

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE 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 BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme
de Master Académique en Science de la Nature et de la Vie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

phénols

ilal)

Présenté par : M^{elle} OUTAYEB Wasila et M^{elle} TOUABI Farida

Devant le jury composé de :

Présidente :	M ^{me} SI AHMED-ZENNIA Saliha	Maitre assistante Classe A	UMMTO
Promotrice :	M ^{elle} DERMECHE Samia	Maitre assistante Classe A	UMMTO
Examineur 1 :	M ^r TITOUCHE Yacine	Maitre assistant Classe B	UMMTO
Examineur 2 :	M ^{me} BENZAOUZ-KESBIA Kinza	Maitre assistante Classe A	UMMTO

Soutenu le 11/12/2014



Remerciements



Nous remercions tout d'abord ALLAH le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive connaissance à M^{elle} DERMECHE S, pour nous avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ainsi qu'à ses qualités relationnelles et humaines.

Nous adressons nos sincères remerciements à M^{me} SI AHMED-ZENNIA S. pour l'honneur qu'elle nous fait en présidant le jury.

Un remerciement spécial et sincère à M^r TITOUCHE Y. qui, sans sa collaboration et son aide, nous n'aurons pu surmonter bon nombre de difficultés dans notre travail.

Nous exprimons nos vifs remerciements à M^{me} BENZAOUZ-KESBIA K. d'avoir accepté d'examiner ce travail.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes précieux parents pour leurs exprimer tout le respect et l'amour que j'ai pour eux et pour leurs témoigner ma reconnaissance pour tous les efforts et leurs sacrifices.

A ma sœur.

A mes deux chers frères.

A ma grande famille.

Toutes mes amies et toutes les personnes qui me connaissent.

Spéciale dédicace à la promotion M2.

A mon binôme Wassila et toute sa famille

Tous ceux qui m'ont aidé.

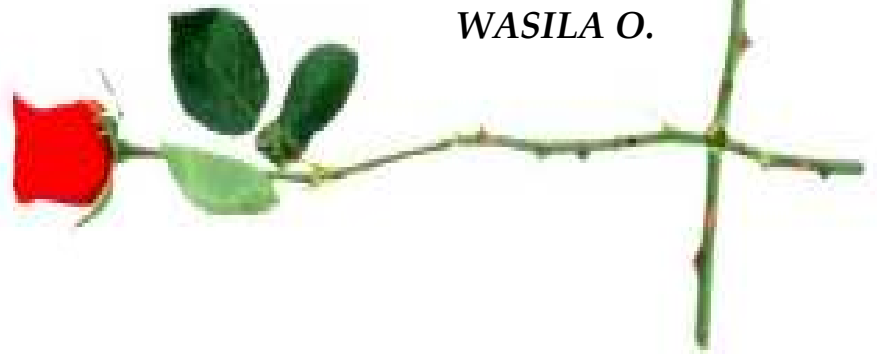
Farida T.



Dédicaces

- ❖ *A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*
- ❖ *A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*
 - ❖ *A mon cher père*
 - ❖ *A mes sœurs surtout Zahía et Hakíma*
 - ❖ *A mes frères*
 - ❖ *A mon cher fiancé*
- ❖ *A mon binôme Farída et toute sa famille*
 - ❖ *A mes amis*
 - ❖ *A tous ceux que j'aime.*

WASILA O.



SOMMAIRE

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
1^{ère} Partie : Etude bibliographique	
I. L'olivier et valorisation de sous-produits oléicoles	3
1.1. Généralités sur l'olivier	3
1.1.1. Origine et Histoire.....	3
1.1.2. Description botanique.....	3
1.1.3. Taxonomie et systématique.....	4
1.1.4. Répartition géographique.....	5
1.1.5. Variétés cultivées en Algérie.....	6
1.1.6. Vertus thérapeutiques des feuilles de l'olivier.....	6
1.2. Valorisation des sous-produits oléicoles	7
1.2.1. Feuilles.....	7
1.2.2. Grignons.....	8
1.2.3. Margines.....	9
II. Polyphénols et bioactivités	11
2.1. Généralités	11
2.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques	11
2.1.2. Structures chimiques et classification	12
2.1.3. Sources des composés phénoliques.....	13
2.1.4. Rôles des composés phénoliques dans les aliments et les végétaux.....	14
2.1.5. Intérêt biologique des polyphénols pour l'Homme.....	15
2.1.6. Disponibilité biologique des composés phénoliques.....	17
2.2. Les composés phénoliques identifiés dans les olives et les produits dérivés...	17
2.3. Méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques	20
2.3.1. Méthodes d'extraction.....	20
2.3.2. Méthodes de quantification.....	22
2.4. Activité antioxydante	23
2.4.1. Généralités.....	23
2.4.2. Définition d'un radical libre et le stress oxydant.....	24
2.4.3. Les antioxydants.....	24
2.4.4. Mécanismes d'action des antioxydants.....	26
2.5. Activité antimicrobienne	26
2.5.1. Introduction.....	26
2.5.2. Les principales substances antimicrobiennes.....	26
2.5.3. Mode d'action antimicrobien et antivirale des polyphénols.....	28

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

I- Matériel et Méthodes	29
1.1. Matériel.....	29
1.2. Méthodes.....	31
1.2.1. Extraction des polyphénols des margines et des feuilles	31
1.2.2. Analyse quantitative des échantillons	36
1.2.2.1. Rendement d'extraction.....	36
1.2.2.2. Teneur en eau et en matière sèche.....	36
1.2.2.3. Dosage des phénols totaux des margines et des feuilles de l'olivier.....	36
1.2.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante	37
1.2.4. Évaluation de l'activité antibactérienne	38
1.2.4.1. Tests antibactériens.....	38
1.2.4.1.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	38
1.2.4.1.2. Détermination des paramètres d'inhibition : CMI, CMB.....	39
1.2.5. Analyse statistique	40
II- Résultats et Discussion	41
2.1. Rendement d'extraction.....	41
2.2. Teneur en matière sèche.....	42
2.3. Teneur en eau.....	43
2.4. Résultats des dosages de polyphénols totaux des extraits de feuilles de l'olivier et des margines.....	43
2.5. Résultats de la mise en évidence de l'activité antioxydante.....	48
2.6. Résultats de l'activité antibactérienne.....	51
2.6.1. Tests de sensibilités.....	51
2.6.1.1. La sensibilité des bactéries aux extraits de feuilles de l'olivier.....	51
2.6.1.2. La sensibilité des bactéries aux extraits de margines.....	57
2.6.1.3. La sensibilité des bactéries aux composés phénoliques commercialisés.....	61
2.6.2. Résultats des paramètres d'inhibitions.....	66
2.6.2.1. Résultats de l'activité antibactérienne testée par la méthode de micro-dilution en milieu liquide (détermination des CMI).....	66
2.6.2.2. Détermination des CMB et la nature de l'activité antibactérienne.....	69
Conclusion et perspectives	72
Références bibliographiques	
Annexes	

Résumé

Les extraits phénoliques de sous-produits oléicoles font actuellement l'objet de nombreuses recherches scientifiques visant à explorer et exploiter leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne tant appréciées dans les domaines thérapeutique, alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. C'est dans ce contexte que le présent travail est mené sur l'évaluation des activités biologiques des polyphénols extraits des feuilles de l'olivier et des margines (variété *Chamlal*). De plus, étant donné que les margines sont considérées comme un polluant de l'industrie oléicole, le plus souvent rejetées dans le milieu naturels, notamment dans les rivières, cela impose des traitements de dépollution et de valorisation.

L'objectif de ce travail était d'extraire les polyphénols totaux (PPT) à partir des feuilles de l'olivier et des margines par différents types de solvants et d'évaluer leurs activités antibactériennes et antioxydante.

Les résultats de l'analyse quantitative des extraits issus des deux sous-produits ont montré une richesse en PPT. Les tests de l'activité antioxydante effectués par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, ont montré que tous les extraits de feuilles de l'olivier et des margines possèdent une activité antiradicalaire très efficace liée au contenu de l'extrait en antioxydant.

Les tests antibactériens sont réalisés sur différents types de souches de référence (*S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25322, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. marginalis* DSM 13124, *B. thermosphacta* CIP 103251, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. megaterium* ATCC 9884, et *B. stearothermophilus* ATCC 10149). Les résultats révèlent que les extraits de feuilles exercent un effet antibactérien en particulier vis-à-vis des bactéries Gram positifs. Concernant les margines, les résultats montrent que l'EA possède un large spectre d'activité vis-à-vis des bactéries testée.

Par ailleurs, l'activité antibactérienne de composés phénoliques (CP) commercialisés est testée. Une efficacité très marquée est notée pour l'acide tannique (AT) avec un large spectre d'activité.

Ces résultats suggèrent une valorisation des sous-produits oléicoles, lesquels représente une source non négligeable en CP. Leur utilisation comme moyens de lutte contre les bactéries pathogènes résistantes et d'altération des aliments s'avère prometteuse dans le domaine médical et le secteur agro-alimentaire.

Mots clés: Polyphénols, feuilles de l'olivier, margines, activité antibactérienne, activité antioxydante, concentration minimale inhibitrice, concentration minimale bactéricide.

Liste des abréviations

AB	Acide benzoïque
AC	Acide caféique
AG	Acide gallique
AGV	Acides gras volatiles
AT	Acide tannique
ATCC	American type culture collection
BMH	Bouillon de Müller Hinton
CIN	Acide cinnamique
CMB	Concentration Minimal Bactéricide
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
CP	Composés phénoliques
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DPPH	2,2 - diphenyl -1- picrylhydrazyl
EA	Extrait à l'acétate
EAB	Extrait à l'acétate, butanol
EADD	Extrait de feuille à l'acétate d'éthyle après délipidation et dipigmentation
EAEF	Extraits de feuilles à l'acétate d'éthyle
EAG	Equivalent Acide Gallique
EB	Extrait au butanol
EBA	Extrait au butanol, acétate d'éthyle
EBF	Extraits de feuilles au butanol
EC	Electrophorèse capillaire
ED	Extrait au diéthyle éther
EDB	Extrait au diéthyle éther, butanol
EEDD	Extrait de feuilles à l'éthanol après délipidation et dipigmentation
EEF	Extrait de feuilles à l'éthanol
EHA	Extrait à l'acétate d'éthyle après délipidation
EHAB	Extrait à l'acétate d'éthyle, butanol après délipidation
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
M	Marges
MAE	Extraction par solvant assistée par micro-ondes
MS	Matière sèche
PLE	Extraction liquide sous pression
PM	Poids moléculaire
PPT	Polyphénols totaux
PQ	Acide P-coumarine
Q	Quercétine
R	Rutine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SFE	Extraction par fluide supercritique
SPE	Extraction en phase solide
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra violet
V	Acide vanillique
V/V	Volume / volume

Liste des figures

N°	Intitulés	Pages
01	A) Photographie des olives mûrs et des feuilles ; B) Photographie de l'olivier ; C) Les différentes parties composant l'olive (BRESCIA <i>et al.</i> , 2007).	4
02	Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin méditerranéen. (CARRION <i>et al.</i> , 2010).	5
03	Valorisation de sous-produits oléicoles (DERMECHE <i>et al.</i> , 2013).	8
04	Structure des acides phénoliques. a) Acides cinnamiques. b) Acides benzoïques (CHIRA., 2008).	13
05	Structure de base des flavonoïdes (HEIM <i>et al.</i> , 2002).	13
06	Structure des tannins (HATANO <i>et al.</i> , 2005). a) Structure d'un tannin hydrolysable: Tellimagrandin ; b) Tannin condensé : polymère de proanthocyanidine.	13
07	Effets biologiques des polyphénols (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002) (modifié).	17
08	Structures des principaux composés phénoliques de feuilles d'olivier (OMAR., 2010).	18
09	Structures des principaux composés phénoliques de margines (DERMECHE <i>et al.</i> , 2013).	19
10	Formule des α , γ et δ -tocophérols.	25
11	Le piégeage des ERO par les flavonoïdes (MARFAK., 2003).	26
12	Protocole d'obtention des extraits aqueux.	31
13	Protocole d'extraction des composés phénoliques par les solvants organiques.	32
14	Protocole d'extraction des polyphénols des feuilles après délipidation et dépigmentation.	33
15	Protocole d'extraction des polyphénols des margines.	34
16	Protocole d'extraction des polyphénols des margines après délipidation	35
17	Protocole de dosage des phénols des margines par la méthode de Folin-Ciocalteu (MACHEIX <i>et al.</i> , 1990).	37
18	Structure du DPPH et sa réduction par l'antioxydant RH (PAIXAO <i>et al.</i> , 2007).	37
19	Rendement en (%) des extraits bruts des feuilles de l'olivier (variété <i>Chamlal</i>).	41
20	Teneur en eau et en matière sèche des margines.	42
21	Courbe d'étalonnage établie pour le dosage des polyphénols totaux en équivalent d'acide gallique.	43
22	Teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles de l'olivier.	44
23	Teneur en polyphénols totaux des extraits de margines.	46
24	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits de feuilles de l'olivier	48
25	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits de margines.	50
26	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exercés par les extraits bruts de feuilles de l'olivier.	51
27	Photos des zones d'inhibitions provoquées par les extraits de feuilles de l'olivier contre <i>P. marginalis</i> DSM 13124 (a) et <i>S. aureus</i> ATCC 4330 (b).	53
28	Photos des zones d'inhibitions provoquées par les extraits de feuilles de l'olivier contre <i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149 (a) et <i>B. thermosphacta</i> CIP 103251 (b).	54
29	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition provoquées par les extraits de margines.	56

30	Photos des zones d'inhibitions provoquées par les extraits de margines contre <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (a), <i>E. coli</i> ATCC 25322 (b) et <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (c).	57
31	Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les extraits de margines contre <i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149 (a) et <i>P. marginalis</i> DSM 13124 (b)	58
32	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition provoqués par les composés phénoliques commercialisés.	60
33	Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les composés phénoliques commercialisés contre <i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149 (a), <i>Proteus sp</i> (b), et <i>B. megaterium</i> ATCC 9885 (c).	61
34	Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les composés phénoliques commercialisés contre <i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149 (a), <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 (b), et <i>P. marginalis</i> DSM 13124 (c).	62

Liste des tableaux

N°	Intitulés	Pages
I	Principales classes des composés phénoliques (BRUNETON, 1999 ; HENNEBELLE, 2006).	12
II	Teneur en composés phénoliques de quelques végétaux utilisés ou consommés par l'Homme (d'après FLEURIET et MACHEIX, 2003).	15
III	Activités biologiques de quelques composés phénoliques (BRUNETON, 1999 ; HENNEBELLE, 2006).	16
IV	Produits chimiques utilisés.	30
V	Les souches bactériennes utilisées pour les tests antibactériens.	31
VI	Dilutions réalisées pour la détermination des CMI.	39
VII	Sensibilité des espèces bactériennes aux extraits de feuilles de l'olivier.	52
VIII	Concentrations en polyphénols totaux des extraits de feuilles de l'olivier déposés dans le disque.	55
IX	Sensibilité des espèces bactériennes aux extraits de margines.	56
X	Concentrations en polyphénols totaux des extraits de margines déposés dans le disque.	57
XI	Sensibilité des espèces bactériennes aux composés phénoliques commercialisés.	59
XII	Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimées en µg/ml) retenues pour les extraits de feuilles de l'olivier.	63
XIII	Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimées en µg/ml) retenues pour les composés phénoliques commercialisés.	64
XIV	Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimées en µg/ml) retenues pour les extraits de margines.	65
XV	Les CMB et la nature de l'activité obtenues avec les extraits de feuilles de l'olivier et les composés phénoliques commercialisés.	66
XVI	Les CMB et la nature de l'activité obtenues avec les extraits de margines.	67

Introduction générale

L'utilisation la plus connue de l'olivier est l'extraction de l'huile à partir de son fruit, l'olive. Cette huile a une importance capitale dans la nutrition et la santé humaine, si bien que la recherche s'est élargie à l'étude des sous-produits de l'olivier. L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile comme produit principal, de grandes quantités de sous produits.

La taille de l'olivier laisse en moyenne 25 Kg de feuilles et brindilles. Cent Kg d'olives produisent en moyenne 35 Kg de grignon et 100 litres de margines (NEFZAOU, 1988). La problématique posée par les margines réside principalement dans leur teneur élevée en polyphénols, 18 à 125 mg/g d'après GAMEL et KIRITSAKIS (1999). Ces valeurs dépassent même dix fois plus celles de la phase huileuse (LEGER, 1999). D'une part, ces composés difficilement biodégradables empêchent les cycles biologiques du sol et souillent les eaux naturelles (BELAID *et al.*, 2002). D'autre part, ils attribuent une valeur précieuse à ce sous-produit rejetable (RANALLI *et al.*, 2003).

Les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles qui font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches scientifiques. En effet, l'utilisation des feuilles d'oliviers en phytothérapie remonte à très loin dans l'histoire et est recommandée depuis l'antiquité dans la médecine traditionnelle, comme traitement de la fièvre et la malaria (LEE *et al.*, 2009). L'olivier est considéré donc comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels à haute valeur ajoutée. En effet, certains composés identifiés dans les extraits des feuilles, tels que les composés phénoliques sont doués d'activité biologique extrêmement importante.

La valorisation de ces résidus est devenue une double nécessité ; écologique et économique. En effet, elle permettrait de réduire une pollution de plus en plus conséquente, et de contribuer à l'amélioration de la rentabilité du secteur oléicole.

De nos jours, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre le stress oxydant et les infections bactériennes. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques. Chaque antibiotique a une durée de vie effective limitée au bout de laquelle les microorganismes développent des résistances. De plus, dans les pays en développement, ces produits ne sont pas toujours disponibles ou lorsqu'ils le sont, ils coûtent trop cher pour les populations. Ainsi, plus de 80 % de ces populations ont recours exclusif aux plantes pour se soigner (KIRBY, 1996 ; HOSTETTMANN *et al.*, 2002).

D'autres parts, ces derniers temps, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques conservateurs utilisés en industrie alimentaire. En effet, la peroxydation des lipides produite au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments, sous l'effet des radicaux libres oxygénés, conduit à des modifications de goût, d'odeur et de couleur. Parfois, elles constituent un risque pour la santé du consommateur et, par conséquent à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Les antioxydants de synthèse sont généralement utilisés en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides mais ils se sont avérés responsables d'effets indésirables.

En effet l'emploi des substances naturelles comme les polyphénols constitue une alternative qui permet aux industriels du secteur agroalimentaire de s'affranchir de l'étiquetage systématique relatif aux ingrédients synthétiques.

De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives, ayant des effets secondaires limités ou inexistantes, depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques. C'est dans ce contexte de valorisation des sous-produits oléicoles que nous avons mené notre travail.

Les objectifs assignés par la présente étude sont :

- ❖ La préparation des extraits organiques et aqueux de feuilles et des margines ;
- ❖ L'analyse quantitative du contenu en polyphénols totaux de ces extraits ;
- ❖ La mise en évidence de leurs activités antioxydantes et antibactériennes.

I. Généralités sur l'olivier et valorisation de sous-produits oléicoles

1.1. Généralités sur l'olivier

1.1.1. Origine et Histoire

L'olivier est un arbre qui est connu depuis l'antiquité. Son apparition et sa culture remonteraient à plusieurs millénaires. Elle apparaît dans l'histoire et les mythes comme symbole de force, de longévité, de paix, de foie et de fertilité (LALLAS *et al.*, 2011). 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). C'est ainsi que l'on a retrouvé des fossiles de feuille d'olivier dans les gisements du Pliocène de Mongardino (Italie), des restes fossilisés dans les couches paléolithique supérieur en Afrique du Nord, des morceaux d'oléastres et des noyaux dans les excavations de l'Enéolithique en Espagne. Il en ressort que l'existence de l'olivier remonte au X^{ème} millénaire avant Jésus (BITONTI *et al.*, 2000).

1.1.2. Description botanique

- **L'olivier**

L'olivier fait partie de la famille des oléacées (genre *olea*), qui comprend, entre autres, les lilas (*Syringia*), les troènes (*Ligustrum*) et les frênes (*Fraxinus*), ainsi qu'un nombre d'arbustes comme les forsythias, les jasmins. Il était et il est toujours principalement cultivé pour ses olives bien qu'il a aujourd'hui intégré le statut d'arbre d'ornement. C'est un arbre moyennement trapu (moyenne de 2 m) qui peut atteindre les 15 mètres de hauteur (WAGNER, 1999). L'olivier peut vivre plus de 1000 ans, 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 apprécié par les ébénistes et les sculpteurs.

Olea europaea est une espèce d'arbres ou d'arbustes de la famille des *Oleaceae* répandue à travers l'Afrique, l'Asie et l'Europe méditerranéenne et dont une variété a été domestiquée et cultivée pour devenir l'olivier. Il est qualifié de séculaire, sa longévité et sa productivité dépassant la centaine d'années (VILLEMUR et DOSBA, 1997). Au cours de l'histoire de la botanique, de nombreuses sous-espèces ont été décrites.

- **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. C'est une drupe avec une pulpe charnue riche en matière grasse, sa forme est ovoïde. Ses dimensions sont très variables suivant les variétés, sa couleur change au cours de son 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).

Il est constitué de trois parties : Epicarpe (la peau de l'olive), Mésocarpe (pulpe de fruit), endocarpe constitué par un fusiforme très dur protégeant une seule graine à albumen huileux.

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

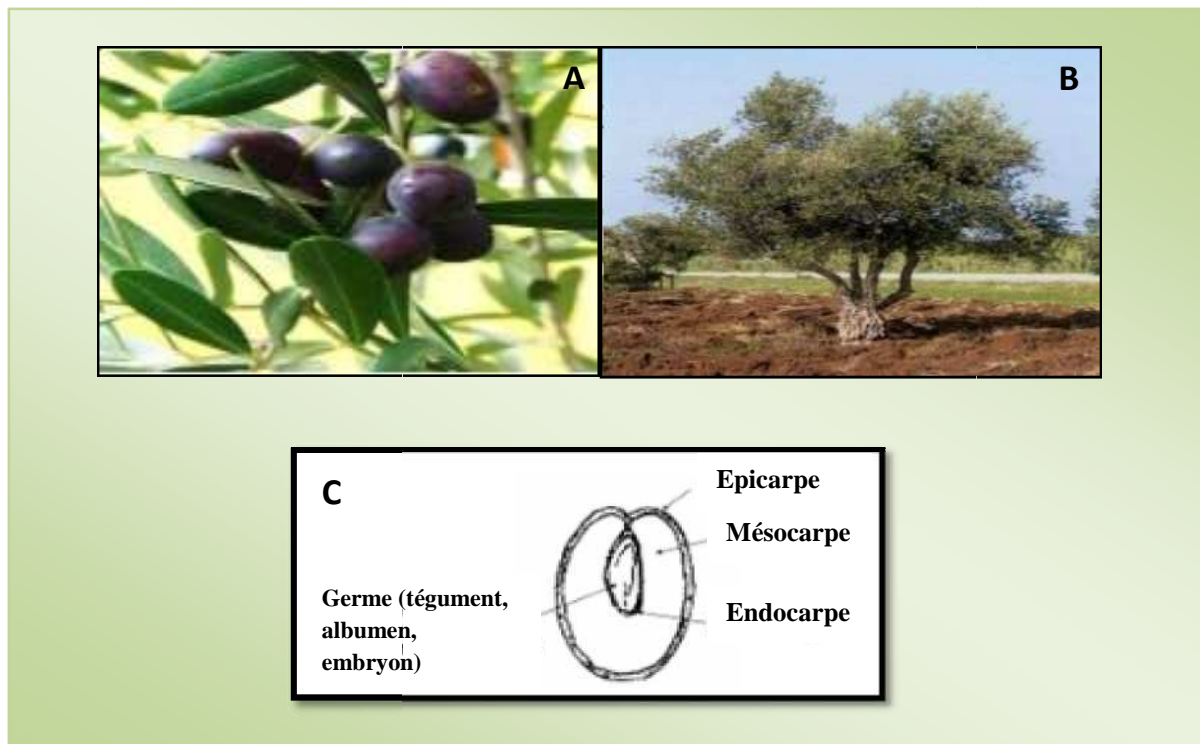


Figure 1. A) Photographie des olives mûres et des feuilles ; B) photographie de l'olivier ; C) Les différentes parties composant l'olive (BRESCHIA *et al.*, 2007).

