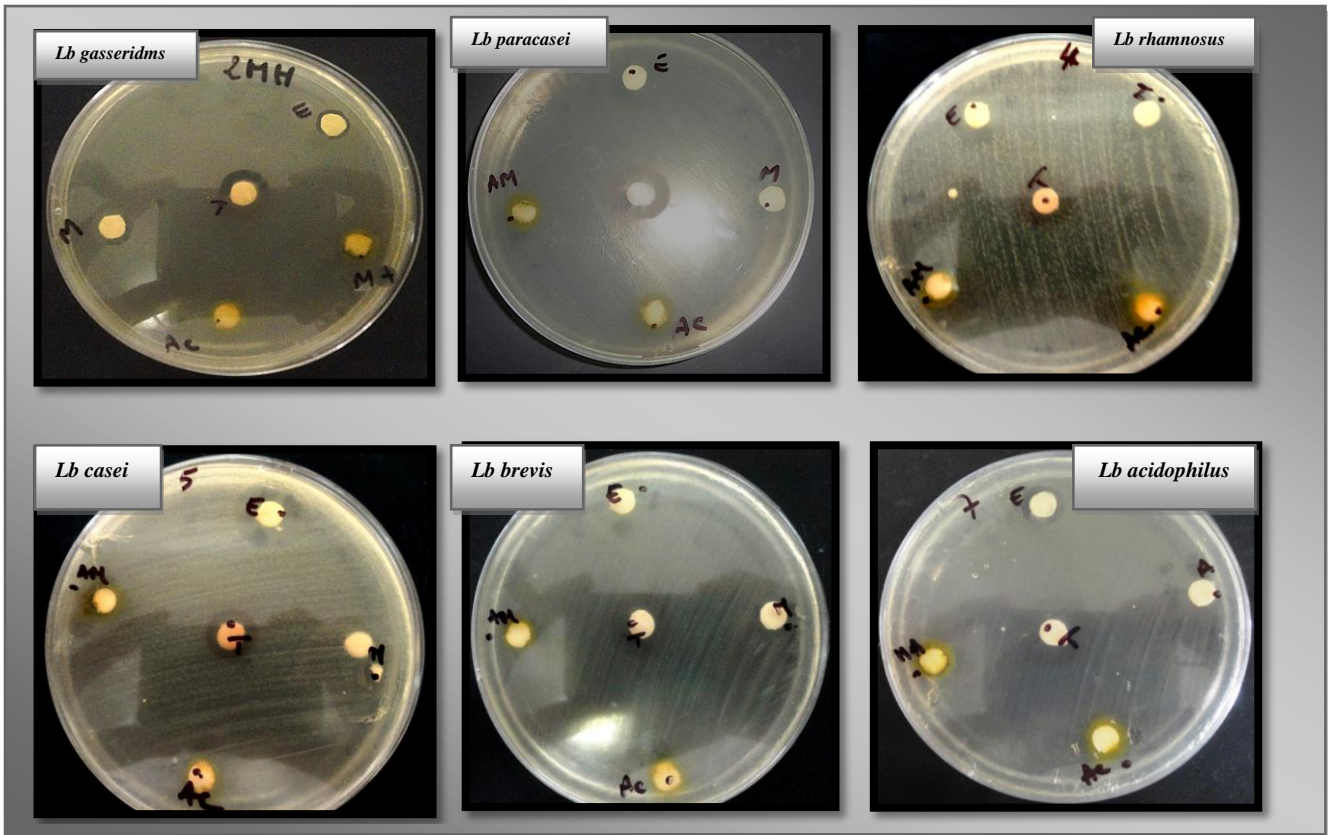
✚ Dénombrement final de l'extrait aqueux de feuilles d'oléastre à 40°C.



✚ Dénombrement final de l'extrait aqueux de feuilles d'oléastre à 100°C.