1.1.3. Taxonomie et systématique

L'espèce *Olea europaea* L. a été nommée par Linné en raison de son aire géographique. C'est l'unique espèce du bassin méditerranéen représentative du genre *Olea*. Le genre est appelé *Olea* et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. On distingue deux sous-espèces, l'olivier cultivé ou olivier commun (*Olea europaea sativa*.) et l'olivier sauvage ou oléastre (*Olea europaea sylvestris*.) (SPICHIGER *et al.*, 2002 ; DUPONT *et al.*, 2007).

- Répartition botanique de l'espèce *Olea europea* L (GHEDIRA, 2008).

Règne : *Plantae*.

Embranchement : *Magnoliopyta*.

Sous- embranchement : *Magnoliopytina*.

Classe : *Magnoliopsida*.

Sous-classe : *Dialypétales*.

Ordre : *Lamiales*.

Famille : *Oleaceae*.

Genre : *Olea*.

Espèces : *Olea europea* L.

Sous-espèce : *O. europea subsp. europea* variété. *sylvestris*

O. europea subsp. Europaean variété. *europeae*

1.1.4. Répartition géographique

L'olivier est cultivé dans des aires géographiques où les chutes de pluie annuelles sont en moyenne de 350 à 400 mm et les températures estivales de 40°C ce qui correspond à la zone tempérée entre 30 et 45° parallèle Nord Sud.

Pour les botanistes, l'aire de répartition de l'olivier est synonyme de "région méditerranéenne". L'olivier (*Olea europaea* L.) est cultivé depuis très longtemps autour de la méditerranée et de la mer noire surtout en : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, France, Tunisie, Algérie et Croatie (figure1). Cette répartition géographique est influencée par des facteurs climatiques et pédologiques. (GAUSSORGUES, 2009 ; CARRION *et al*, 2010).

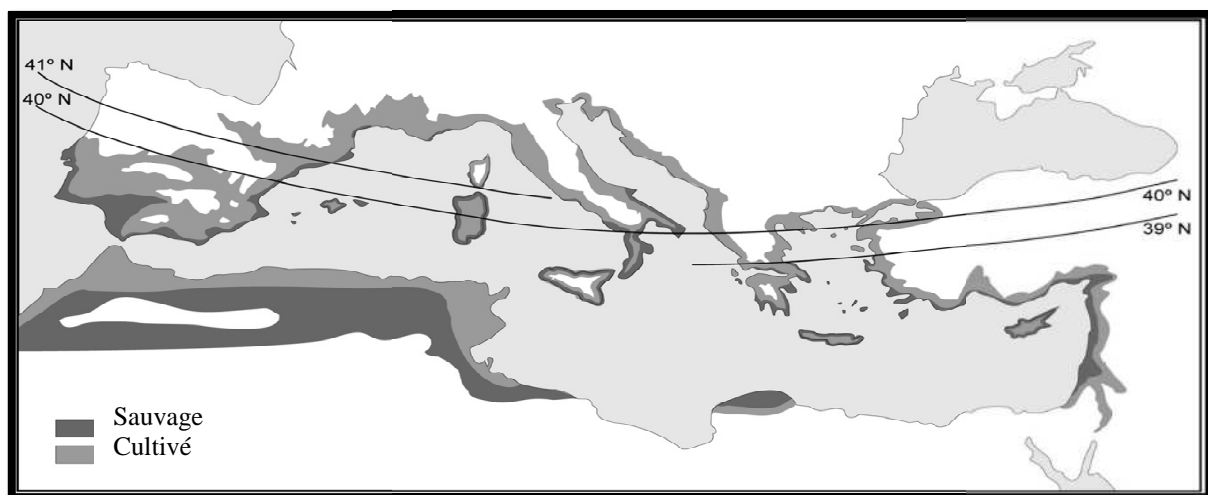


Figure 2. Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin méditerranéen. (CARRION *et al.*, 2010).

1.1.5. Variétés cultivées en Algérie

Pour l'olivier, on appelle variété l'ensemble des arbres qui présentent les mêmes caractéristiques phénotypiques et qui ont donc probablement des génotypes très similaires ou identiques dans chaque région. L'olivier en Algérie est caractérisé par 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%), *Olea europaea* variété *azaradj* et *Olea europaea* variété *limli* (10 %), (BENAMAR, 2013). Ces variétés sont des variétés de Kabylie. En plus, des variétés de l'est (Constantine, Annaba, Guelma) qui sont *Rougette* et *Blanquette* et la variété *Sigoise* d'Oranie. L'oléiculture algérienne génère environ 1% des produits oléicoles dans le monde (MOUSOUNI, 2011).

1.1.6. Vertus thérapeutiques des feuilles de l'olivier

1.1.6.1. Utilisations traditionnelles

L'olivier possède des facultés thérapeutiques exceptionnelles. Depuis les siècles que l'Homme cultive l'olivier, il a découvert de multiples pouvoirs de guérison et de préventions contre certaines maladies. Toutes les parties de l'arbre servent à guérir : le fruit, la feuille, la fleur, l'écorce et l'huile d'olive. Les nombreux bienfaits des feuilles d'olivier pour la santé sont connus depuis l'antiquité.

Des évidences suggèrent que boire du thé de feuilles d'olivier a été une méthode employée depuis plusieurs siècles par les cultures du moyen orient pour traiter les troubles tels que : la toux, les gorges sensibles, les cystites et les fièvres. De plus, les feuilles d'olivier en cataplasme étaient utilisées pour traiter les brûlures, les éruptions, les verrues et autres problèmes de peaux.

La feuille de l'olivier a été également répandue dans la folklorique pour plusieurs années dans les îles méditerranéennes et les pays européennes. Historiquement cette matière végétale a été utilisée comme remède de la fièvre (LEE *et al.*, 2009). Ils ont été utilisés dans l'alimentation humaine sous forme d'extrait, de poudre et de tisane (KARAKAYA, 2009).

Les feuilles d'*Olea. europea* L. sont employées en Tunisie en usage externe, mâchées, car réputées pour calmer les odontalgies et traiter les gerçures des lèvres. Sous forme de décocté et en bain de bouche, elles servent pour traiter les aphtoses buccales, des gingivites et des glossites (états inflammatoire et / ou infectieux de la langue)

A l'issue de toutes ces utilisations traditionnelles, les scientifiques s'efforcent à prouver que les multiples vertus thérapeutiques de l'olivier ne résident pas uniquement dans l'huile d'olive, mais aussi dans les feuilles qui sont riches en "Oleuropéine".

Selon la littérature l'oleuropéine possède des effets considérablement bénéfiques pour la santé humaine. Elle est considérée comme un antioxydant (GARCIA *et al.*, 2006), antimicrobien (PEREIRA *et al.*, 2007), antiviral (MICOL *et al.*, 2005), anti-inflammatoire (VISIOLI *et al.*, 1998) et hypolipidémique (JEMAI *et al.*, 2008). L'oleuropéine a montré des effets cardioprotectifs (ANDREADOU *et al.*, 2006) et des effets neuroprotectives (OMAR, 2010). Les études *in vitro* ont montré que cette substance agit comme un composé anti-tumoral (HAMDI *et al.*, 2005), comme l'aglycone d'oleuropéine qui montre le composé le plus efficace contre la viabilité des cellules de cancer du sein chez la femme (MENENDEZ *et al.*, 2007). Elle empêche l'activité plaquettaire (ANDRIKOPOULOS *et al.*, 2002) et elle pourrait être un modulateur de métabolisme et protège aussi contre les problèmes d'obésité (KABCHI *et al.*, 2000).

1.1.6.2. Quelques propriétés pharmacologiques des extraits de feuilles de l'olivier

L'effet hypotenseur de l'extrait aqueux des feuilles d'olivier présente un effet vasodilatateur périphérique direct, notamment au niveau des artérioles périphériques avec une action antagoniste calcique (GHEDIRA *et al.*, 2008). Les études cliniques récentes ont montré qu'une dose de 500 mg de l'extrait des feuilles d'oliviers, deux fois par jours, peut remplacer une dose de 12,5-25 mg en Captopril, dans l'abaissement des tensions artérielles systoliques et diastoliques chez les patients hypertendus (SAUSALIT *et al.*, 2010).

L'administration d'un extrait des feuilles d'olivier riche en oleuropéine (8mg/kg), pendant 4 semaines, montre une diminution significative de glucose. Ses résultats mettent en évidence l'effet antidiabétique de l'oleuropéine (AL-AZZAWIE *et al.*, 2006 ; JEMAI *et al.*, 2008).

L'action hypocholestérolémiante est associée à une diminution du LDL-C, des LDL oxydées et des triglycérides (KABCHI *et al.*, 2000 ; JEMAI *et al.*, 2008). L'étude réalisée par JEMAI *et al.*, (2008) montre que l'extrait de feuille d'olivier diminue le taux de TSH sanguin avec une augmentation de la T3, probablement due à une stimulation de l'enzyme qui convertit la T4 en T3.

Des résultats ont mis en évidence la propriété analgésique des feuilles d'olivier avec une dose de 50-200mg/kg dans plusieurs types de douleur chez les rats. Par conséquent elles peuvent être employées comme un calmant des maladies douloureuses (ESMAEILI-MAHANI *et al.*, 2010).

1.2. Valorisation de sous-produits oléicoles

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile, génère deux résidus l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons) qui représentent un pourcentage important du poids total des olives traitées. De plus, l'olivier, à travers la taille engendre des feuilles, des brindilles et du gros bois (NEFZAOU, 1991 ; SAYADI *et al.*, 2000). De nos jours, la pollution joue un rôle majeur dans la destruction de la nature. Etant donné que les margines sont considérée comme un polluant de l'industrie oléicole, le plus souvent rejetées dans le milieu naturels, notamment dans les rivières, cela impose des traitements de dépollution et de valorisation. La figure 3 résume les principales voies de valorisation des sous-produits oléicoles (DERMECHE *et al.*, 2013).

1.2.1. Les feuilles

Ce ne sont pas les produits de la taille mais des feuilles recueillies après le lavage et le nettoyage des olives à l'entrée de l'huilerie. Leur quantité est estimée de 5 à 6 Kg de matières sèches par arbres et par an (NEFZAOU, 1987). Les feuilles peuvent être valorisées comme des antioxydants naturels destinés aux industries agroalimentaires et pharmaceutiques (LEE *et al.*, 2009), et des agents antibactériens (DJENANE *et al.*, 2012) grâce à leur richesse en polyphénols.

1.2.2. Les grignons

Les grignons sont des résidus solides composés du noyau, de la pulpe, de la peau et dans certains cas, des eaux de végétation des olives ou l'eau rajoutée lors de trituration issus de la première pression ou centrifugation (CNUCED, 2010). Les grignons ne posent pas de

problèmes environnementaux du fait qu'ils peuvent être valorisés en tant qu'aliment pour les bétails ou pour la combustion, et comme fertilisant dans l'agriculture.

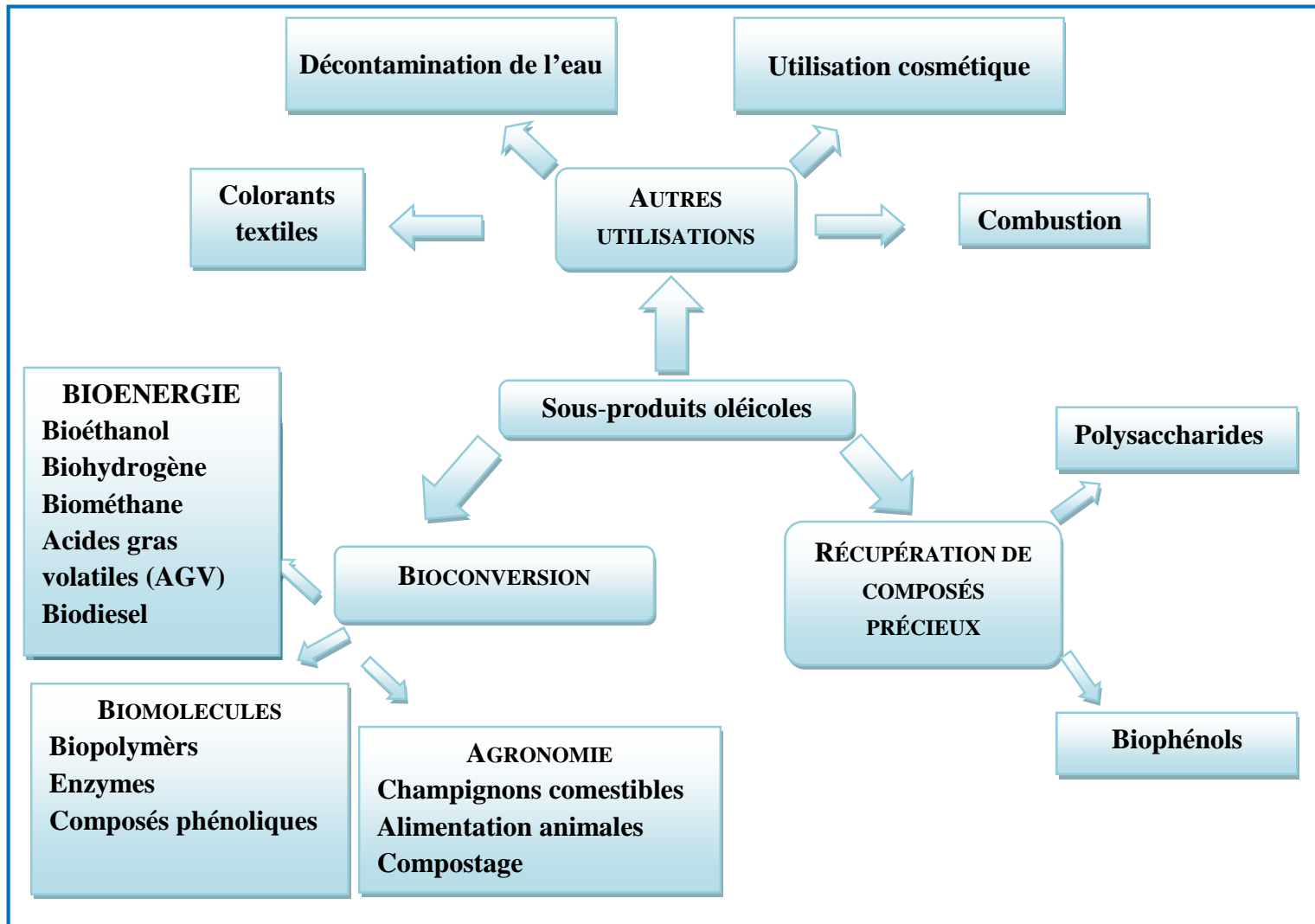


Figure 3. Valorisation de sous-produits oléicoles (DERMECHE *et al.*, 2013).

- Utilisation dans l'alimentation animale :

Après addition d'autres composants (mélasse, fourrage, minéraux...).

- Utilisation des grignons comme combustible :

Le grignon d'olive est un combustible de valeur calorifique moyenne (2950 Kcal/kg), Après séparation de la pulpe du noyau, la pulpe est transformée en pellets et les noyaux peuvent être utilisés directement dans les chaudières.

- Utilisation des grignons d'olive pour la fertilisation des terres agricoles :

Utilisation du compost des grignons d'olive sur les terres agricoles pour l'amélioration de la fertilité des sols et de la productivité des cultures. L'épandage de ces déchets doit faire l'objet d'une étude préalable afin de préciser les doses et les périodes d'épandage adaptées aux cultures fertilisées. Cette technique permet d'une part de réduire les coûts de fertilisation et d'autre part de limiter la pollution des ces rejets.

1.2.3. Les margines

1.2.3.1. Définition

Les margines, parfois dénommées alpechine, sont des résidus liquides d'une couleur brune rougeâtre à noire, d'un pH acide varie entre 4,7- 5,7 (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012). Ceci est dû à la composition phénoliques contenus dans les margine ainsi qu'à la variété et le degré de maturation des olives et l'état de dégradation des composées phénoliques des margines (SABAH *et al.*, 2004).

L'effluent liquide des huileries « margines » est constitué des eaux de végétation des olives et de celle ajoutées aux différents stades du procédé d'extraction de l'huile. Si les premières dépendent uniquement des caractéristiques des olives triturées, les deuxièmes sont quant à elles inhérentes au système d'extraction. En effet, lors de l'extraction de l'huile d'olive, la consommation en eau diffère selon que le système d'extraction fonctionne en discontinue ou en continue (à trois phases ou à deux phases).

Les margines comportent deux fractions organiques : une fraction insoluble constituée essentiellement de pulpes d'olives qui représente la matière en suspension et colloïdale (HAMDI, 1991), et une fraction soluble dans la phase aqueuse qui contient les sucres, les lipides, les composés azotés, les vitamines, les acides organiques et les CP (HAMDI, 1991 ; OBIED *et al.*, 2005).

1.2.3.2. Valorisation

Les tentatives de mises en place d'une technique de dépollution des margines ont abouti à l'élaboration de procédés de valorisation aussi bien à l'échelle de laboratoire et industrielle (ABU KHAYER *et al.*, 2013). Ces complications sont essentiellement dues aux propriétés des CP présents dans les margines (SAYADI *et al.*, 2000).

Cette valorisation d'une part, a pour objectif d'éliminer les composées phénoliques et d'autre part, d'utiliser les margines dans les domaines de la biotechnologie, de la chimie, de l'agriculture et voir même de génie civil (LEVIS- MENZI *et al.*, 1992 ; DE LA CASA *et al.*, 2009).

Dans la mesure où certains polyphénols des margines sont biologiquement actifs, la mise en œuvre de techniques de valorisation de ces effluents serait d'une grande importance. Dans cet égard, plusieurs techniques ont été développées.

De nombreux auteurs ont souligné que la richesse des margines en matière organique et en éléments minéraux, permettant leur utilisation comme fertilisant complémentaire (FIESTAS ROS, 1986 ; TOMATI et GALLI, 1992). Bien que les résultats relatifs à la charge organique, aux CP et à la conductivité électrique semblent en faveur de l'épandage des margines sur les sols (LEVI-MINZI *et al.*, 1992), d'autres recherches semblent être nécessaires pour confirmer les indications fertilisantes et/ou pour évaluer la persistance des composés récalcitrants des margines dans le sol (MEKKI *et al.*, 2006).

La valorisation agricole des margines par compostage a pour but essentiel de fixer les éléments fertilisants sur un substrat carbonés au cours d'un processus aérobie, pour les restituer au sol en fonction des besoins des plantes (NEFZAOUI, 1987 ; ROIG *et al.*, 2006).

Les margines peuvent servir aussi comme milieu favorable pour la production d'enzymes par des micro-organismes (AGUILERA *et al.*, 2008 ; DERMECHE *et al.*, 2013).

Plusieurs techniques de traitement des margines par voie anaérobie peuvent améliorer la valorisation des sous-produits oléicoles. Cependant, l'effet antioxydant des polyphénols reste le facteur limitant pour ces procédés de valorisation, ce qui nécessite une étape de prétraitement afin d'extraire les CP (HAMDI, 1996 ; DE MARCO *et al*, 2007). Par ces procédés, les margines peuvent donc être revalorisées en eau d'irrigation (eau traitée), en bioénergie tels que la production de biométhane (FEDORAK et HRUDEY, 1984 ; BLIKA *et al*, 2009), de bioéthanol (MASSADEH et MODALLAL, 2008) et en alimentation de bétail (LEULMI, 2011).

Certains entre eux sont récents, il s'agit en particulier de la récupération des composants aromatiques et phénoliques et des glucides. Il est bien connu que les margines renferment un certain nombre d'antioxydants phénoliques naturels et en particulier les ortho-diphénols. Parmi ces produits naturels figurent l'acide caféique et plus particulièrement l'hydroxytyrosol (ALLOUCHE *et al*, 2004 ; BENHAOUN et YVETTE, 2007 ; LAFKA *et al*, 2011). Ces molécules antioxydantes interviennent dans la protection des corps gras insaturés contre l'auto-oxydation qui est responsable des phénomènes de rancissement (FKI *et al.*, 2005). L'activité anti inflammatoire (BITTER *et al.*, 2005). Les champignons comestibles comme *Pleurotus ostreatus* et *Lentinula edodes* sont capables de se développer en utilisant les margines comme source de nutriments (KALMIS *et al*, 2008 ; LAKHTAR *et al*, 2010).

II. Polyphénols

2.1. Généralités

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire (HE *et al.*, 2008). Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (RICHTER, 1993).

Les polyphénols forment une immense famille de plus de 8000 structures phénoliques identifiées (WILLIAMSON et MANACH, 2005 ; TAO et LAMBERT, 2014), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (AKOWAUH *et al.*, 2004).

Ils sont divisés en plusieurs catégories (DACOSTA, 2003):

- Les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ;
- les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ;
- les acides phénoliques et les coumarines ;
- les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables.

Les CP peuvent intervenir dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, se trouvent les polyphénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins. Ils peuvent permettre aussi aux plantes de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes et environnementales (GEE et JOHNSON, 2001). Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (MACHEIX *et al.*, 2005).

2.1.1. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques

- **La voie de Shikimat:** cette voie conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (KNAGGS, 2003).
- **La voie d'acétate :** qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones (BRUNETON, 1999 ; NACZK et SHAHIDI, 2004).
- **La voie de biosynthèse des flavonoïdes :** De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, cela est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

2.1.2. Structures chimiques et classification

L'élément structural fondamental qui caractérise les CP est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction chimique : éther, ester, ou hétéroside (HANDIQUE et BARUAH, 2002 ; BALASUNDRAM *et al*, 2006).

Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les reliait. On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes (BOROS, 2010), ou sous forme conjuguée à l'ester ou hétérosides (BRUNETON, 1999) (figure 4, 5, 6). Les différentes classes de ces CP et les plantes qui les renferment sont représentées dans le tableau I.

Tableau I. Principales classes des composés phénoliques (BRUNETON, 1999 ; HENNEBELLE, 2006).

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples	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	Acétophénones	3-acétyl6-méthoxybenzaldehyde	Saule
9	C ₆ -C ₃	Acides phénols cinnamiques	Acidecoumarique, Acide caféique	Romarin Marronnier d'inde
10	C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp.
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Bellidifoline, mangoctine	Racine de gentiane, Centaurée
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	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 (proanthocyanidols)	Aesculitanins	Marronnier d'inde, vigne

En plus des composés donnés dans le tableau ci-dessus, d'autres composés on peut trouver :

- Des phytoestrogènes ;
- Les saponines (triterpénoïdes) ;
- Les phytostérols et les phytostanols (PARASKEVI et MOUTSATSOU, 2007). Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates, qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates (DACOSTA, 2003).

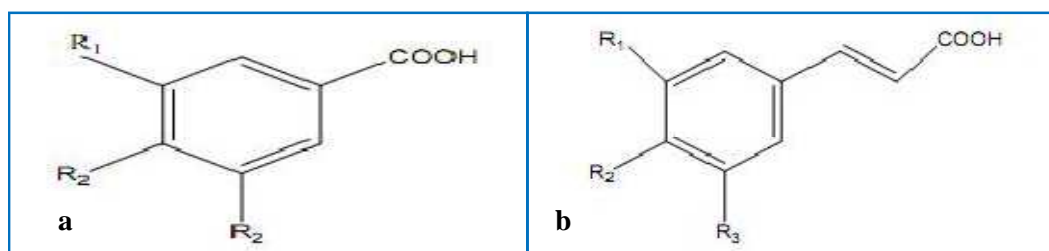


Figure 4. Structure des acides phénoliques : a) acides cinnamiques ; b) acides benzoïques (rapportée par CHIRA, 2008).

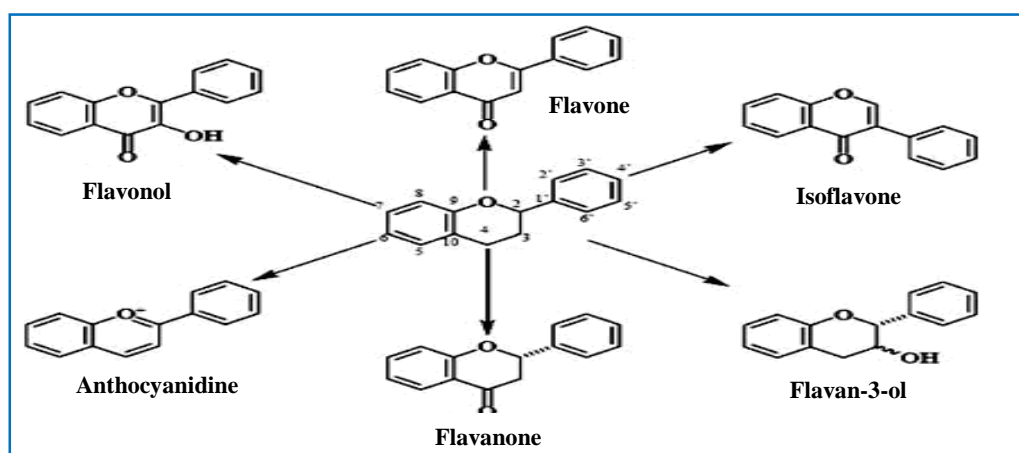


Figure 5. Structure de base des flavonoïdes (rapportée par HEIM *et al.*, 2002).

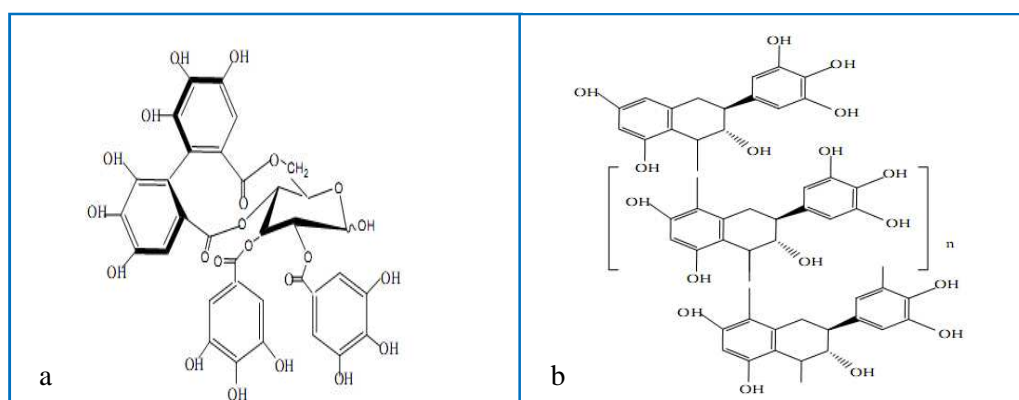


Figure 6. Structure des tannins (rapportée par HATANO *et al.*, 2005) : a) Structure d'un tannin hydrolysable: Tellimagrandin ; b) tannin condensé: polymère de proanthocyanidine.

2.1.3. Sources des composés phénoliques

L'organisme humain ne synthétise pas de polyphénols, mais de manière générale ils sont largement répandus dans le règne végétal, et sont consommés quotidiennement (DWYER et PETERSON, 2002). Ils sont présent dans la plupart des organes végétaux consommés par l'homme : graine (soja, café, riz...), fruit (raisin, citrus, olive...), feuilles (thé, nombreuses épices, romarin, thym...) ou autre organes (oignon, jeunes germinations de blé ou d'avoine, patate douce...). Ils se retrouvent également, plus ou moins transformés dans les produits transformés dans les produits industriels issus de ces mêmes végétaux : jus de fruit, vin, bière, thé, café, huiles, dérivés de céréales) (MACHEIX *et al.*, 2005 ; BLASUNDRAM *et al.*, 2006 ; DIMITRIOS, 2006).

2.1.4. Rôles des composés phénoliques dans les aliments et les végétaux

2.1.4.1. Rôles dans l'alimentation

Les CP font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002). Ces corps jouent un rôle fondamental car ce sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur des polyphénols (LUGASI *et al.*, 2003).

Plusieurs centaines de molécules ont été identifiées dans les aliments réparties en plusieurs classes, on peut citer parmi les plus importantes :

-Les anthocyanes responsables de la couleur des fruits rouges (cerise, cassis, fraise, etc.). En effet, en plus de leur contribution à la couleur et à l'arôme, ils jouent un rôle déterminant sur le plan gustatif, et tout particulièrement sur les sensations d'astringence et d'amertume (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

- les tanins responsables de l'astringence de divers fruits (pellicule et pépins du raisin, chair du kaki, etc.).

- les flavanones responsables de l'amertume du pamplemousse et également abondantes dans l'orange. Pour les légumes, on peut citer l'oignon riche en flavonols (quercétine).

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 (tableau II). Cependant, comme pour la plupart des métabolites dits secondaires, il existe en réalité une extrême diversité de répartition de ces composés selon les espèces et en fonction des différents organes et tissus d'une plante ou encore les différents stades de développement (GRESELE *et al.*, 2011).

2.1.4.2. Rôles dans la physiologie et la protection des plantes

Les dérivés d'acides hydroxy-cinnamiques constituent des composés importants dans la physiologie de la plante de par leur large distribution et de par leur rôle biologique. Ils sont impliqués dans les processus de lignification, de la fertilité, de pigmentation (des fleurs, des légumes et de quelques fruits comme raisins, agrumes, etc...). Il a été classiquement montré que beaucoup de phénols ou quinones qui en dérivent par oxydation sont des inhibiteurs du

développement de certains microorganismes saprophytes (dans les litières végétales) ou parasites, champignons ou bactéries (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Tous les CP absorbent les rayonnements UV et donc participent à la protection des végétaux contre le rayonnement solaire, en raison de leur localisation superficielle dans les tissus. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (MAKOI et NDAKIDEMI, 2007). La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en CP (BAHORUN, 1997).

Tableau II. Teneur en composés phénoliques de quelques végétaux utilisés ou consommés par l'Homme (d'après FLEURIET et MACHEIX, 2003).

Aliments	Principaux composés phénoliques concernés	Teneurs
Légumes		
Légumes secs	Phénols totaux	300 mg à 17 g.Kg ⁻¹
Pomme de terre	Acides phénoliques	32 à 103 mg.Kg ⁻¹
Oignon	Dérivés de la quercétine	56 à 1020 mg.Kg ⁻¹
Fruits		
Pomme	Phénols totaux	100 mg à 3 g.Kg ⁻¹
	Acides chlorogénique	26 à 510 mg.Kg ⁻¹
Raisin rouge	Phénols totaux	500 mg à 5.6 g.Kg ⁻¹
Raisin rouge (pellicule)	Anthocyanes	200 mg à 5 g.Kg ⁻¹
Cassis	Anthocyanes	1 à 10 g.Kg ⁻¹
Myrtille	Anthocyanes	3 à 4.5 g.Kg ⁻¹
Divers		
Feuilles de thé vert	Phénols totaux	39 % MS
Grains de café	Esters caféiques	6 à 10 % MS
Graines de sorgho	Tanins	4 % MS
Bois (hêtre, chêne...)	Lignines	15 à 35 % du bois

Dans chacun des cas, les valeurs extrêmes correspondent à des variétés ou espèces différentes. (MS : matière sèche).

2.1.5. Intérêt biologique des polyphénols

Le rôle des CP est largement montré dans la protection contre certaines maladies (tableau III) en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (FLEURIET *et al.*, 2005 ; GOMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006 ; XIUZHEN *et al.*, 2007). Les CP sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique (CROZIER *et al.*, 2010). De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires (MANACH *et al.*, 2005), anti-inflammatoires, antiathérogènes, antibactériennes, antiviraux (BABAR ALI *et al.*, 2007), anti-allergènes (FALLEH *et al.*, 2008 ; HODGSON, 2010) (figure 7).

Ils sont regroupés dans la catégorie de veinotoniques et des vasculo-protecteurs (GHOSH *et al.*, 2009). Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des antiagrégants plaquettaires ou hypotenseurs sans résultats probants (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

Les polyphénols préviennent le développement des maladies cancérigènes dans l'organisme en inhibant les réactions oxydatives et empêchant la formation d'ADN anormal (ROSS, 1999). La myricétine et la quercétine ont permis de diminuer la rupture des 2 brins d'ADN et le taux de pyrimidines oxydées, par contre ils n'ont aucun effet sur les purines oxydées. Les catéchines ont permis de limiter la rupture des deux brin d'ADN ainsi l'oxydation des bases purines (DELGADO *et al.*, 2008).

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

Composés phénoliques		Activité biologique
Acides Phénols	- Acide caféique - Acide 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, anti-allergique, anti-ulcéreuse - Antivirale, antimicrobienne, hypotenseur - Diurétique
Coumarines	- Dicoumarol	- Anticoagulant, antioxydant - Protectrice vasculaire - Antioedémeuse

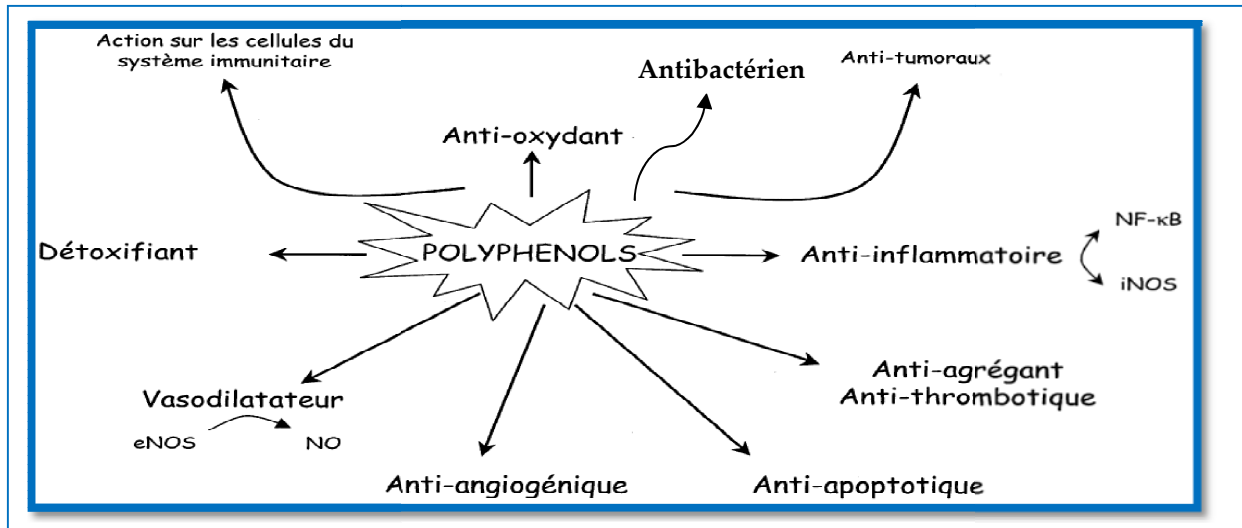


Figure 7. Effets biologiques des polyphénols (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002) (modifié).

Les polyphénols agissent par différents mécanismes dont l'inhibition de l'absorption du glucose au niveau intestinal (DEMBINSKA-KIEC *et al.*, 2008), ou encore son assimilation dans les tissus périphériques (inhibition de la gluconéogenèse, de la stimulation adrénergique de l'absorption du glucose ou stimulation de la libération de l'insuline par les cellules pancréas) (SCALBERT *et al.*, 2005).

Les polyphénols ont montré des effets protecteurs dans d'autres pathologies, telle que la sclérose en plaque (GONZALEZ-GALLEGUO *et al.*, 2010), l'ostéoporose (SCALBERT *et al.*, 2005) et les pathologies liées au vieillissement cérébral (maladie d'Alzheimer, autres types de démences, maladie de Parkinson...) (SPENCER, 2010). Les CP peuvent aussi atténuer les infections d'origine virale ou bactérienne (GHEDIRA, 2005).

2.1.6. Disponibilité biologique des composés phénoliques

Les propriétés biologiques des polyphénols dépendent de leur disponibilité biologique (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000). Il y'a eu des avancées ces dernières années concernant l'absorption et le métabolisme des polyphénols et 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).

La première cause déterminante de la disponibilité biologique d'un polyphénol, administré par voie orale, est l'ampleur de son absorption par le tractus gastro-intestinal (DE BOER, 2007). Le taux d'absorption intestinal 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).

Les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle. Cependant, la plupart des polyphénols existent dans les produits alimentaires notamment sous forme de glycosides ou de polymères qui ne peuvent pas être absorbés sous leur forme native. Ces substances doivent être hydrolysées par les enzymes intestinales telles que la β -glucosidase et la lactase phloridzine hydrolase (LPH) (MANACH *et al.*, 2004 ; DE BOER, 2007).

Une fois absorbés, les polyphénols sont soumis à trois types de réactions de conjugaison principales : méthylation, sulfatation et glucuronidation, réactions catalysées par plusieurs enzymes et ceci aux niveaux de plusieurs tissus particulièrement le foie (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000).

La flore microbienne du colon joue également un rôle critique dans le métabolisme des CP (WILLIAMSON et MANACH, 2005) qui ne sont pas absorbés dans l'estomac ou dans l'intestin grêle et ceux subissant le cycle entérohépatique (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000 ; MANACH *et al.*, 2004 ; SILBERBERG *et al.*, 2006). Les métabolites des polyphénols peuvent suivre deux voies d'excrétion à savoir, la voie biliaire et la voie urinaire (MANACH *et al.*, 2004).

2.2. Les composés phénoliques des olives et produits dérivés

2.2.1. Les feuilles d'olivier

Les feuilles de l'olivier sont très riches en polyphénol. On trouve spécialement l'oleuropéine (figure 8) qui représente le composé majoritaire, elle atteint un pourcentage de 14,2 % de la matière sèche et l'hydrolyse acide de l'extrait des feuilles produit une concentration élevée en hydroxytyrosol (2,3g d'hydroxytyrosol / 100 g de feuilles fraîches), rutine (R), vanilline, acide vanillique (AV), le verbascoside, l'apigénine-gucoside et le luteoline-7-glucoside. Leur concentration dépend de la qualité, l'origine et de la variété des oliviers (PEREIRA *et al.*, 2007 ; ALTIOK *et al.*, 2008 ; GHEDIRA, 2008 ; LEE et LEE, 2010). Les CP des feuilles d'olivier ont montrés des activités antibactérienne et antifongique très marquées (PEREIRA *et al.*, 2007 ; LEE et LEE, 2010).

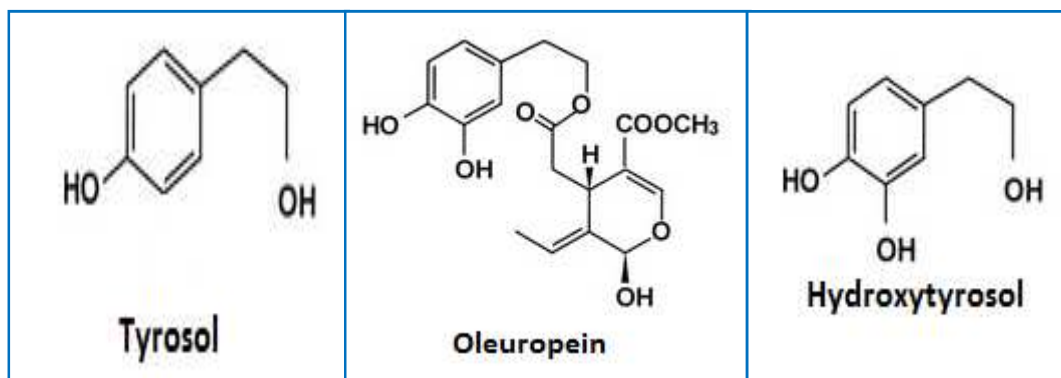


Figure 8. Structures des principaux composés phénoliques des feuilles de l'olivier (OMAR, 2010).

2.2.2. Les margines

Les margines ou eaux de végétation constituent un sous-produit représentent un milieu complexe contenant principalement les polyphénols dont le tyrosol et l'hydroxytyrosol, ce dernier est le plus abondant des monomères phénoliques (FKI *et al.*, 2005 ; DE MARKO *et al.*, 2007 ; AMARAL *et al.*, 2008). La composition phénolique des margines varie en fonction de la composition des olives (FKI *et al.*, 2005).

Les CP proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive. Leur solubilisation dans l'huile est cependant inférieure à celle qui se produit dans les

margines selon RANALLI. Les polyphénols sont dix fois plus abondant dans les margines que dans l'huile.

Plus de 50 CP et plusieurs alcools phénoliques ont été identifiés. Il s'agit de monomères aromatiques et de CP à haut poids moléculaire (YAAKOUBI *et al*, 2009 ; LAFKA *et al*, 2010 ; NIAOUNAKIS *et al*, 2006 ; TANCHEV *et al*, 1980). Les acides et les alcools phénoliques sont le groupe le plus vaste et le plus répandu dans les margines (figure 6). Les CP à haut poids moléculaire sont essentiellement des tanins dont la concentration peut atteindre 12 g/l (SERAPHIM *et al.*, 2008). Le catécholmélaniquin est un flavotanin, il est le plus répandu et en quantité la plus élevée dans les margines (AISSAM, 2003).

2.2.3. Les olives de tables

Les CP dans les olives ont une grande importance, car de leur contribution à la couleur, le goût et la texture des olives, ainsi que leurs propriétés (MARSILIO *et al.*, 2001). Les olives de tables sont une excellente source de CP, l'analyse chromatographique des CP dans la pulpe et dans la saumure des olives révèle que (OWEN, 2003) :

- Dans la préparation des 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.
- Dans la préparation des olives de tables noires, quatre CP sont présents en quantités non négligeable, il s'agit de l'hydroxytyrosol, de l'acide dihydro-caféique, du tyrosol, et de l'acide phlorétique, encore appelé acide dihydro-p-coumarique. Cependant, l'hydroxytyrosol est tout de même majoritaire puisqu'il représente 35% des CP totaux.

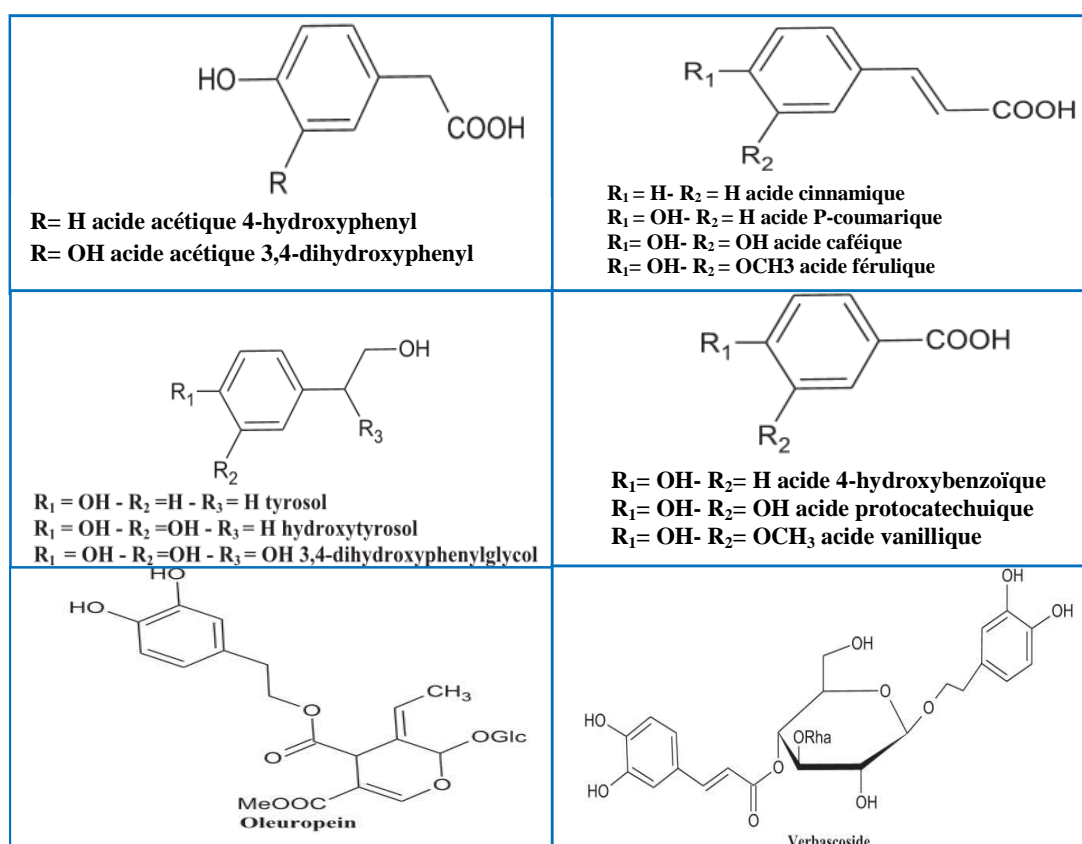


Figure 9. Structures des principaux composés phénoliques des margines (DERMECHE *et al.*, 2013).