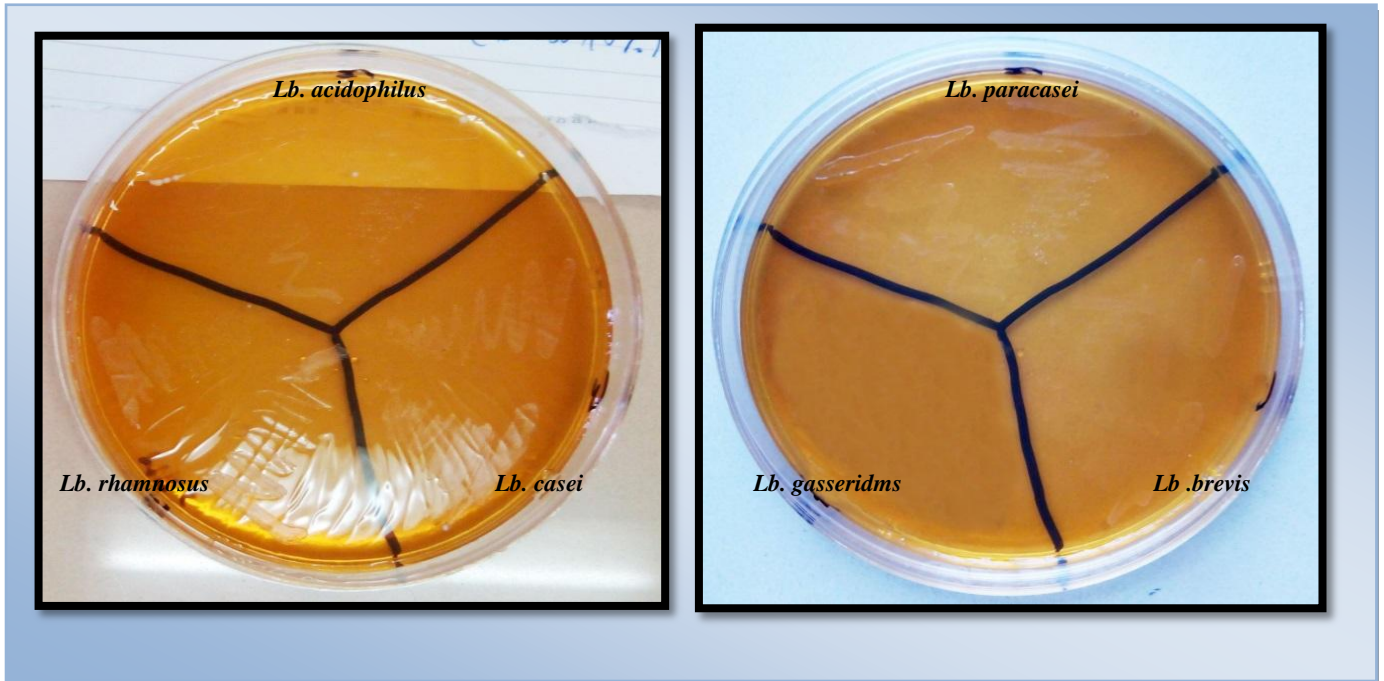


✚ Zones de sensibilité produites par les extraits bruts de feuilles d'oléastre et margines d'olives