2.2.4. Les grignons

Une grande partie de la fraction phénolique est retenue dans ce sous-produit. Les polyphénols de l'olive sont en majorité éliminés dans les margines et l'huile durant la trituration. Certains acides phénoliques sont identifiés, notamment les acides galliques, protocatéchiques, p-hydroxybenzoïques, vanilliques, caféïques et féruliques (ÜNAL, 1994).

Il est à noter que les noyaux ne contiennent que de faibles concentrations en oleuropéine, ils sont dépourvus des flavonoïdes. Le (+)-1-pinorésinol est le prédominant lignane dans le noyau (SERVILI *et al.*, 2009), et le nüzhenide est le principal CP caractérisé par HPLC couplé à la spectroscopie de masse en utilisant la technique dite d'ionisation électrospray (SILVA *et al.*, 2010).

2.2.5. L'huile d'olive

Les phénols de l'huile d'olive comme dans le fruit un mélange complexe, certaines différences dans la composition chimique entre les deux sont attribuées aux séries d'altérations chimiques et enzymatiques de quelques phénols durant l'extraction de l'huile. Ces modifications incluent l'hydrolyse des glucosides par les glucosidases, l'oxydation des CP par les phénols oxydases et la polymérisation des phénols libres (RYAN *et al.*, 1999 ; BENDINI *et al.*, 2007). Ainsi 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). S'étendant sur une certaine de CP, ils sont répartis en plusieurs classes, on trouve les acides phénoliques (gallique, proto-catechuique, p-hydroxybenzoïque, vanillique, caféïque, syringique, p-coumarique, ferulique et cinnamique), les flavonoïdes, les phényles éthyle alcool (tyrosol (p-HPEA) et hydroxytyrosol (3,4-DHPEA)), les sercoïridoïdes aglycone et leurs dérivés dont l'oleuropeine (3,4-DHPEA-EA), le pinorésinol et le 1-acétoypinorésinol sont deux lignanes identifiés pour la première fois dans l'huile lors de l'étude de (BRENES *et al.*, 2000). Les sercoïridoïdes et lignanes en sont les plus concentrés dans l'huile (SERVILI *et al.*, 2004).

2.3. Méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques

2.3.1. Méthodes d'extraction

L'extraction des CP est une procédure assez difficile en raison de leur grande diversité structurale, ainsi que leur sensibilité aux modifications chimiques, sous l'effet de la température, l'air et la lumière, et aux modifications enzymatiques (NACZK et SHAHIDI, 2004).

Le schéma général des différentes étapes d'extraction, de caractérisation et de dosage soit valable pour la majorité des CP, il devra quelquefois être modifié pour être mieux adapté à leur nature chimique, leur solubilité et leur degré de liaison avec d'autres constituants végétaux (MACHEIX *et al.*, 2005). Il n'existe aucune méthode permettant d'extraire de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des CP ou une classe bien spécifique (NACZK *et al.*, 2004).

- **L'extraction par solvant**

L'extraction par solvant est une technique très utilisée pour la séparation d'un produit provenant d'un mélange obtenu en fin de réaction chimique ou pour isoler une espèce chimique à partir d'un mélange d'espèces naturelles. MOMPON et ses collaborateurs, (1998),

ont préconisé deux modes d'extraction, l'extraction liquide-liquide et l'extraction solide-liquide.

Au cours de l'extraction liquide-liquide, il s'agit principalement d'interaction moléculaire entre le solvant et le soluté. Par contre l'extraction solide-liquide met en jeu des mécanismes plus complexes et moins bien connus. Le contact entre le solvant (liquide) et la matière végétale (solide) a pour but de libérer les polyphénols à partir généralement des structures vacuolaires et leur diffusion vers le milieu d'extraction après rupture du tissu végétal (OWEN et JOHNS, 1999). La plupart des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion. L'extraction par solvant organique offre un bon rendement en CP, cependant leur grande utilisation poserait des problèmes de santé publique.

A l'heure actuelle, nombre de méthodes alternatives éliminant ou réduisant significativement leur utilisation et qui introduisent une certaine forme d'énergie additionnelle au processus afin de faciliter le transfert des analytes à partir de l'échantillon vers le solvant, sont mises en œuvre (TSAO et DENG, 2004).

- **L'extraction en phase solide**

L'extraction en phase solide (SPE) est employée pour extraire et concentrer des analytes à partir d'une matrice liquide en divisant les composés entre une phase solide et liquide (BENDINI *et al.*, 2003). C'est une technique simple, rapide et économique et réduit significativement le volume de solvant utilisé. La SPE est également utilisée pour la purification et la pré-concentration de composés vus la sélectivité de l'adsorbant (TSAO et DENG, 2004).

- **L'extraction ultrasonique**

Les méthodes d'extractions ultrasoniques assistées ont été employées pour un grand nombre de matière végétale (PRIEGO-CAPOTE *et al.*, 2004 ; USAQUEN-CASTRO *et al.*, 2006). Elle tire ses avantages de la haute température (qui augmente la solubilité et la diffusion) et de pression (qui favorise le transport et la pénétration) appliquées à l'interface entre la solution de solvant qui est soumise à l'énergie ultrasonique et une matrice solide. Combinée avec l'énergie oxydative des radicaux créés durant la sonolyse, la méthode donne puissant pouvoir d'extraction.

- **L'extraction assistée par micro-ondes**

L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (MAE) consiste à appliquer les micro-ondes aux solides traités (secs ou humides) et le solvant d'extraction, transparent totalement ou partiellement. Il est possible d'atteindre en moins d'une minute des rendements d'extraction habituellement atteints après plusieurs heures d'extraction. Elle consiste à chauffer le solvant, ayant une bonne polarité, en contact avec l'échantillon au moyen de l'énergie des micro-ondes. Ce qui augmenterait la pénétration du solvant dans la matrice, permettant la dissolution des composés à extraire (LETELLIER et BUDZINSKI, 1999 ; HUDAIB *et al.*, 2003).

L'extraction par MAE ou des ultrasons a été décrite par JAPON-LIJAN *et al.* (2006). Cette dernière a été proposée afin d'accélérer l'extraction des CP des feuilles d'olivier. La

MAE comparée à l'extraction conventionnelle par solvant, offre beaucoup d'avantages à savoir un temps d'extraction plus court, utilisation plus faible de solvant, bonne reproductibilité et une plus grande efficacité d'extraction (TSAO et DENG, 2004 ; MARTHA, 2008).

- **L'extraction par fluide supercritique**

L'extraction par fluide supercritique (SFE) utilise certain gaz, tels que le dioxyde de carbone (CO₂) qui peuvent être liquéfiés à un état appelé fluides supercritique (YRJÖNEN, 2004). Le CO₂ supercritique, utilisé comme solvant d'extraction, du fait de sa faible viscosité, lui conférant une grande capacité de diffusion et lui permettant ainsi d'avoir accès à des CP liés à la paroi cellulaire.

Sa densité relativement élevée lui confère un pouvoir de solvation, ce qui permet un meilleur taux d'extraction.

- Procédé non dénaturant
- Temps d'extraction réduit.

L'avantage de la SFE réside dans le fait que le CO₂ étant un gaz chimiquement inactif, présente une faible toxicité. En outre elle minimise les processus de dégradation dus à l'air, à la lumière et à la température. Cependant la SFE reste une technique fortement couteuse (PANSERA *et al.*, 2004).

- **L'extraction liquide sous pression**

L'extraction liquide sous pression (PLE) fonctionne suivant le principe de l'extraction avec des liquides surchauffés et à de hautes pressions. Ceci augmente la solubilité et la diffusion de l'analyte dans le solvant et conduit à la rupture des interactions entre la matrice et le soluté à extraire, accélérant de cette manière le processus d'extraction.

La PLE offre également la possibilité de réaliser l'extraction dans une atmosphère inerte à l'abri de la lumière, réduisant de la sorte des phénomènes de photo-oxydation.

2.3.2. Méthodes de quantification

Il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des CP présents dans un extrait végétal non purifiée. Néanmoins, une estimation rapide (et souvent très fortement surévaluée) de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes. Diverses techniques ont été mises en œuvre pour l'analyse des CP.

- **La méthode colorimétrique**

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

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 (s) benzénique (s), des fonctions hydroxyles phénoliques et des différentes doubles liaisons présentes dans la molécule (MACHEIX *et al.*, 2005 ; MARTHA, 2008). Lorsqu'un CP est très

fortement majoritaire dans un matériel végétal donné, on peut alors avoir une estimation approximative rapide de la teneur du matériel à partir du spectre d'absorption (UV ou visible).

- **Méthodes chromatographiques**

Les séparations chromatographiques sur couche mince ou sur colonne sont utilisées (MACHEIX *et al.*, 2005). La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est de très loin, la technique la plus appliquée pour la séparation et la quantification des CP comme en témoignent les excellentes séparations déjà obtenues depuis plus de 20 ans (NACZK *et al.*, 2004 ; MACHEIX *et al.*, 2005 ; ROGINSKY et LISSI, 2005).

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet d'accéder qualitativement aux structures des molécules et à leur environnement physico chimique sans dégrader l'échantillon étudié. Celle-ci est basée sur la possibilité de faire résonner différents noyaux dans un champ magnétique, donc sur leurs propriétés magnétiques et cinétiques (ALONSO-SALCES *et al.*, 2010).

- **Electrophorèse capillaire**

L'électrophorèse capillaire (EC) (BONOLI *et al.*, 2003 ; ARRAEZ-ROMAN *et al.*, 2006 ; CARRASCO-PANCORBO *et al.*, 2006 ; ARRAEZ-ROMAN *et al.*, 2007 ; GOMEZ-ROMERO, ARRAEZ-ROMAN, MORENO-TORRES *et al.*, 2007; GOMEZ-ROMERO, ARRAEZ-ROMAN, SEGURA-CARRETERO *et al.*, 2007), une méthode analytique sensible, rapide de haute résolution. Utilise de très faibles quantités d'échantillons mais aussi des volumes de solvants réduits (BENDINI *et al.*, 2003 ; CARRASCO-PANCORBO *et al.*, 2006).

- **Méthodes couplées**

D'autres techniques performantes sont aussi utilisées, on peut citer, la chromatographie gazeuse (LIBERATORE *et al.*, 2001 ; SAITTA *et al.*, 2002) couplée à la spectroscopie de masse (GC, MS) donnent aussi des résultats très satisfaisants,

Le couplage de ces techniques à différents détecteurs (la détection UV à une longueur d'onde fixe, la détection à barrette de diodes, la détection fluori-métrique...) s'avère déterminant, améliore davantage leur sensibilité et leur résolution.

L'application de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est recommandée pour l'identification de certains CP. En effet, cette technique permet l'analyse complète de la structure, mais généralement, elle est employée pour déterminer la masse moléculaire et pour établir la distribution des substituants sur le (s) noyau(x) phénolique(s) (PROESTOS *et al.*, 2006). Pour de nombreux auteurs, ce sont les techniques les plus adéquates pour l'étude des flavonoïdes (DE RIJKE *et al.*, 2003 ; PRASAIN *et al.*, 2004).

2.4. Activité antioxydante

2.4.1. Généralités

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques

associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (GUINEBERT *et al.*, 2005).

L'oxygène est un élément indispensable à la vie de tous les organismes aérobies, car il permet de produire la majorité de l'énergie chimique en oxydant les substances organiques dans leur mitochondrie. Cependant, l'oxygène peut être une source d'agression pour ces organismes qui convertissent une partie de cet élément en métabolites hautement réactifs : les radicaux libres, qui peuvent être d'origine endogène ou encore exogène (PANDEY et RIZVI, 2011 ; KALAM *et al.*, 2012).

2.4.2. Définition d'un radical libre et le stress oxydant

Les radicaux libres sont des atomes, molécules ou des parties de molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans leur orbite extrême tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), et le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) (WU et CEDERBAUM, 2003). Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue et par des sources endogènes au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, les peroxysomes et le système de cytochrome P-450. Ces radicaux sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire qui est à la base de certaines maladies comme l'athérosclérose, le cancer, maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (FAVIER, 2003). Ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides (POURRUT, 2008), des acides nucléiques (FAVIER, 2003)

Par ailleurs, il existe d'autres dérivées oxygénés réactives dont leur toxicité est très importante tel que l'oxygène singlet (O_2), l'ozone, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le peroxydinitrite $ONOO^{\bullet}$ (DACOSTA, 2003 ; FAVIER, 2003), qui ne sont pas des radicaux libres, mais peuvent être des précurseurs des radicaux. De point de vue terminologique, l'ensemble des radicaux libres et des espèces réactives non radicalaires est souvent connue sous le nom des espèces réactives de l'oxygène ou ERO (LEV *et al.*, 2007).

Ce déséquilibre est à l'origine de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (FAVIER, 2003).

2.4.3. Antioxydants

Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1999). Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (SHIMIZU, 2004).

2.4.3.1. Antioxydants d'origine synthétique

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétra-butylhydroquinone (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 d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (LISU *et al.*, 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (YU *et al.*, 2000).

2.4.3.2. Antioxydants d'origine naturelle

- L'acide ascorbique, tocophérols, β - carotène

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 choux, le poivron, le persil et le kiwi (BOSSOKPI, 2002).

Les tocophérols sont des CP de structure apparentée à celle de l' α -tocophérol. On distingue l' α tocophérol (E307), le γ -tocophérol (E308) et le δ - tocophérol (E309) (figure 10).

Le contenu en tocophérols 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, le lait, les œufs, légumes à feuilles vertes (BOSSOKPI, 2002).

En outre, on a le β -carotène qui apparait un piègeur efficace (radicaux hydroxyles et peroxyles) et captation de l'oxygène singulet O_2 (HADI, 2004). Il est présent dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les pinards, la papaye (BOSSOKPI, 2002).

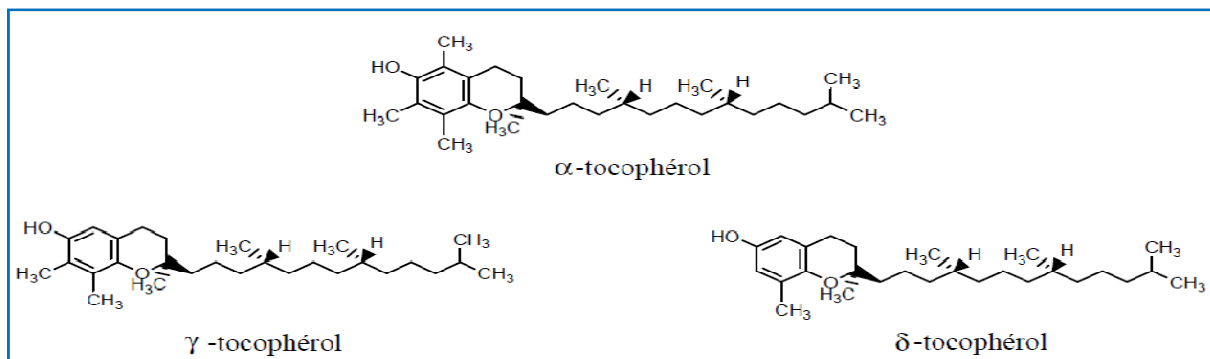


Figure 10. Formule des α , γ et δ -tocophérols.

- Polyphénols

Il est connu que la plupart des effets biologiques des flavonoïdes, tels que l'activité anti-inflammatoire et anti-tumorale, sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels (Figure 8). En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (NIKI, 2010).

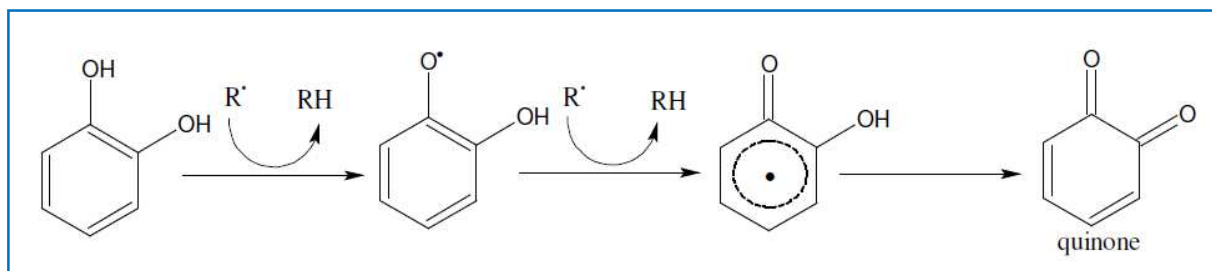


Figure 11. Le piégeage des ERO par les flavonoïdes (MARFAK, 2003).

2.4.4. Mécanismes d'action des antioxydants

En règle générale, les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ERO (espèces oxygénées réactives) ou l'effet «scavenger » ;
- La protection des systèmes de défense antioxydants (en majorité des systèmes enzymatiques) ;
- L'inhibition ou activation d'enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO (HALLIWELL, 1994 ; BOUZID *et al*, 2011).

2.5. Activité antimicrobiennes

2.5.1. Introduction

Les substances antibactériennes sont définies comme étant des substances capables de tuer les bactéries ou d'empêcher leur multiplication. L'action antibactérienne dépendra du microorganisme lui-même, de l'agent antibactérien et de l'environnement où se situe l'action. On parlera ainsi d'un effet bactériostatique lorsque la substance antibactérienne empêche la multiplication des bactéries et d'un effet bactéricide lorsqu'elle détruit totalement la bactérie (MEYER et DEIANA, 1988).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (BILLING et SHERMAN, 1998). A titre d'exemple, environ, 95% de souches de *S. aureus* sont résistantes à la pénicilline et dans les pays asiatiques 70-80% de ces mêmes souches sont résistantes à la méticilline (HEMAISWARYA *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont montré que des extraits de plantes utilisées en médecine traditionnelle pourraient fournir des composés agissant sur de nouveaux récepteurs avec un nouveau mécanisme d'action contre les souches pathogènes multirésistantes (CLEMENTS *et al*, 2002 ; BALLELL *et al*, 2005 ; PEREIRA *et al*, 2005).

2.5.2. Les principales substances antimicrobiennes

2.5.2.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances d'origine naturelle, hémi-synthétiques ou synthétiques capables d'inhiber la croissance ou d'entraîner la mort des bactéries. Ils ont une activité sélective et spécifique liée à un mécanisme d'action précis (BRYSKIER, 1999). Ce sont les principales armes médicamenteuses les plus efficaces utilisées contre les infections bactériennes. Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le

mécanisme d'action et le spectre d'action (YALA *et al.*, 2001). La classification des antibiotiques selon leurs mécanismes d'action est cependant la plus répandue.

2.5.2.2. Les composés phénoliques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins ont reçu plus d'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols, à leur capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (DAGLIA, 2011).

Les activités antimicrobiennes de l'oleuropéine, de hydroxytyrosol et de tyrosol et des autres phénols ont été étudiés *in vitro* contre beaucoup de micro-organismes pathogènes : bactéries (*S. aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*), mycoplasmes, champignons, virus et protozoaires (FLEMING *et al.*, 1973 ; FURNERI *et al.*, 2002 ; DEL RIO *et al.*, 2003; WINKELHAUSEN *et al.*, 2005 ; BATTINELLI *et al.*, 2006 ; SOLER-RIVAS *et al.*, 2006 ; SOUSA *et al.*, 2006 ; BAIDEZ *et al.*, 2007).

Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré par KATARZYNA et ses collaborateurs (2007), que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*S. aureus*) (ULANOWSKA *et al.*, 2006).

Comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des plus récentes études sur cette activité est celle d'ORTURNO (2005), qui démontre l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones de *Cirtus paradisi* de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringinine, l'hespéridine, la nobiletine, la simensetine et la tangerétine extraites de ces deux espèces de *Cirtus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *P. digitatum*. (ORTURNO, 2005).

Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certaines sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyvirbio fibrisolvans*, *C. proteoclasterium* (LEITAO, 2005 ; CHATTERJEE *et al.*, 2004), Ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *E. coli*, *S. aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*. L'inhibition bactérienne par les tannins est dépendante de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (SIVAKUMARAN, 2004).

Les tannins condensés comme les hydrolysables, ont une action inhibitrice contre les moisissures et les levures. Comme exemple, on a les proanthocyanidines du thé qui ont montré un rôle dans la protection de cette plante contre *Exobasidium vexans* (PUNYASIRI, 2005), et les tannins hydrolysables des différentes plantes qui agissent contre une large gamme de champignons filamenteux (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum cassis*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*,...) et de levure opportunistes (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus néoformans*...) (LATTE, 2000).

2.5.3. Mode d'action antimicrobien et antivirale des polyphénols

Le mécanisme d'action des polyphénols sur ses agents pathogènes n'est bien connu, les études exploitées par DOMINECO *et al.*, (2005) ont mené à conclure que l'effet antimicrobien des produits polyphénoliques est dû partiellement à 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.

2.5.3.1. Action antimicrobienne

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.

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

Le mécanisme des effets antimicrobiens des flavonoïdes est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on peut citer :

- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique (HILLIARD, 1995) ;
- Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique (TSUCHIYA et IINUMA, 2000) ;
- Séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ;
- Inhibition du métabolisme énergétique microbien (HARAGUCHI *et al.*, 1998).

2.5.3.2. 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 également 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)

I. Matériel et méthodes

La présente étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), laboratoire commun I d'analyse physico-chimique, et laboratoire pédagogique de la microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

I.1. Matériel

I.1.1. 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.1.2. Petit matériel

- bec bunsen, pinces, anse, micropipette..... ;
- verreries de diverses dimensions (erlen Meyer, fioles jaugées, éprouvettes, béchers, entonnoirs, tubes à essai) ;
- Papier filtre, papier Wattman.

I.1.3. Matériel végétal

I.1.3.1. Les feuilles de l'olivier

Les feuilles de l'olivier sont récoltées durant le mois d'avril 2014 dans la région de Tizi-Ouzou (Algérie). Après récolte, les feuilles fraîches ont été transportées au laboratoire dans des sacs en plastiques à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les feuilles de l'olivier ont été intensément nettoyées avec de l'eau distillée et égouttées à l'aide d'un tamis.

La préparation du matériel végétal comprend les étapes suivantes:

- **Séchage** : les feuilles égouttées sont séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière et à une température ambiante pendant 8 jours.
- **Broyage** : les feuilles séchées sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique (*Braun 450 WATT*).
- **Tamisage** : le broyat obtenu est tamisé dans un tamiseur à mains, la poudre résultante est conservée à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement fermés, afin d'extraire les polyphénols totaux (PPT).