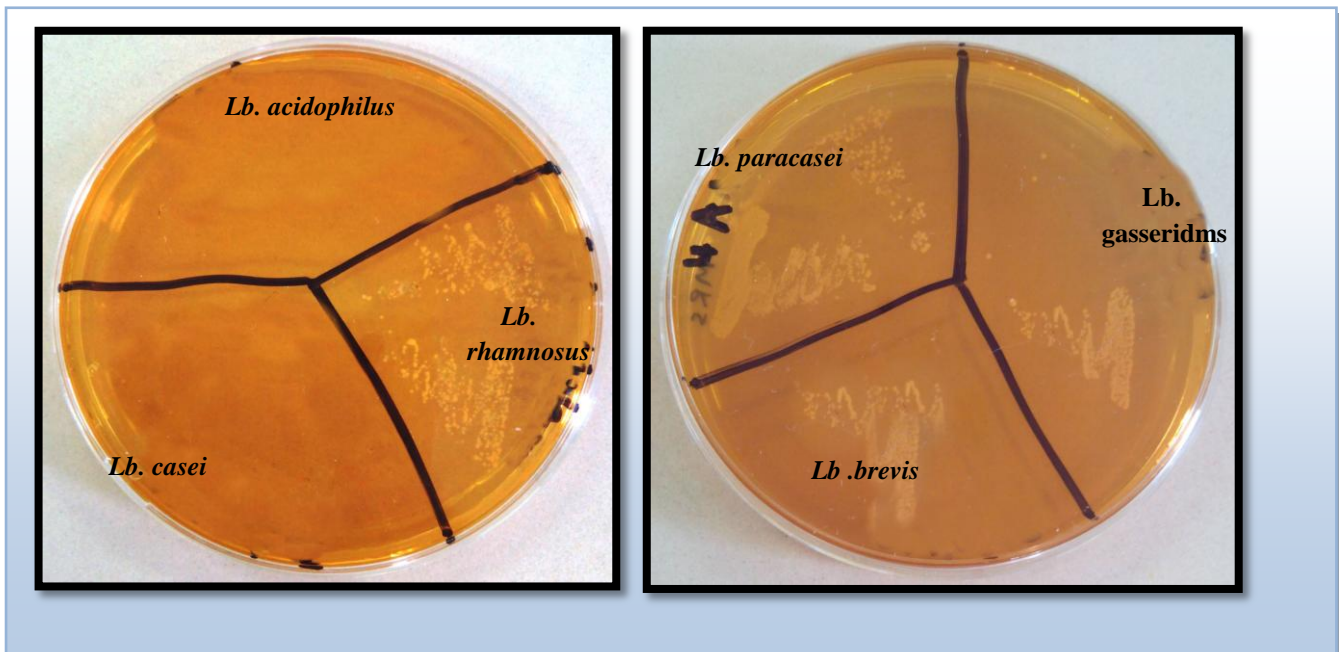


✚ Les CMI / CMB obtenus avec les extraits bruts de feuilles d'oléastre et margines d'olives

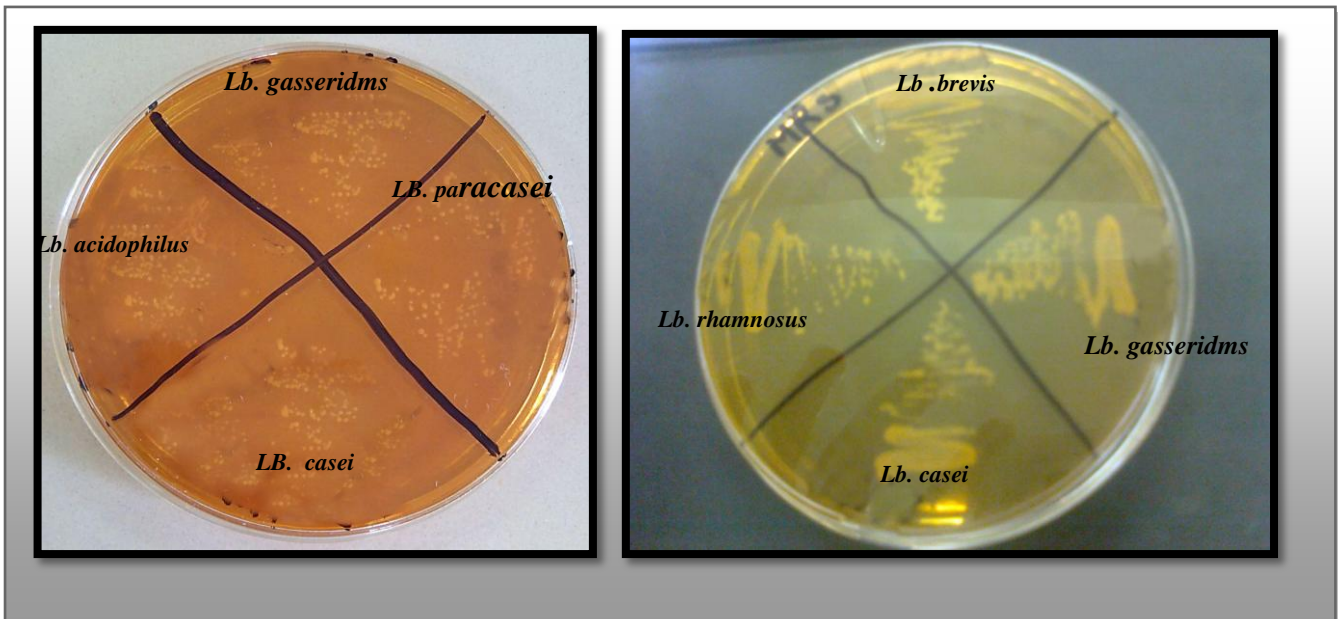
• FE10%



• MAP100%



- **MDEP**



FEP : extrait de feuilles d'oléastre à l'éthanol ;

FE10%: extrait de feuilles d'oléastre à l'éthanol (récupéré dans DMSO dilué à 10%) ;

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

T°C ambiante : extrait aqueux de feuilles de l'olivier sauvage à température ambiante ;

T°C 40°C : extrait aqueux de feuilles de l'olivier sauvage à 40°C ;

T°C 100°C : extrait aqueux de feuilles de l'olivier sauvage à 100°C ;

MAP100 : Extrait de margines à l'acétate d'éthyle 100ml/100ml ;

MAP200 : Extrait de margines à l'acétate d'éthyle 100ml/200ml ;

MA10%100 : extrait de margine à l'acétate d'éthyle v/v, DMSO pure ;

MA10%200 : extrait de margine à l'acétate d'éthyle 100ml/200ml, DMSO dilué à 10% ;

LM: Lyophilisat de margines;

MDEP : extrait de margines au diéthylique éther, DMSO pure ;

AT : Acide tannique.