I.1.3.2. Les margines

Les margines utilisées sont issues d'une huilerie moderne de la région de Tizi-Ouzou (Oued Aissi) provenant de la campagne 2013. Les margines sont conservées à -22°C.

I.1.4. Les produits utilisés

- **Produits chimiques :**

Tableau IV. Les produits chimiques utilisés dans notre étude.

		Référence	Utilisation
Solvants	n-butanol	Sigma-Aldrich	Extraction des polyphénols
	Diéthyléther		
	Ethanol 96 %		
	Acétate d'éthyle	GPR RECTAPUR	
	n- Hexane	AnalaR NORMAPUR	Dépigmentation et délipidation
	Chloroforme	Scharlau	
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	Sigma-Aldrich	Solubilisation et conservation des extraits
Réactifs	Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich	Dosage des polyphénols
	Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich	
	Acide gallique (AG)	Sigma	
	DPPH [•] 2,2-diphenyl-1picrylhydrazyl	Sigma-Aldrich	Activité antioxydante

- **Composés phénoliques**

Les CP commercialisés utilisés dans la présente étude sont :

- **Acides phénoliques :** AG, AT, acide cinnamique (CIN), acide benzoïque (AB), acide P-coumarique (PQ), AV, et l'AC.
- **Flavonols (flavonoïdes) :** Rutine (R) et la Q

- **Préparation des composés phénoliques standards**

Une concentration de 10 mg/ml de chaque CP est préparée dans 1 ml de DMSO. Puis, ces solutions ont été bien agitées à l'aide d'un vortex jusqu'à dissolution complète.

- **Les milieux de cultures**

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

- Gélose Mueller Hinton (MH) (CONDA);
- Bouillon Mueller Hinton (CONDA);
- Agar-Agar (CONDA);
- Bouillon nutritive N 1 (Fluka Biochemika).

I.1.5. Les souches bactériennes utilisées

Les souches utilisées dans notre étude microbiologique sont des souches de référence sauf *Proteus sp.*

Tableau V. Les souches bactériennes utilisées dans notre étude microbiologique.

Groupes	Souches	Codes
Bactéries à Gram positif	<i>S. aureus</i>	ATCC 43300
	<i>S. aureus</i>	ATCC 25923
	<i>B. stearotherophilus</i>	ATCC 10149
	<i>B. megaterium</i>	ATCC 9885
	<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>B. thermosphacta</i>	CIP 103251
Bactéries à Gram négatif	<i>E. coli</i>	ATCC 25322
	<i>Proteus sp</i>	
	<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>P. marginalis</i>	DSM 13124

I.2. Méthodes

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

I.2.1.1. Feuilles de l'olivier

I.2.1.1.1. Préparation des extraits bruts aqueux

Une quantité de 1 g de poudre de feuilles de l'olivier est mélangé avec 30 ml d'eau distillée, ce volume est placé sous une agitation magnétique à plaque chauffante pendant 3h à une température de 40°C contrôlée par un thermomètre. Une filtration est effectuée. Ce procédé est décrit par le schéma représenté par la figure 12.

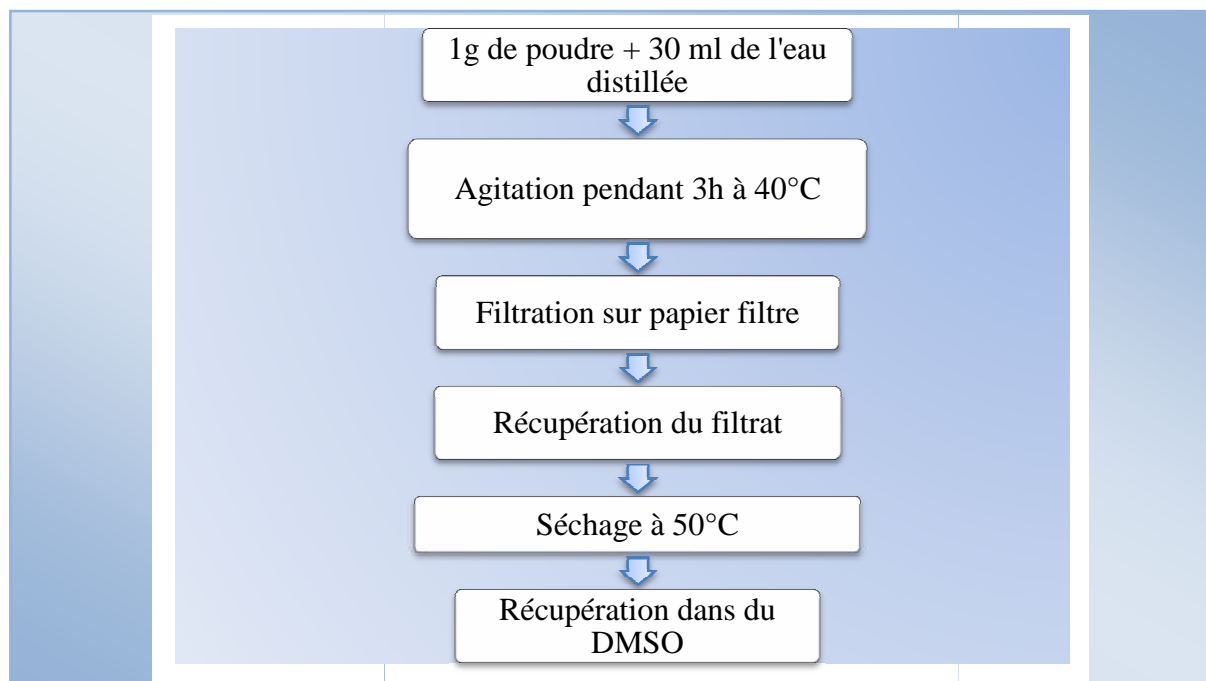


Figure 12. Protocole d'obtention des extraits aqueux.

Avec la même procédure, deux autres extraits sont préparés dans des conditions de températures différentes : l'un à 100°C pendant 3 h et l'autre à température ambiante. Des solutions aqueuses des extraits bruts sont obtenues, puis séchées à 50°C. Les extraits secs sont récupérés dans un minimum de volume du DMSO. Ils sont ensuite 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.

I.2.1.1.2. Préparation des extraits organiques (éthanol, butanol et acétate d'éthyle)

- **Extraction sans délipidation et dépigmentation**

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 de 250 ml sous une agitation magnétique pendant 2h à température ambiante. Une centrifugation est effectuée à 5000g/5 min à 4°C, le surnageant récupéré est séché à 40°C. Après évaporation du solvant, l'extrait sec résultant est reconstitué dans du DMSO (figure 13).

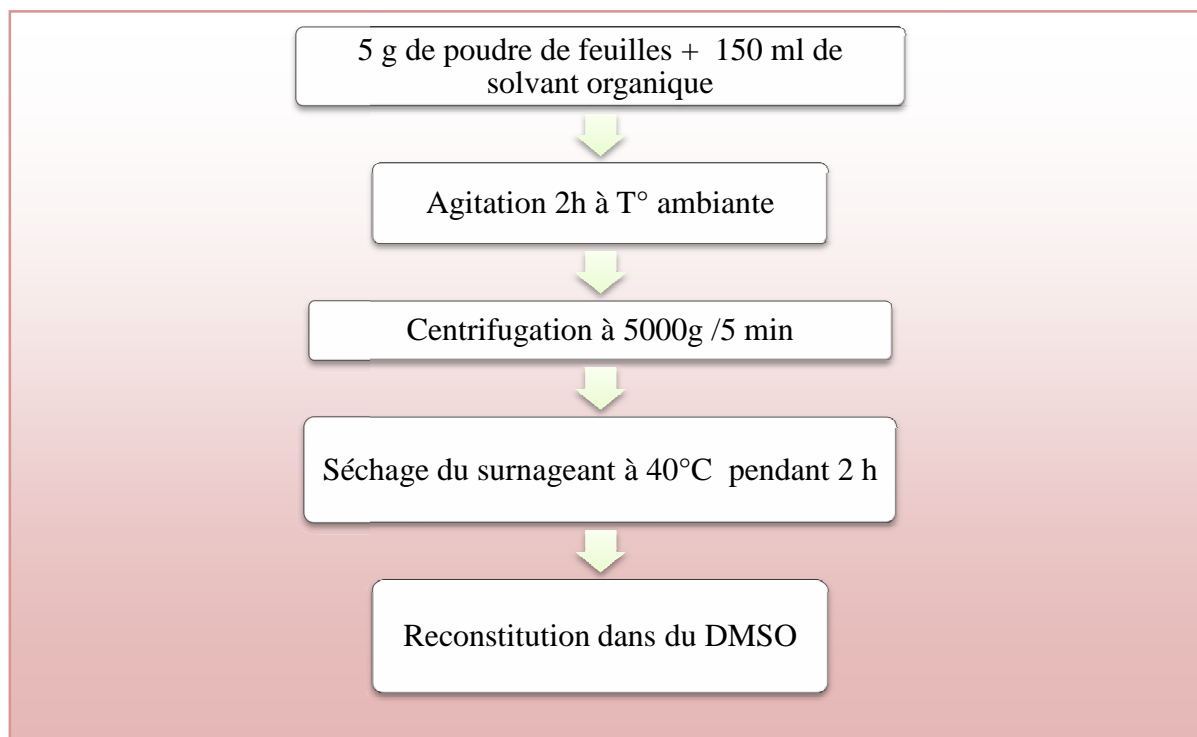


Figure 13. Protocole d'extraction des composés phénoliques par les solvants organiques

- **Extraction avec dépigmentation et délipidation**

La poudre des feuilles est traitée avec plusieurs lavages à l'hexane, afin d'éliminer toutes traces de composés apolaires (pigments, lipides, etc.). Entre chaque lavage le mélange est agité pendant 2h et centrifugé afin d'éliminer la phase organique. La phase solide subit un deuxième traitement au chloroforme puis une agitation pendant 2h et une centrifugation. Pour la dernière étape, la phase solide est subdivisée en 3 fractions et sont ensuite traitées par les solvants suivants :

- Ethanol pour la 1^{ère} fraction ;
- Butanol pour la 2^{ème} fraction ;
- Acétate d'éthyle pour la 3^{ème} fraction.

Chaque mélange est agité pendant 2h à température ambiante et est ensuite centrifugé à une vitesse de rotation de 5000g/5 minutes. La phase liquide organique est récupérée et séchée à 40°C (figure 14).

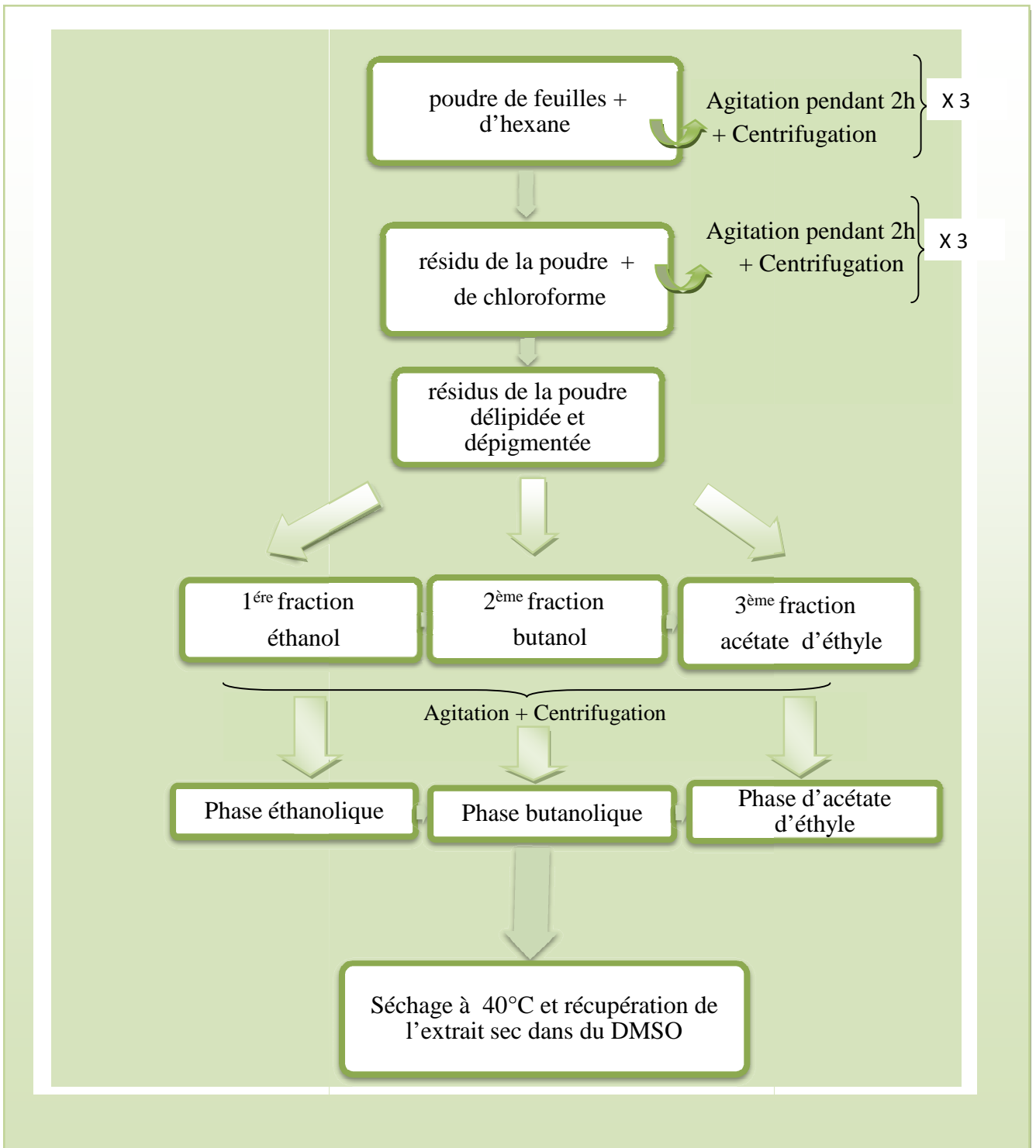


Figure 14. Protocole d'extraction des polyphénols des feuilles après délipidation et dépigmentation.

I.2.1.2. Les margines

✓ Préparation des extraits organiques (butanol, acétate d'éthyle et diéthyle éther)

• Extraction sans délipidation et dépigmentation

Un volume de margines est additionné de solvant (v/v), le mélange est ensuite disposé dans un bécher sous une agitation magnétique pendant 2h à température ambiante. L'ensemble est centrifugé à 4°C, à une vitesse de 5000trs/5min. Des lavages répétés sont conduits dans les mêmes conditions et les mêmes volumes. Après la centrifugation le mélange est complètement séparé en deux phases : le solvant riche en polyphénols (surnageant) et les margines (résidus). Le surnageant (S1) est récupéré et séché à 40°C jusqu'à évaporation du solvant. L'extrait sec est récupéré dans un minimum du DMSO.

• Extraction à partir des résidus de margines issus des premières extractions

Les résidus issus de la première extraction à l'acétate d'éthyle, butanol et diéthyle éther sont remis en suspension respectivement dans du butanol, l'acétate d'éthyle et butanol et sont à nouveau agités, centrifugés comme précédemment. Les surnageants (S2E1) (S2E2) et (S2E3), sont séchés et les résidus secs sont reconstitués dans le DMSO (figure 15).

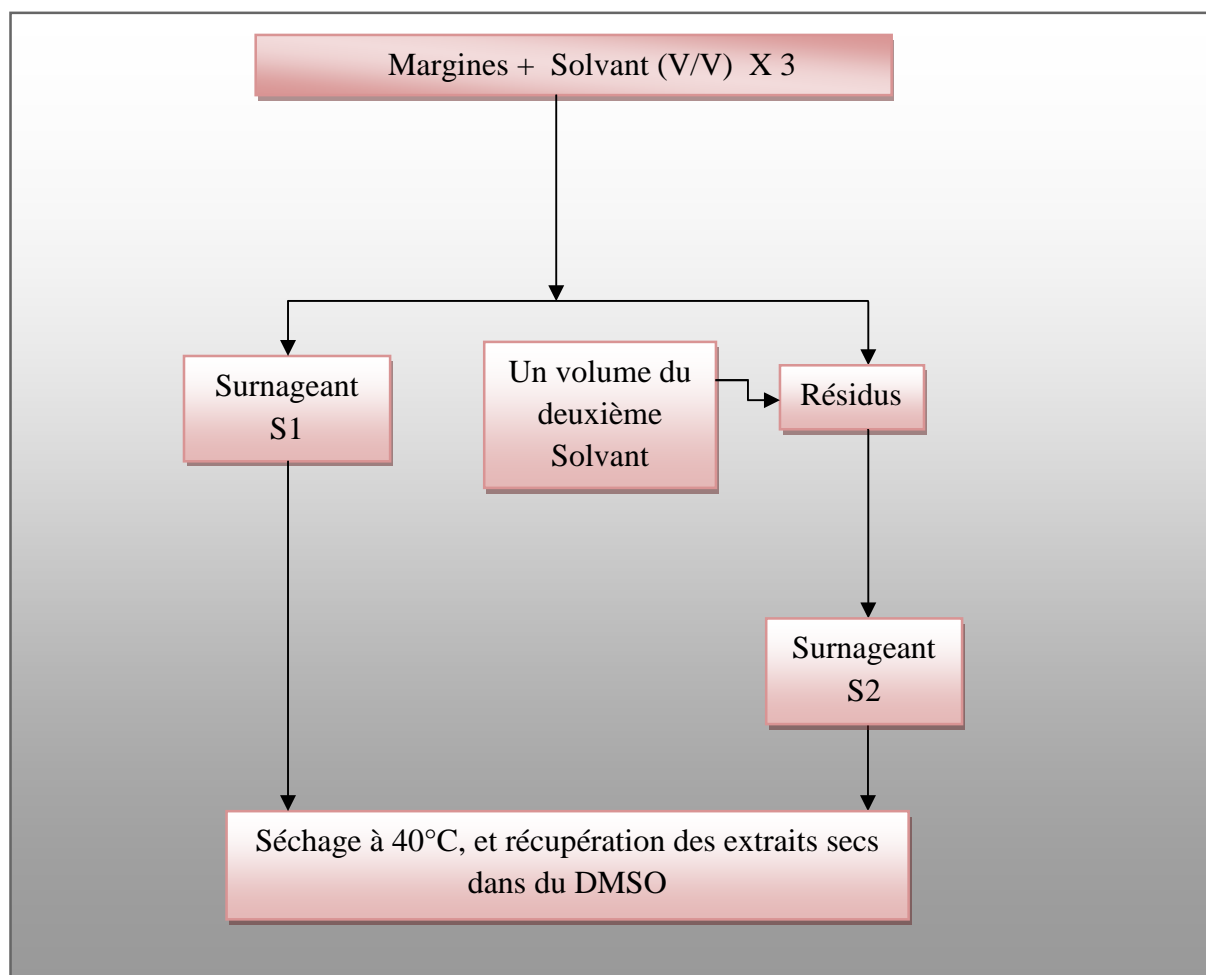


Figure15. Protocole d'extraction des polyphénols des margines.

• **Extrait d'acétate d'éthyle et du butanol après délipidation et dépigmentation**

Un volume de margines est additionné à volume d'hexane. Le mélange est ensuite soumis à une agitation magnétique pendant 2h à température ambiante. Après l'agitation, l'ensemble est centrifugé à température 4°C, à une vitesse de 5000g/5min. Par suite à la centrifugation le mélange est complètement séparé en deux phases : l'Hexane riche en (lipides, pigments..., etc) (surnageant) et les margines. Les résidus d'hexane sont traités par l'acétate d'éthyle (E4) suivi du butanol (E5).

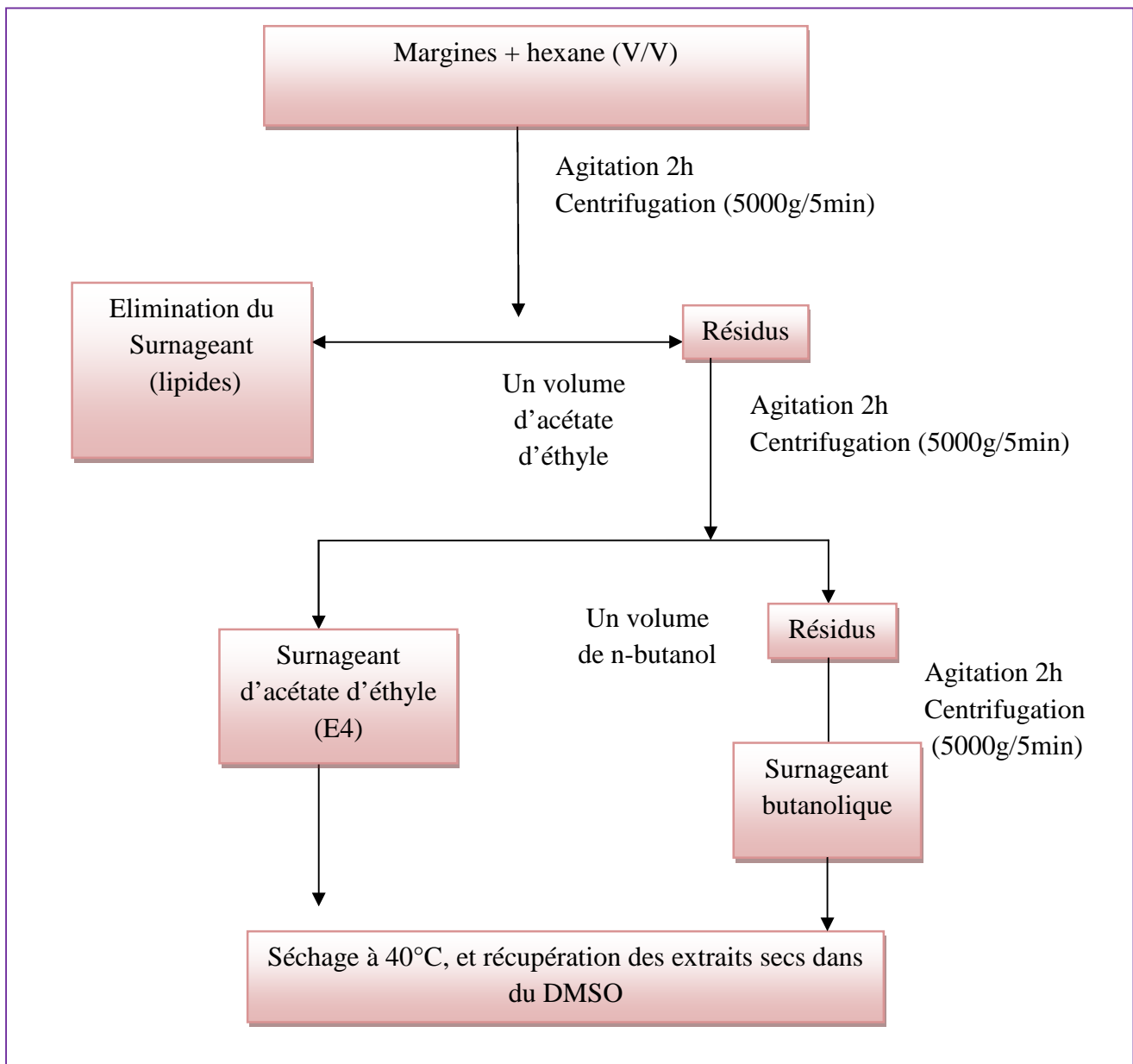


Figure 16. Protocole d'extraction des polyphénols des margines après délipidation.

I.2.2. Analyse quantitative des échantillons

I.2.2.1. Rendement d'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.

I.2.2.2. Teneur en eau et en matière sèche (MS)

La matière sèche (MS) est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines (AISSAM, 2003). Elle est déterminée selon le protocole suivant :

Après avoir tarer une capsule en porcelaine vide, introduire 10 ml de margines dans cette dernière et pesé l'ensemble. Placer la capsule contenant les margines dans une étuve à 95°C jusqu'à l'obtention d'une masse sèche constante. La teneur en matière sèche est alors calculée selon la formule suivante :

$$MS = (M_2 - M_0) \times 100 / TE$$

- **MS**: Teneur en matière sèches (g/l) ;
- **M₀**: Masse de la capsule vide (g) ;
- **M₂**: Masse de la capsule et des margines après séchage (g) ;
- **TE**: Teneur en eau (%).

La teneur en eau ou humidité, est la proportion effective d'eau contenue dans les margines. Elle est déterminée par la formule suivante:

$$TE = (M_1 - M_2) \times 100 / M_1 - M_0$$

- **TE** : Teneur en eau (%) ;
- **M₁** : Masse de la capsule et les 10 ml de margine avant séchage (g) ;
- **M₀** : Masse de la capsule vide (g).

I.2.2.3. Dosage des phénols totaux des margines et des feuilles de l'olivier

• Principe

L'ensemble des CP est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃) (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.

- **Protocole**

Le dosage des phénols des margines et des feuilles d'olivier illustré par la figure 17, est déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu (rapporté par MACHEIX *et al.*, 1990).

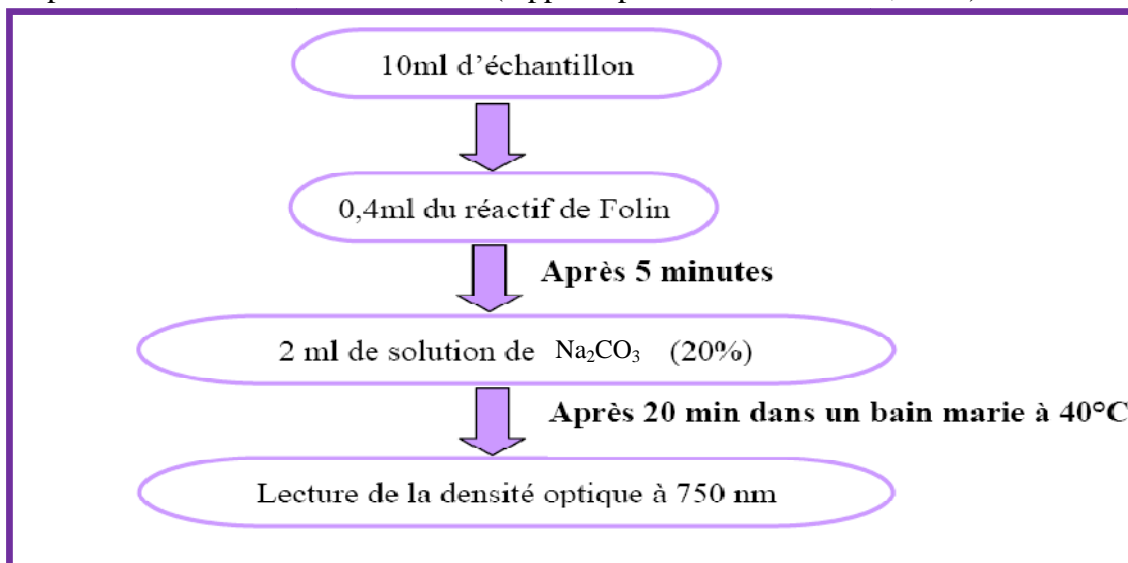


Figure 17. Protocole de dosage des phénols des margines par la méthode de Folin-Ciocalteu (rapporté par MACHEIX *et al.*, 1990).

La gamme étalon est réalisée dans une gamme de 0 à 10 mg/l d'AG. La teneur en phénols totaux des margines est exprimée en équivalent d'AG.

I.2.3. Mise en évidence de l'activité antioxydante

- **Test de piégeage du radical DPPH•**

- **Principe**

Cette méthode utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), un radical libre, coloré, stable, facile à doser et capable d'arracher les atomes hydrogène labiles des groupements OH les plus réactifs, et présentant un maximum d'absorption à 517 nm. En présence d'un antioxydant, le DPPH• est réduit en DPPH et sa réduction se traduit par le passage de la couleur violette de la solution à la couleur jaune. Ceci conduit à la diminution de l'absorbance du radical libre à 517nm. La structure ainsi que la réaction impliquant le DPPH• se résume dans la figure 18 de la façon suivante :

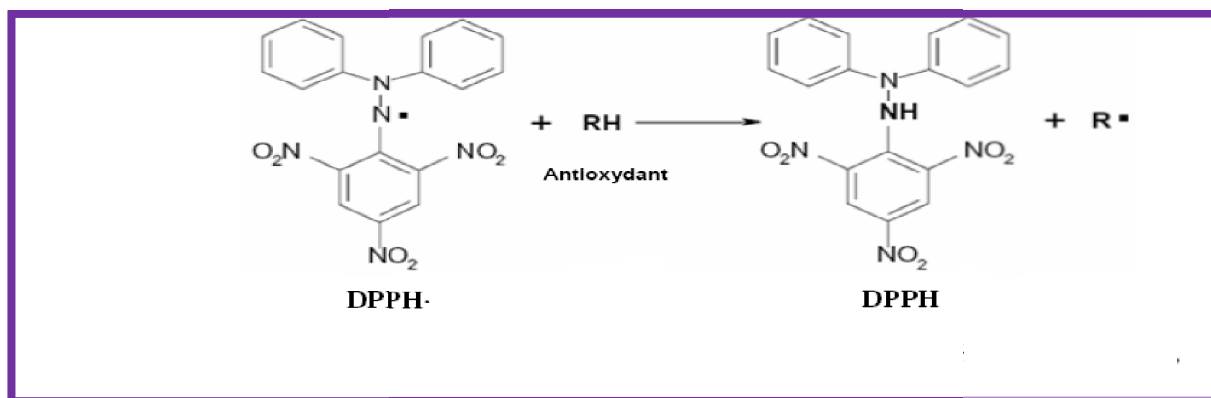


Figure 18. Structure du DPPH• et sa réduction par l'antioxydant RH (PAIXAO *et al.*, 2007).

- **Protocole expérimental**

La capacité de piégeage du DPPH• est déterminée suivant la méthode décrite par BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995. Brièvement, 2 ml d'une solution de DPPH•, 0,1mM dans de l'éthanol, sont rajoutées à 20µl des extraits à tester à différentes concentrations (80 ; 150 et 250 µg/ml). Le mélange est par la suite agité. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH•. L'activité de piégeage du radical DPPH• est calculée en utilisant la formule suivante :

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

Où :

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. Évaluation de l'activité antibactérienne

I.2.4.1. Tests antibactériens

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antibactériens des différents extraits bruts des feuilles de l'olivier, margines, et les CP :

-La méthode de diffusion en milieu gélosé, qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne ;

-La méthode de micro-dilution, qui a pour objectif la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture.

- **Préparation des pré-cultures**

A partir des milieux de conservation des souches de référence, des repiquages successifs sont effectués. Ces derniers sont réalisés sur des boites de gélose nutritive (ensemencement par stries) après revivification dans des bouillons de culture à 37°C/24h, (57°C/24h pour *B. stearothermophilus* ATCC 10149).

- **Préparation de la suspension bactérienne**

A partir de la culture bactérienne jeune, quelques colonies sont prélevées est remises en suspensions dans de l'eau physiologique stérile. Une agitation est ensuite effectuée au vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à 10⁶ UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm.

Selon Mac Farland, on admet une densité optique (DO) comprise entre 0,08-0,1 correspond à une concentration de 10⁷ à 10⁸ germes/ml, la suspension d'inoculum est diluée à 1/10 pour avoir une concentration de 10⁶ germes/ml.

I.2.4.1.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé

- **Test de sensibilité aux extraits bruts, et aux composés phénoliques**

- **Ensemencement et dépôt des disques**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boites Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est Frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries

serrées. L'écouvillon est rechargé à chaque fois pour ensemer une nouvelle boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits ou de CP sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C (57°C/24h pour *B. stearothermophilus* ATCC 10149).

- **Lecture des résultats**

La lecture a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions autour les disques. Chaque essai a été réalisé trois fois et les valeurs ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart type. 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.2.4.1.2. Détermination des paramètres d'inhibition: CMI, CMB

La CMI a été déterminée seulement pour les extraits et les CP les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide.

- **Méthode de dilution en milieu liquide (micro-méthode avec des cupules)**

- ✓ **Mode opératoire**

Une progression géométrique de raison 1/2 des concentrations de CP, d'extraits de margines et feuilles de l'olivier (tableau VI) a été réalisée dans 100 µl de bouillon Müller Hinton (BMH) contenu dans les puits de microplaques. Un volume d'inoculum de 10⁶ UFC /ml a été par la suite ensemené. Les témoins sont réalisés comme suit :

- Témoin négatif : extrait brut + milieu de culture ;
- Témoin positif : inoculum bactérien + milieu de culture.

Les microplaques ont été incubées pendant 24h à 37 °C à l'exception de *B. stearothermophilus* ATCC10149 qui a été incubées à 57°C/24h. 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 VI. Tableau représentant les dilutions réalisées pour la détermination des CMI.

Rapport de dilution Extrait brut ou CP/BMH	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
%	50	25	12,5	6,25	3,12	1,5	0,78	0,4

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.

- **Rapport CMB/CMI**

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).

I.2.5. Etude statistique

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel statistique Stat Box V 6,6. Quelques expériences ont été faites en double et d'autres en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (n= 2 ou 3) pour chaque cas. La différence entre les extraits et les contrôles et la détermination des taux de signification sont effectués par test ANOVA. Les différences ont été considérées significatives à $P < 0,05$.

II. Résultats et Discussion

2.1. Le 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 des extraits bruts aqueux à différentes températures et les extraits organiques des feuilles de l'olivier sont consignés dans le tableau ci-dessous, les valeurs sont la moyenne de deux mesures \pm écartype.

L'analyse de la figure 19 montre que les rendements d'extraction varient en fonction du solvant organique utilisé pour les extraits organiques et en fonction de la température pour les extraits aqueux.

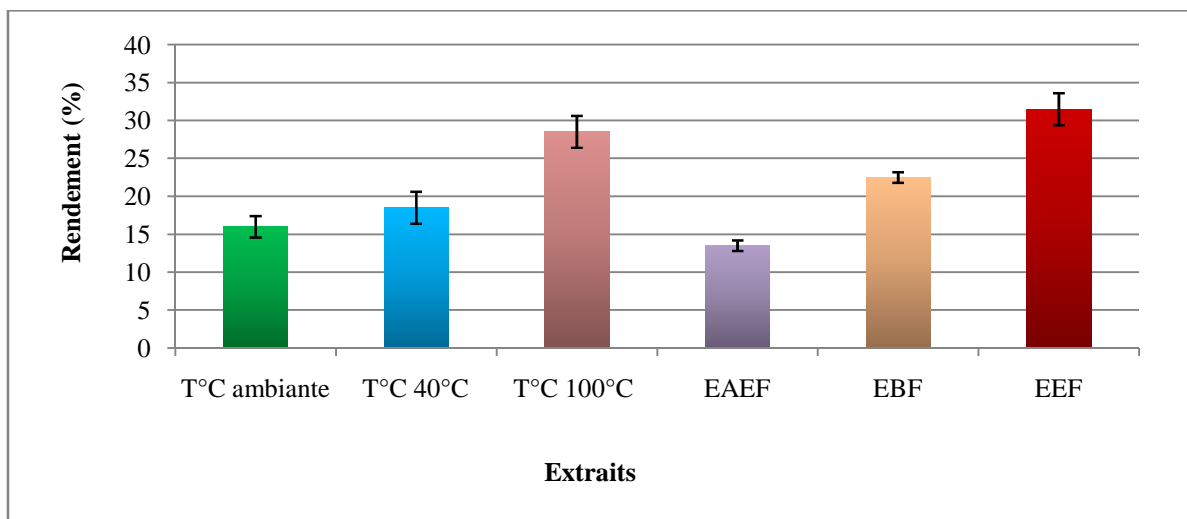


Figure 19. Rendement en (%) des extraits bruts des feuilles de l'olivier (variété *Chamlal*).

EAEF : extrait de feuilles à l'acétate d'éthyle ;

EBF : extrait de feuilles au butanol ;

EEF : extrait de feuilles à l'éthanol.

Les résultats obtenus révèlent que le rendement en PPT de l'extrait aqueux à 100°C des feuilles de l'olivier ($28,5 \pm 2,12$ %) est nettement supérieur à celui de l'extrait aqueux à 40°C ($18,5 \pm 2,12$ %) et de l'extrait à température ambiante ($16 \pm 1,41$ %). 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).

Les résultats de l'analyse statistique, montrent qu'il y a une différence très hautement significative entre les valeurs des rendements obtenus, mais ils existent à l'intérieur des groupes homogènes, comme celle trouvée pour l'extrait aqueux à T°C ambiante et à 40°C.

Par ailleurs, l'EEF représente le meilleur rendement d'extraction avec un pourcentage de $(31,5 \pm 2,12)$ % pour les extraits organiques que ceux obtenus pour l'EBF avec $(22,5 \pm 0,70)$ % et à l'EAEF qui est de $(13,5 \pm 0,70)$ %.

Des études ont rapporté 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 leur diffusion des 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).

2.2. La teneur en matière sèche

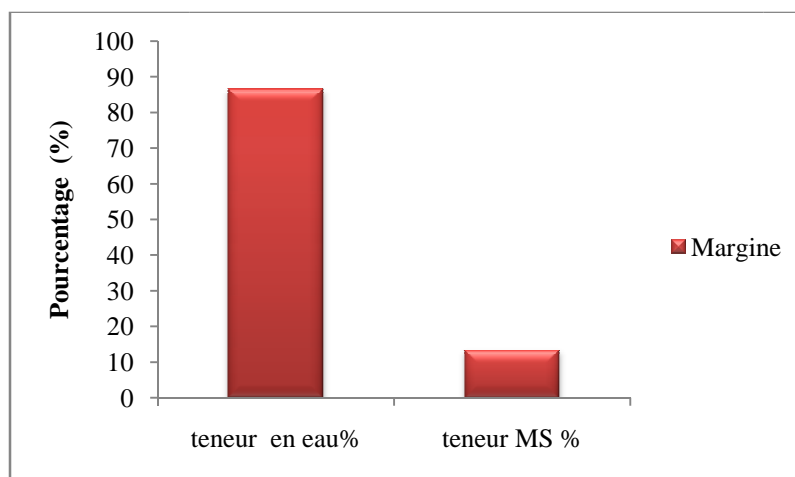


Figure 20. Teneur en eau et en matière sèche des margines.

D'après l'histogramme représenté dans la figure 20, la teneur en MS est de l'ordre de 1,37 g/10 ml (137 g/l) pour les margines issues d'une huilerie moderne qui utilise le système d'extraction à trois phases. Cette teneur est proche de celle trouvée par STAMATAKIS en 2010 pour les margines traditionnelles grecques qui était de l'ordre de 129,7 g/l et celle trouvée par GONÇALVES *et al.* (2011), pour les margines traditionnelles portugaises de la région de Amarante qu'est de l'ordre de 124,6 g/l.

On comparant les résultats part apport aux margines issues des huileries modernes, la valeur trouvée est très loin de celles trouvées par ESRA *et al.* (2001), pour les margines issues d'une huilerie moderne située à Istanbul (Nord-Ouest de la Turquie) laquelle était de l'ordre de $(78,2 \pm 13,6)$ g/l. La teneur en MS est influencée par les procédés d'extraction mis en œuvre, la maturité des olives, les conditions édaphiques (caractéristiques du sol) et climatiques.

2.3. La teneur en eau

Le résultat obtenu pour la teneur en eau est de l'ordre de 86,58 %, il se situe dans l'intervalle de [83-94] % cité par NOUBIH *et al.* (2007) et se rapproche des valeurs trouvées par AIT AMEUR et BOUZIDI (2013) qui sont de l'ordre de $(88,73 \pm 0,21)$ % pour les margines traditionnelles et $(91,95 \pm 0,06)$ % pour les margines modernes. Les taux d'humidité élevés des margines s'expliquent par l'eau existant dans les olives d'une part et d'autre part, par l'eau rajoutée au cours du processus d'extraction de l'huile d'olive (PROCIDA et CECCON, 2006), et le volume de margines varie avec le système d'extraction (HAMDI, 1993).

2.4. Résultats des dosages de polyphénols totaux des extraits des feuilles de l'olivier et les margines

Le dosage des PPT est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est considérée comme la meilleure méthode de 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 qui est souvent coloré sont minimisées à la grande longueur d'onde d'absorption (765 nm) utilisée (HUANG *et al.*, 2005 ; 2013). La figure ci-dessous représente la courbe étalon obtenue.

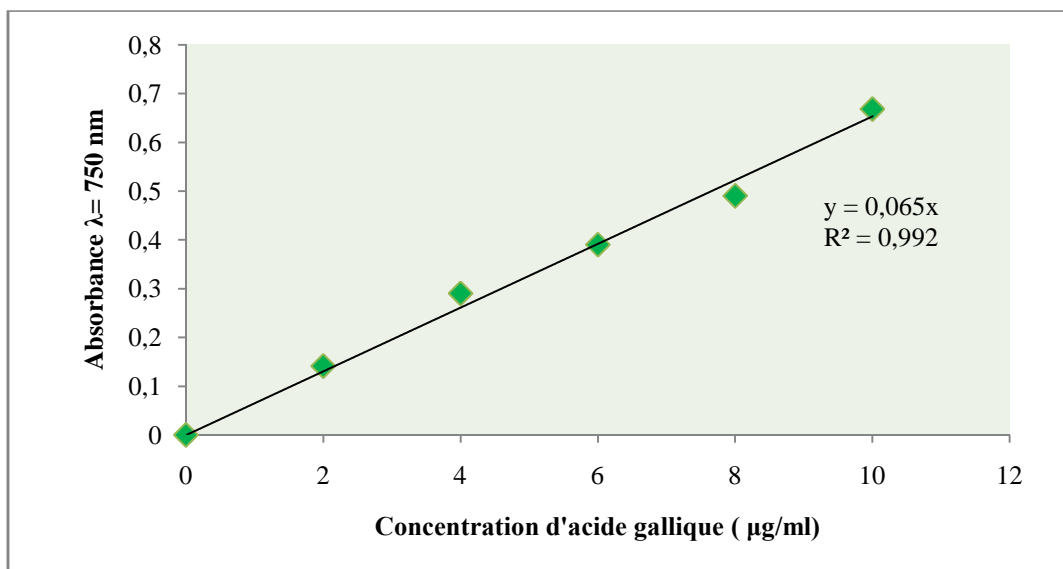


Figure 21. Courbe d'étalonnage établie pour le dosage des polyphénols totaux en équivalent d'acide gallique.

2.4.1. La teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles de l'olivier

La figure 22 représente les Résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits de feuilles de l'olivier (Variété *Chamlal*) exprimés en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g de matériel végétal). Les valeurs sont la moyenne de 3 essais \pm écart type.

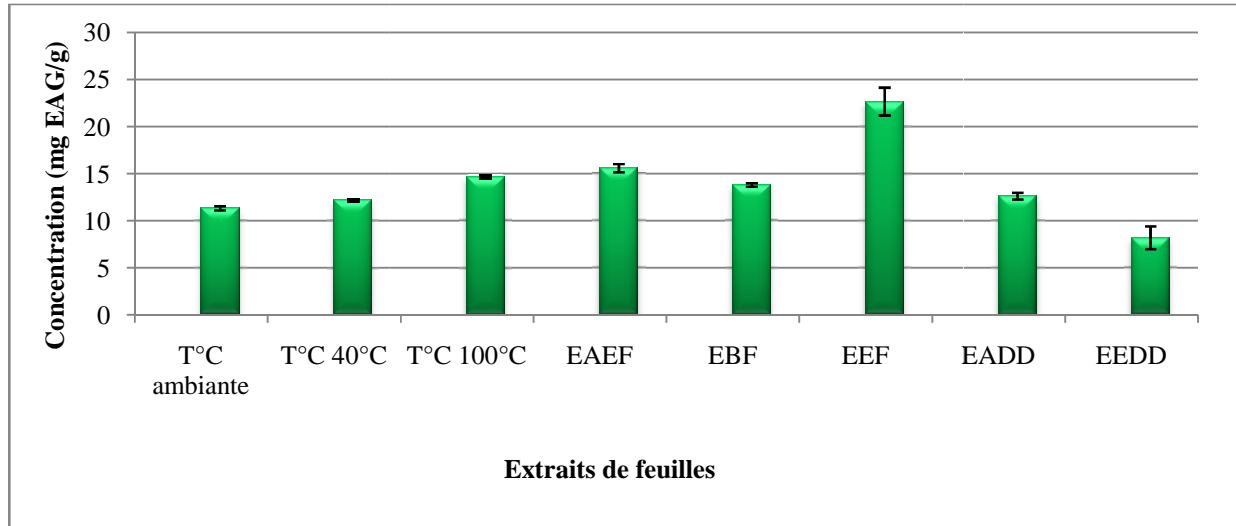


Figure 22. Teneur en polyphénols totaux des extraits de feuilles de l'olivier.

EADD : extrait de feuilles à l'acétate d'éthyle après délipidation et dépigmentation ;

EEDD : extrait de feuilles à l'éthanol après délipidation et dépigmentation.

L'extrait des feuilles constitue la fraction phénolique la plus importante avec l'EEF ($22,67 \pm 1,48$) mg/g suivi par l'EAEF ($15,59 \pm 0,44$) mg/g. La teneur la plus basse a été obtenue avec l'EEDD ($8,20 \pm 1,20$) mg/g.

L'EEF présente une teneur élevée en CP, par contre l'EEDD présente une teneur basse en CP. Ceci indique que l'hexane et le chloroforme ramènent une partie de ces composés et une petite quantité reste dans la dernière fraction éthanolique. Egalement, le même résultat est constaté pour l'EAEF avec et sans traitement par l'hexane et le chloroforme. L'utilisation de l'hexane ou le chloroforme n'augmente pas la concentration des PPT dans l'extrait mais elle permet d'éliminer la fraction lipidique du matériel végétal (MICHAÏLOF *et al.*, 2008).

Les résultats de MOHSEN et AMMAR (2009) ont prouvé que l'éthanol était le meilleur solvant pour l'extraction des CP, suivi du méthanol et en fin de l'eau.

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de la poudre de feuilles selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc permet de séparer ses flavonoïdes selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et triglycosylés).

En comparant nos résultats à ceux obtenus par SENNANI *et al.* (2010), la teneur en polyphénols enregistrée pour l'extrait de feuilles de l'olivier (variété de *Chamlal*) obtenue par la méthode de GARIBOLDI *et al.* (1986) était de l'ordre de ($16,78 \pm 1,02$) mg EAG/g de matériel végétal. Cette teneur est supérieure à celle que nous avons obtenue ($12,63 \pm 0,36$) pour l'EADD. La différence peut être due à l'extraction qui est précédée de la délipidation par le mélange méthanol/eau (80/20, v/v), et la quantité importante de poudre (50 g) utilisée

pour l'extraction des PPT de feuilles de l'olivier. Néanmoins, les résultats du travail effectué par ALMI (2010) ont montré une teneur de 16,78 g/kg de feuilles de l'olivier. Les deux valeurs obtenues par ces deux auteurs sont situées dans la gamme de nos résultats ($8,20 \pm 1,20$) à ($22,67 \pm 1,48$) mg EAG/g de matière végétale.

Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols, 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-phosmolybdénique 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.

La teneur en polyphénols des feuilles de variété *Chamlal* pour l'extrait aqueux à 100°C ($1,466 \pm 0,014$) g/100 g de matière végétale présente presque la même teneur que celles des variétés *Chemlali* et *Chemchali* de Tunisie qui est de l'ordre de 1,40 g/100 g de poudre de feuilles rapportés par BOUDHRIOUA *et al.* (2009). Les feuilles de l'olivier des variétés *Chetoui* et *Zarrazi* de Tunisie présentent une teneur en polyphénols bien supérieure à celles des extraits aqueux et organiques, représentant ($2,32 \pm 0,11$) et ($2,01 \pm 0,16$) g/ 100 g de poudre de feuilles respectivement. Cependant, ces dernières valeurs sont proches de celles obtenues par l'EEF qui représente une teneur de ($2,267 \pm 0,148$) g/100 g de matière végétale.

La différence de teneur en PPT entre nos résultats et celles des autres auteurs pourrait être due aux méthodes d'extractions utilisées, la quantité de poudre et le volume du solvant dans lequel la poudre est macérée.

La variation de la teneur en PPT est souvent considérable, elle est dépendante de plusieurs facteurs : les conditions climatiques et géographiques (VASILEIOS ZIOGAS *et al.*, 2010), les variétés de l'olivier, les conditions de culture et du degré de maturation (BOUDHRIOUA *et al.*, 2009 ; VASILEIOS ZIOGAS *et al.*, 2010), l'état physiologique et l'âge de la plante (DE LEONARDIS *et al.*, 2008).

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

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 (SEIDEL, 2005). 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.

Les teneurs en PPT déterminées ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols du matériel de départ, elles sont en fait, basées sur la capacité réductrice relative à une capacité réductrice équivalente à l'acide gallique. Les valeurs obtenues par la méthode colorimétrique fournissent des informations directes sur la quantité des groupes phénoliques antioxydants de l'extrait qui dépendent essentiellement du nombre des groupes hydroxyles de ces derniers (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

La différence qui existe entre les différents teneurs en PPT obtenues à partir des feuilles de l'olivier est très hautement significative au seuil de 5%. D'une manière générale, on peut dire que le type de solvant influe sur le rendement d'extraction et la teneur en PPT.

2.4.2. La teneur en PPT des extraits de margines

La Figure 23 représente les résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits de margines exprimés en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g) de MS. Les valeurs sont la moyenne de 3 essais \pm écart type.

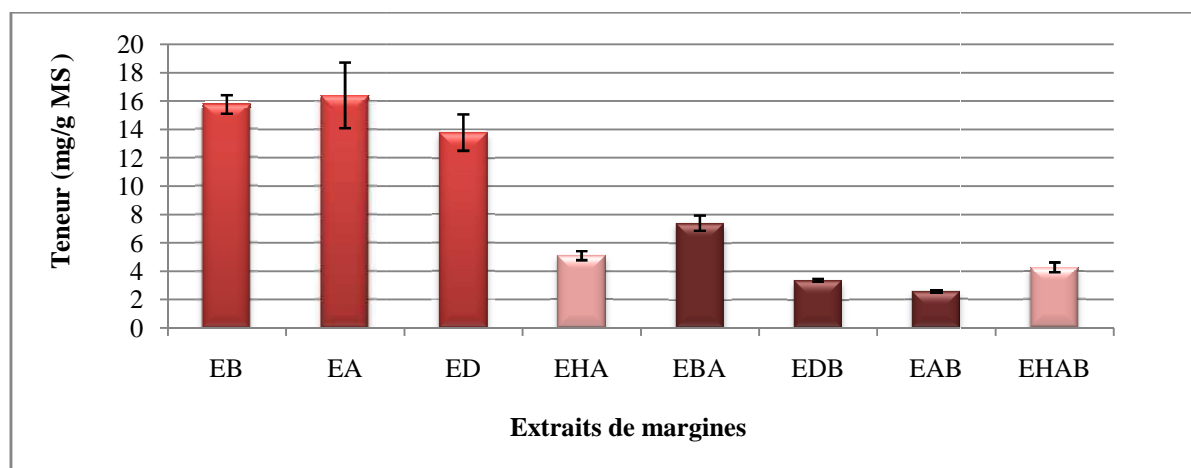


Figure 23. Teneur en polyphénols totaux des extraits de margines.

EA : extrait de margines à l'acétate d'éthyle ; **EB :** extrait des margines au butanol ;

ED : extrait de margines au diéthyle éther ;

EBA : extrait de margines au butanol, puis à l'acétate d'éthyle ;

EDB : extrait de margines au diéthyle éther, puis au butanol ;

EAB : extrait de margines à l'acétate d'éthyle, puis au butanol ;

EHA : extrait de margines à l'acétate d'éthyle, après délipidation ;

EHAB : extrait de margines à l'acétate d'éthyle, puis au butanol, après délipidation.

Concernant les valeurs trouvées, les teneurs les plus élevées en PPT sont obtenues quand l'extraction est réalisée avec un solvant avec plusieurs lavages dans les mêmes conditions. Elles sont respectivement de l'ordre de : (16,4 \pm 2,06) mg EAG/g de MS pour l'EA (2,26 g/l), (15,76 \pm 0,65) mg EAG/g de MS pour l'EB soit (2,17 g/l) et de (13,78 \pm 1,28) mg EAG/g de MS pour le ED (1,9 g/l). Ces teneurs sont nettement supérieures à celles trouvées par KEBBAB (2014) et lesquelles sont de l'ordre de (3,64 \pm 0,58) ; (12,6 \pm 0,26) et (5,22 \pm 0,69) mg /g de MS respectivement pour des extraits étherés, butanolique et d'acétate d'éthyle. Ces valeurs sont aussi supérieures à celles des margines marocaines de la région de Marrakech rapportées par EL HADJOUJI *et al.* (2008), qui sont de l'ordre de (0,79 \pm 0,11) g/l. Elles sont très loin de celles trouvées par SIFOUNE, (2008) pour les margines algériennes, par ENA *et al.* (2007), pour les margines Italiennes, et par Goncalves *et al.* (2011), pour des margines portugaises qui sont respectivement de l'ordre de 5,48 g/l ; 4,36 g/l et de 7,7 g/l.

Par ailleurs, la teneur en CP de margines (provenant d'une huilerie moderne) obtenues par ALMI (2010) qui était de l'ordre de 2,63g/kg est beaucoup plus faible que celles correspondant à nos résultats.

En effet, 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 les margines (VISIOLI *et al.*, 1999 ; BCHERRAWI, 2002).

AIT BADDI *et al.* (2008), ont démontré que l'acétate d'éthyle exerce lui aussi un haut pouvoir d'extraction des polyphénols de margines. Il contribue aussi à l'élimination des fractions protéiques, glucidiques et acides organiques qui peuvent interférer avec l'extrait phénolique.

Pour les autres extraits, l'EBA présente la fraction polyphénolique la plus élevée avec une teneur de $(7,38 \pm 0,54)$ mg EAG/g de MS par rapport celles de l'EDB, EAB avec des teneurs qui sont respectivement de l'ordre $(3,36 \pm 0,1)$, $(2,57 \pm 0,06)$ mg EAG/g de MS. Les résultats de l'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence entre les trois extraits de margines (EA, EB, et ED). Cependant, il y a une différence très hautement significative entre les autres extraits (EBA, EDB, EHA, EAB, EHAB).

L'extraction, successive, avec des solvants dont l'ordre de polarité croissant comme suit : hexane < acétate d'éthyle < n-butanol ; diéthyle éther < n-butanol, a pour but de tester leurs spécificité vis-à-vis de certaines formes phénoliques (polaires ou apolaires, aglycones ou glycosylés). 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 butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycoside et C-glycoside. Alors que le diéthyle éther peut extraire une quantité d'aglycones.

Cette variation de la teneur en PPT des margines dépend de plusieurs facteurs lesquels pourrait être les suivants :

- La différence entre les méthodes utilisées pour extraire les PPT de margines (rapport V/V, type de solvant et le nombre de lavage utilisé ;
- La température des olives avant et durant le broyage influence sur la solubilisation des polyphénols (CAPONIO et CATALANO, 2001) ;
- La variété de l'olivier, les conditions de culture et le degré de maturation des olives (ZIOGAS *et al.*, 2010) ;
- Les procédés technologiques utilisés pour séparer la phase aqueuse (margines) de la phase huileuse ;
- Le procédé de trituration, l'âge des margines, le procédé d'extraction et les techniques d'analyse qualitative et quantitative des monomères phénoliques (HAMDI, 1996 ; DE MARCO *et al.*, 2007).

2.5. Résultats de la mise en évidence de l'activité antioxydante

• Test DPPH

Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH•. La réduction de ce radical par un donneur d'atome H venant de l'antioxydant à tester AH conduit à la formation de la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore DPPH-H et au radical A•.



L'activité antioxydante pour les différents extraits de feuilles et des margines est évaluée en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. Ce chromogène violet est facile à utiliser. Il a une grande sensibilité et permet l'analyse rapide de l'activité antioxydante d'un grand nombre d'échantillons donnant des résultats reproductibles (GULÇIN *et al.*, 2010).

2.5.1. Activité antioxydante des extraits de feuilles de l'olivier

Trois extraits de feuilles de l'olivier et de margines sont testés et lesquels sont respectivement (EAEF, EEF, EBF ; EA, EB, ED). Le choix de ces extraits est basé sur leurs teneurs élevés en PPT par rapport aux autres extraits (aqueux et délipidés).

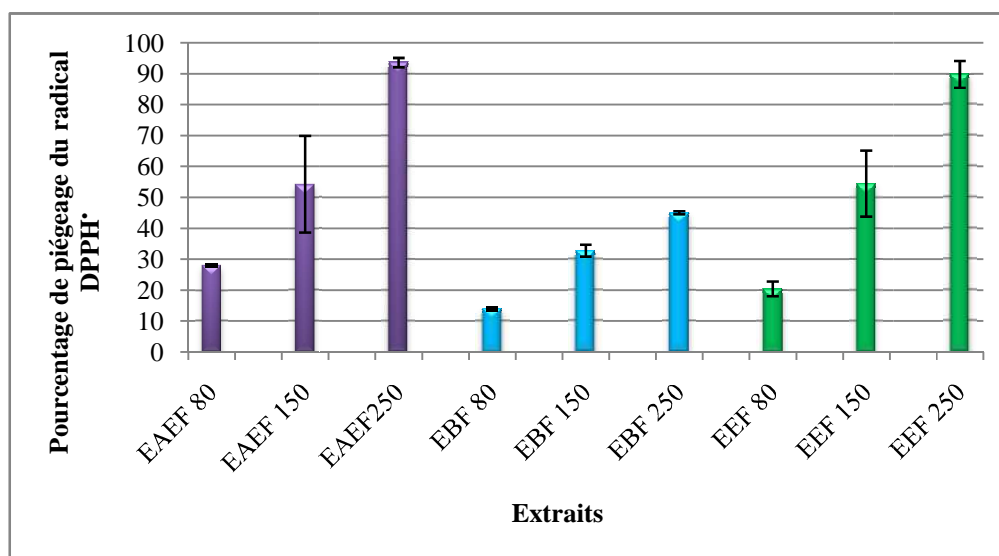


Figure 24. Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits de feuilles de l'olivier. (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm écartype).

Les résultats des pourcentages d'inhibition du radical DPPH obtenus (figure 24) révèlent que les extraits de feuilles de l'olivier possèdent une activité anti-radicalaire dose dépendante. A des fins comparatives, les résultats obtenus avec l'EEF et l'EAEF, ($89,78 \pm 4,36$ %) et ($93,61 \pm 1,50$ %) respectivement, ont montré une activité anti-radicalaire puissante que celle obtenu par l'EBF ($45,05 \pm 0,52$ %) à une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$. D'une manière générale, l'EEF et l'EAEF ont une capacité de piéger le radical DPPH• plus élevés

que celle trouvée par l'EBF. En effet, KANG *et al.* (2003), ont suggéré que les extraits de végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité anti-radicalaire élevée.

D'après les résultats, les feuilles de l'olivier et les margines possèdent un pouvoir antioxydant non négligeable (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 2000 ; SAVOURNIN *et al.*, 2001). Elles peuvent bien être utilisées dans l'industrie alimentaire, cosmétique comme sources intéressantes d'additifs antioxydants. Elles possèdent la plus forte capacité à piéger les radicaux libres par rapport aux différentes parties de l'arbre de l'olivier et présentent aussi une concentration importante en composés 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).

Les conclusions de LEE (2009) sur la particularité de l'effet antioxydant des composés contenus dans les extraits de feuilles de l'olivier, concordent avec ceux de BENAVENTE-GARCIA *et al.* (2000). Ces derniers montrent la richesse des feuilles de l'olivier en CP à effet synergique élevé, comme les oleurosides (oleuropéine et verbascoside), les flavones (lutéoline, diosmétine, apigénin-7-glucose, lutéolin-7-glucose, and diosmétin-7-glucose), les flavonols (rutine), flavan-3-ols (catéchine) et les substitués des phénols (tyrosol, hydroxytyrosol, vanilline, acide vanillique, et acide caféique).

Par ailleurs, 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). Cela est 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).

L'olivier et ses dérivés peuvent être considérés comme une source potentielle d'antioxydants naturels qui peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (SAVARESE *et al.*, 2007). Cependant, le plus important c'est que l'effet antioxydant produit par l'extrait de feuilles de l'olivier est toujours le plus fort grâce à la synergie des flavonoïdes, des phénols et de la richesse en Oleuropéine (RAUWALD *et al.*, 1994).

2.5.2. Activité antioxydante des extraits de margines

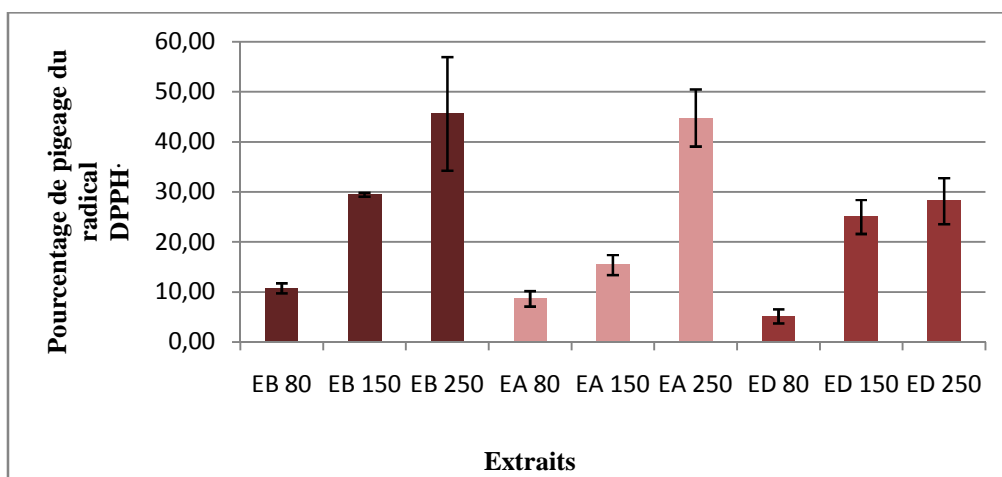


Figure 25. Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits de margines (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm écartype).

A des fins comparatives, l'EB et l'EA ont montrés une activité anti-radicalaire puissante, ($51,04 \pm 3,62$) % et ($44,76 \pm 5,71$) % respectivement, que celle obtenue par l'ED ($34,83 \pm 4,63$) % à une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$. D'une manière générale, l'EB, et l'EA ont une capacité de piéger le radical DPPH plus élevés que celle trouvée pour l'ED.

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

On remarque que la quantité de DPPH \cdot non piégée (résiduel) diminue en fonction des concentrations utilisées. LOZIENE *et al*. (2007), ont rapporté que la concentration en PPT est corrélée significativement avec la capacité antioxydante évaluée généralement par le test de DPPH.

Ces résultats de l'activité antioxydante des extraits phénoliques peuvent s'expliquer par la différence de la composition en polyphénols de ces extraits. En effet, la capacité de réduction des radicaux est largement influencée par la composition phénolique de l'échantillon (YOU-CHENG HSEU *et al.*, 2008).

Selon l'analyse statistique, la différence existant entre les pourcentages d'inhibition trouvées pour les extraits de feuilles de l'olivier ainsi que pour les extraits de margines, est hautement significative au seuil 5%. Cependant, à l'intérieur des tests, se trouvent des groupes homogènes comme pour (EEF et EBF ; EBF, EEF ; EEF, EBF, et EAEF) respectivement à des concentrations de 250, 150 et 80 $\mu\text{g/ml}$; et (EB, EA ; EB, ED ; EB, EA) respectivement a des concentrations de 250, 150 et 80 $\mu\text{g/ml}$.

2.6. Résultats de l'activité antibactérienne : Méthode de diffusion sur l'agar

L'activité antibactérienne des extraits bruts (feuilles de l'olivier, margines) et des CP a été évaluée dans cette étude par la technique de diffusion sur l'agar (méthodes des disques). Cette méthode permet de tester différents composés contre un seul microorganisme (RIOS et RECIO, 2005). L'activité est étudiée vis-à-vis de dix souches bactériennes après 24 heures d'incubation à une température adéquate pour chaque souche. Le choix des extraits de feuilles

de l'olivier destinés à l'aromatogramme est basé sur leur teneur élevée en PPT par rapport aux autres extraits.

Dans notre étude microbiologique, le choix des bactéries est basé d'une part sur leurs contributions aux plusieurs maladies infectieuses, ce qui constitue un sérieux problème de santé publique en raison de leurs résistances aux antibiotiques habituels et d'autres agents biocides (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus sp*, et *S. aureus*). D'autres parts, certaines d'entre elles, contribuent à des maladies liées à la toxi-infection alimentaire. Par contre, d'autres bactéries ne sont pas considérées comme pathogènes pour l'Homme. Cependant, ces dernières peuvent contaminer des aliments et exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire comme *B. subtilis*. Par ailleurs, certaines provoquent des changements de caractéristiques organoleptiques, par exemple l'altération des produits carnés ou viandes rouges (conditionnées sous-vide et réfrigérées) (GARDNER, 1981). C'est le cas de *B. thermosphacta*. En fin, *P. marginalis* laquelle est une bactérie du sol causant des pourritures douces de tissus végétaux (SMITH *et al.*, 1988).

Par ailleurs, *B. megaterium*, *B. subtilis*, et *B. stearothermophilus* sont des bactéries également testées pour voir l'effet des extraits de feuilles de l'olivier, margines, et les CP commercialisés sur la croissance des bactéries Gram positif et sporulantes.

2.6.1. Tests de sensibilités

Les tests de sensibilité des espèces bactériennes aux extraits et aux CP commercialisés ont été effectués sur milieu solide et les résultats sont consignés dans les tableaux ci-dessous.

2.6.1.1. La sensibilité des bactéries aux extraits de feuilles de l'olivier

Les diamètres des zones d'inhibitions provoquées par les extraits de feuilles de l'olivier sont consignés dans le graphe suivant :

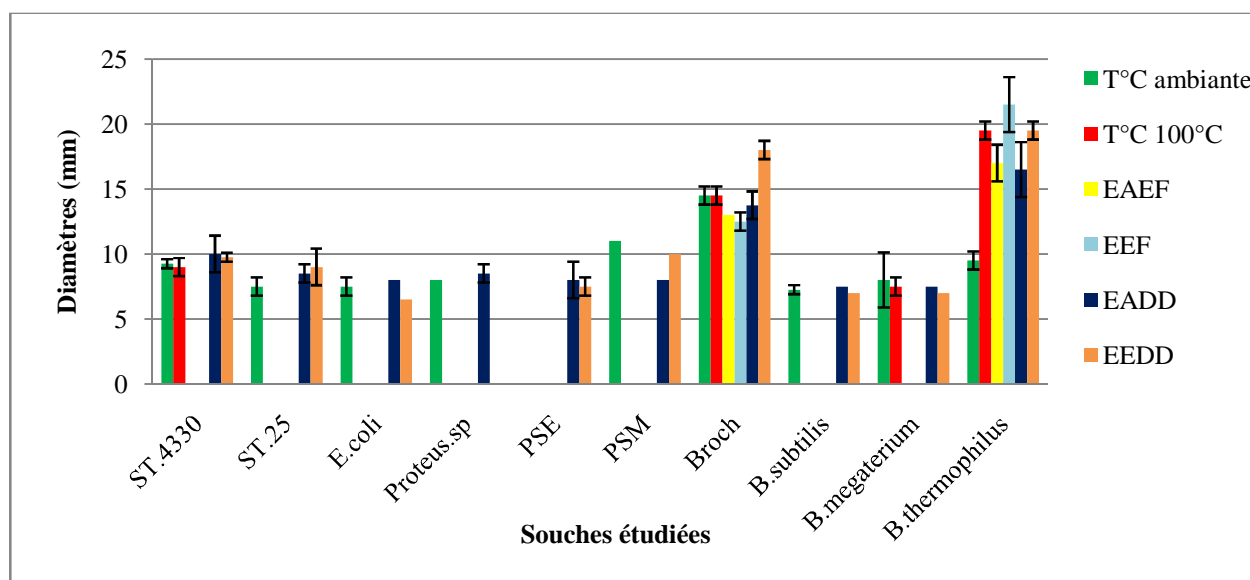


Figure 26. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exercées par les extraits bruts de feuilles de l'olivier.

Tableau VII. Sensibilité des espèces bactériennes aux extraits de feuilles de l'olivier.

Bactéries testées	Extraits bruts					
	T°C ambiante	T°C 100°C	EAEF	EEF	EDDA	EDDE
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	+	+	-	-	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> ATCC 25322	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus sp</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	+	-	-	-	-	+
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	+	+	+	+	+	++
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i> ATCC 9884	-	-	-	-	-	-
<i>B.stearothermophilus</i> ATCC 10149	+	++	++	+++	++	++

Les mesures des halos d'inhibition nous ont permis de classer les bactéries suivant leur degré de sensibilité aux 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).

D'après la figure 26, on remarque que *S. aureus* ATCC 43300 est sensible aux extraits aqueux (T°C ambiante, 100°C) respectivement avec des diamètres d'inhibitions de (9, 25 ± 0,35) et (9 ± 0,70) mm. *B. thermosphacta* CIP 103251 est plus sensible avec un diamètre de (14,5±0,70) mm. Le degré de sensibilité diffère au niveau de *B. stearothermophilus* ATCC 10149, respectivement avec des diamètres de l'ordre de (9,5±0,70) et (19,5±0,70) mm. En plus, l'extrait aqueux à T°C ambiante agit aussi contre *P. marginalis* DSM 13124 avec un diamètre de (11±0) mm (figure 27).

Selon la classification précédente, les bactéries *E. coli* ATCC 25322, *Proteus sp*, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. megaterium* ATCC 9884 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 sont des souches qui représentent des résistances pour tous les extraits de feuilles de l'olivier testés (tableau VII).

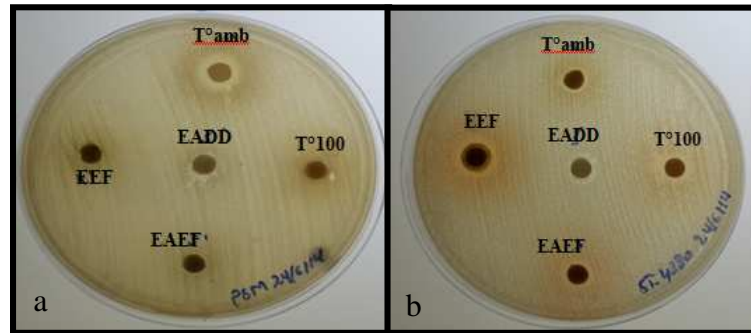


Figure 27. Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les extraits de feuilles de l'olivier contre *P. marginalis* DSM 13124 (a) et *S. aureus* ATCC 43300 (b).

En comparants ces résultats à ceux obtenus par AKROUR et HARANI (2011), l'extrait brut de la variété de *Chamlal* a une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *S.aureus* (15,33 mm) et une faible activité contre *E.coli* (10 mm). Cette différence est due probablement à la diversité des régions de collecte des feuilles, la période, la partie de l'arbre considéré pour leur récolte et l'altitude de la région par rapport au niveau de la mer.

Selon DJENANE *et al.* (2012), ceci est dû également aux facteurs environnementaux tels que la géographie, la température, la longueur du jour, les éléments nutritifs, etc. Influençant sur les voies de biosynthèse de la plante et par conséquent sur la proportion relative des composés principaux caractéristiques. Cela conduit à l'existence de chémotypes différents représentatifs des extraits de différentes origines. Le même auteur a confirmé que les différences de composition chimique des extraits de feuilles de l'olivier sont dues principalement aux variations climatiques, pédologiques et agronomiques dont sont issus les oliviers.

Par rapport aux résultats obtenus par DJENANE et ces collaborateurs en 2012, avec la variété *azarradj*, vis-à-vis de *S. aureus* ($16,33 \pm 1,8$) mm et *P. aeruginosa* ($15,29 \pm 1,9$) mm, nos valeurs sont remarquablement faibles. Ceci pourrait être dû principalement à la différence des variétés utilisées.

En général, les *S. aureus* sont résistants aux extraits naturels des plantes, comme ceux obtenus par KALOUSTIAN *et al.* (2008), qui ont observé une absence d'activité antibactérienne des huiles essentielles de la *lavande* vis-à-vis de la souche *S. aureus*.

Les tests antimicrobiens avec l'EAEF et l'EEF, ont révélé une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de *B. thermosphacta* CIP 103251 respectivement avec des diamètres de 13 ± 0 et $(12,5 \pm 0,70)$ mm. La même observation et aussi notée contre *B. stearothermophilus* ATCC 10149 avec des diamètres de $17 \pm 1,41$ et $21,5 \pm 2,12$ mm respectivement pour les mêmes extraits. Cependant, l'activité vis-à-vis des autres souches est absente.

Les extraits organiques EADD et EEDD ont une activité contre *S. aureus* ATCC 43300, *B. thermosphacta* CIP 103251, et *B. stearothermophilus* ATCC 10149 respectivement avec des diamètres de $(10 \pm 1,41 ; 9,75 \pm 0,35)$ mm, $(13,75 \pm 1,06 ; 18 \pm 0,70)$ mm, et $(16,5 \pm 2,12 ; 19,5 \pm 0,70)$ mm. Notons aussi la particularité pour l'EEDD qui présente le seul extrait actif contre *S. aureus* ATCC 25923.

L'efficacité de l'activité antibactérienne des extraits dans cette étude, pourrait être attribuée à la présence de concentrations élevées en oleuropéine, hydroxytyrosol et verbascoside. Les trois polyphénols sont considérés par plusieurs auteurs comme des antibactériens et antifongiques potentiels (AZIA *et al*, 1998 ; BISIGNANO *et al*, 2000 ; SUDJANA *et al*, 2009).

Généralement les bactéries qui sont résistantes aux extraits de feuilles de l'olivier sont des Gram négatifs. Néanmoins, *B. thermosphacta* CIP 103251 et *B. stearothermophilus* ATCC 10149 (figure 28) présentent les souches les plus sensibles pour tous les extraits respectivement avec des diamètres qui se situent entre $(12,5 \pm 0,70)$ et $(18 \pm 0,70)$ mm, et entre $(9,5 \pm 0,70)$ et $(21,5 \pm 2,12)$ mm.

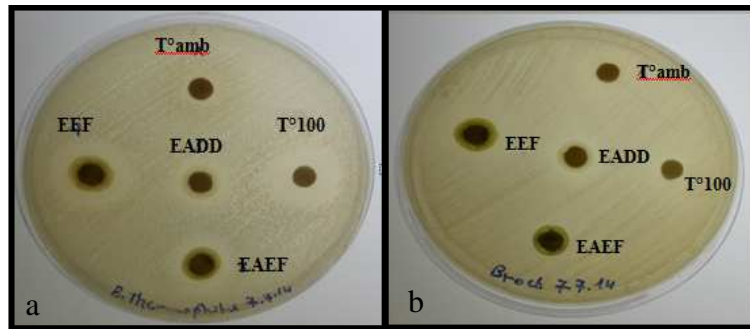


Figure 28. Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les extraits de feuilles de l'olivier contre *B. stearothermophilus* ATCC 10149 (a) et *B. thermosphacta* CIP 103251 (b).

- Bactéries à Gram négatif

D'après les résultats obtenus, on remarque qu'indépendamment de la nature de l'extrait, les bactéries à Gram négatif possèdent une forte résistance. Cette résistance n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leurs membranes externes (imperméable à la plupart des agents biocides) (FAUCHER et AVRIL, 2002).

En ce qui concerne *P. aeruginosa* ATCC 27853, elle est résistante pour tous les extraits de feuilles de l'olivier. Il est connu qu'elle présente des résistances à certains antibiotiques ainsi qu'à une grande variété d'agents chimiques. L'un des mécanismes de résistance est lié à sa capacité de changer de phénotype par mutation (MARTIN *et al.*, 1993). Le deuxième mécanisme pouvant être à l'origine de la résistance aux antibiotiques, consiste au développement chez le pathogène d'un autre moyen de résistance propre et naturelle contre les composants antimicrobiens (STOVER *et al.*, 2000).

Les souches de *P. aeruginosa* se révèlent les plus résistantes, cela est lié à sa grande capacité de développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, d'où son implication fréquente dans les infections hospitalières (MANN *et al.*, 2000). Plusieurs auteurs rapportent la faible sensibilité des souches de *P. aeruginosa* vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (THUILLE *et al*, 2003 ; BOUHDID *et al*, 2006). Pour cela, nous pouvons conclure que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des CP mais aussi de la présence de différents métabolites secondaires.

En fait, la bactérie à Gram négatif possède aussi une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides (LPS) qui forme une barrière imperméable aux composés

hydrophobes (MANN *et al.*, 2000) et limite la diffusion de ces composés (LAMBERT *et al.*, 2001 ; TIAN *et al.*, 2009). En présence d'agents perméabilisants de la membrane externe, des substances inactives contre ces bactéries deviennent actives. En plus, la résistance de ces bactéries peut s'expliquer par la configuration spatiale des molécules qui empêchent les antibactériens de traverser les protéines de transport (porine) de la membrane externe et ne pouvant pas donc atteindre le peptidoglycane de la paroi bactérienne (BOUSSEBOUA, 2001 ; PAGES *et al.*, 2003).

En outre, les activités antimicrobiennes de ces extraits sont difficiles à corrélérer 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).

- Bactéries à Gram positif

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

Des études montrent que l'addition de polyphénols de thé vert (SAKANAKA *et al.*, 2000) à des concentrations de 200 à 800 mg/ml réduit la thermorésistance des spores et des cellules végétatives de *B. stearothermophilus* ATCC 10149 et diminue leur résistance à la chaleur. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus dans la présente étude.

Tableau VIII. Concentrations en polyphénols totaux des extraits de feuilles de l'olivier déposés dans le disque.

Extraits	Concentration en µg/20µl
T°C ambiante	56,61 ± 1,10
T°C 100°C	58,66 ± 0,56
EAEF	98,43 ± 2,78
EEF	131,03 ± 8,56
EADD	252,71 ± 7,21
EEDD	164,10 ± 24,19

Les concentrations représentées ci-dessus, statistiquement, ont montré une différence très hautement significative entre elles au seuil de 5% ; mais l'activité de ces extraits étaient la même avec quelques différences aux niveaux de *S. aureus* ATCC 25923 et *P. marginalis* DSM 13124. Donc, on peut dire que l'activité antibactérienne est dépendante de la sensibilité des bactéries elles mêmes et de la qualité des CP ramenés par les solvants étudiés.

2.6.1.2. La sensibilité des bactéries aux extraits de margines

Les diamètres des zones d'inhibitions provoquées par les extraits de margines sont consignés dans la figure 29.

Tableau IX. Sensibilité des espèces bactériennes aux extraits de margines.

Bactéries testées	Extraits organiques								
	EA	EB	ED	EBA	EDB	EAB	EHA	EHAB	M
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25322	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Proteus sp</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	++	+	+	+	+	+	+	+	++
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	++	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	+++	+++	++	+	+	+	+++	++	+

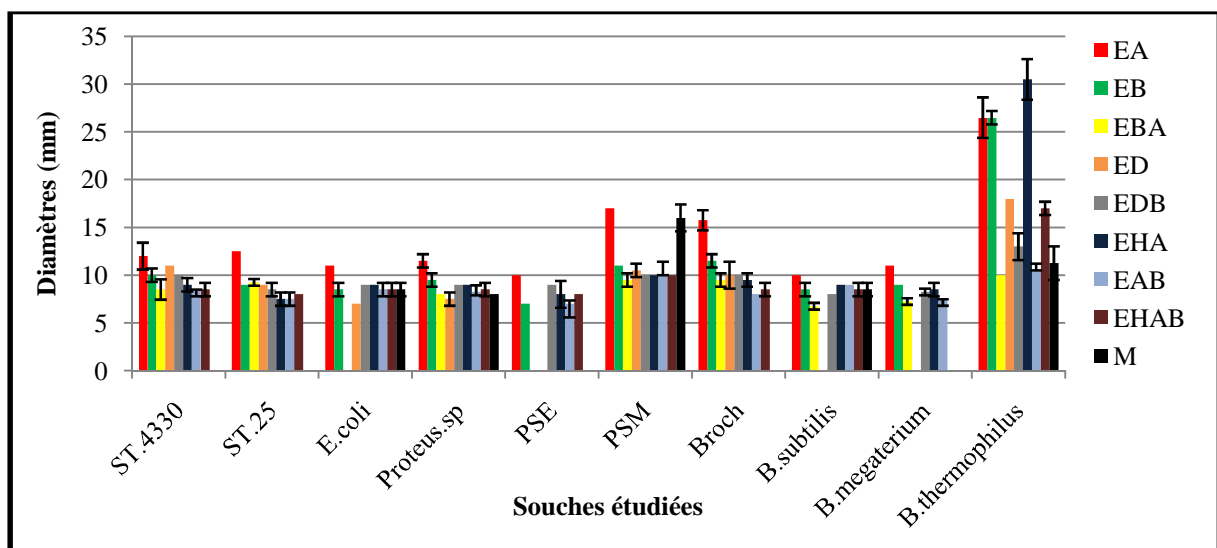


Figure 29. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition provoquées par les extraits de margines.

Tableau X. Concentrations en polyphénols totaux des extraits de margines déposés dans le disque.

Extraits	Concentration en $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$
EB	155,32 \pm 6,33
EA	115,49 \pm 1,24
ED	79,24 \pm 7,34
EHA	46,93 \pm 2,9
EBA	113,12 \pm 8,24
EDB	116,07 \pm 3,52
EAB	59,06 \pm 1,34
EHAB	47,29 \pm 3,78

Selon la classification précédente et par rapport à l'ED, l'EA présente un large spectre d'activité vis-à-vis de toutes les souches bactériennes (Gram positif et Gram négatif) avec des diamètres qui varient de (10 \pm 0) à (26,5 \pm 2,12) mm. L'ED ne présente pas d'activité contre *P. aeruginosa* ATCC 27853 (figure 30), *B. subtilis* ATCC 6633, et *B. megaterium* ATCC 9885. Ce qui nous mène à dire que cette différence de sensibilité des souches pourrait être dose-dépendante, sachant que les concentrations sont respectivement de l'ordre de (115,49 \pm 1,24) ; (79,24 \pm 7,34 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$) pour l'EA, et l'ED. 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 et particulièrement sur les bactéries Gram négatif qui sont résistantes aux extraits de feuilles de l'olivier (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25322, *Proteus sp.*).

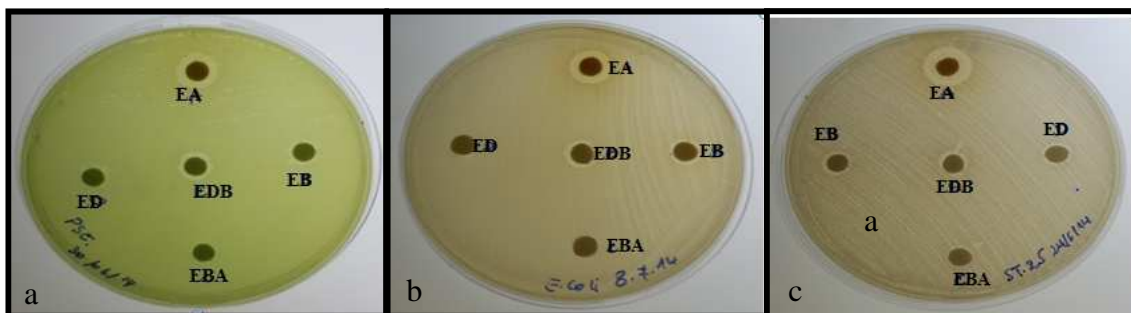


Figure 30. Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les extraits de margines contre *P. aeruginosa* ATCC 27853 (a), *E. coli* ATCC 25322 (b) et *S. aureus* ATCC 25923 (c).

Selon CANDAN et ses collaborateurs (2003), les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'insérer dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

D'après le (figure 29), on remarque que *P. marginalis* DSM 13124 et *B. stearothermophilus* ATCC 10149 sont sensibles pour tous les extraits testés avec des diamètres qui varient respectivement de (9,5±0,70) à (17±0) mm et de (10±0) à (30,5±2,12) mm. A cet effet, on peut dire que la sensibilité de ces deux souches à tous les extraits est dû à la sensibilité de la souche elle-même. Néanmoins, l'EDB est actif contre toutes les bactéries à l'exception des trois bactéries Gram positif *S. aureus* ATCC 25923, *B. megaterium* ATCC 9885 et *B. subtilis* ATCC 6633. Donc on ne peut pas négliger l'efficacité de cet extrait et elle peut être référencier aux concentrations déposées dans le disque (116,07 ± 3,52) µg/20µl et/ou la qualité ciblée en CP. Notons aussi l'activité marquée de l'EB, qui a une concentration très élevée en PPT (155,32 ± 6,33) µg/20µl (tableau X). En effet, ce dernier agit contre toutes les bactéries à l'exception d'*E. coli* ATCC 25322, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *B. subtilis* ATCC 6633.

CHABOT *et al.* (1992), ont rapporté que les composés les moins polaires comme les flavonoïdes manquant pour le groupement hydroxyle sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des microorganismes que ceux portant le groupe OH. D'autre part, MORI *et al.* (1987), ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne.

Concernant les deux extraits après délipidation (EHA, EHAB), ils ont presque la même concentration (groupes homogènes statistiquement). Cependant, l'effet antibactérien de ces derniers diffère. L'EHA agit sur la majorité des bactéries, alors que l'autre agit uniquement sur *P. marginalis* DSM 13124, et *B. stearothermophilus* ATCC 10149 (figure 31). Donc on peut relier cette différence à la qualité des CP ramenés par l'acétate d'éthyle après délipidation qui diffère de celles ramenés par le n-butanol comme un deuxième solvant.

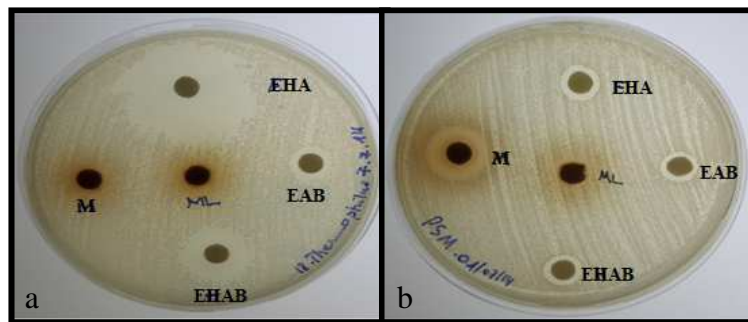


Figure 31. Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les extraits de margines contre *B. stearothermophilus* ATCC 10149 (a) et *P. marginalis* DSM 13124 (b).

En outre, l'EAB, et l'EBA sont des extraits qui ont des activités sur les mêmes souches, avec quelques différences au niveau de *S. aureus* ATCC 25923, *B. thermosphacta* CIP 103251, et *B. subtilis* ATCC 6633. Cependant, il y'a une différence très hautement significative entre les concentrations en PPT des deux extraits, qui sont respectivement de l'ordre de (59,06 ± 1,34) et (113,12 ± 8,24) µg/20µl.

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).

Par ailleurs, concernant les margines testée (M), elles ont une activité uniquement contre *P. marginalis* DSM 13124 et *B. stearothermophilus* ATCC 10149. En effet, les effluent (huilerie d'olive) possèdent un effet antimicrobien (RAMOS-CORMENZANA *et al.*, 1996) lié essentiellement à l'action exercée par les phénols monomériques et les pigments bruns ou catécholmélanique (HAMDI et ELLOUZ, 1993). Ces composés agissent sur les bactéries en dénaturant les protéines cellulaires et en altérant les membranes (RANALLI, 1991).

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

2.6.1.3. La sensibilité des bactéries aux composés phénoliques commercialisés

Les diamètres des zones d'inhibitions provoquées par les CP commercialisés sont consignés dans le graphe 32.

Tableau XI. Sensibilité des espèces bactériennes aux composés phénoliques commercialisés.

Bactéries testées	Composés phénoliques commercialisés								
	R	CIN	V	AB	AC	AT	AG	PC	Q
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	-	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	++	+	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25322	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>Proteus sp</i>	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	-	-	-	-	+	+++	+	+	-
<i>B.thermosphacta</i> CIP 103251	-	-	-	-	-	++	-	+	+
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	-	+	-	-	-	++	-	-	+
<i>B.stearothermophilus</i> ATCC 10149	+	+	-	+	+++	+++	+	+	++

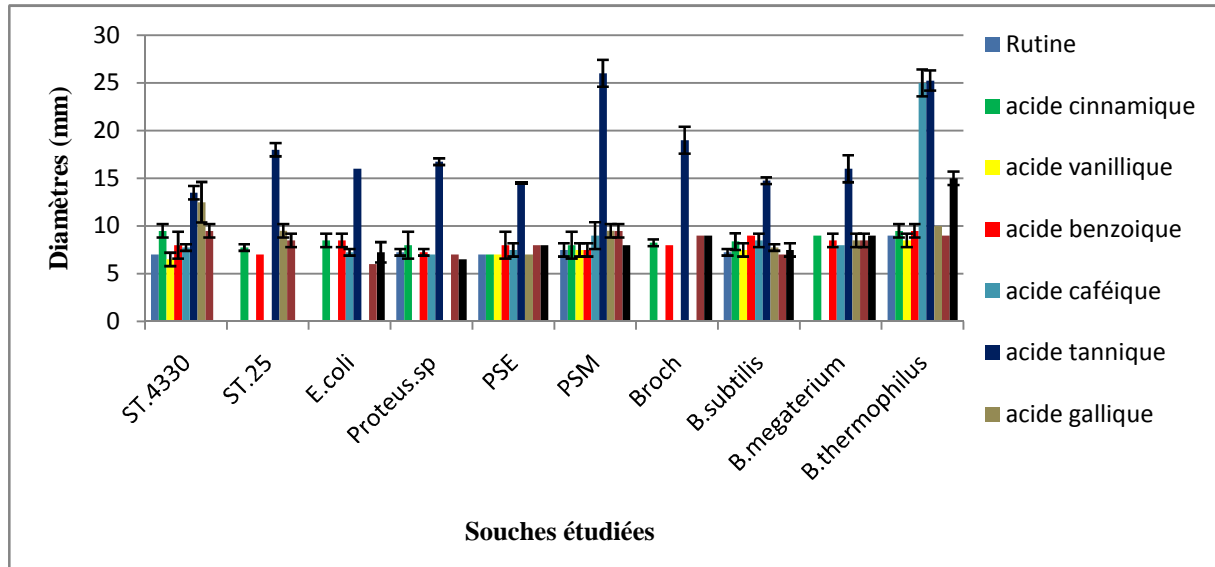


Figure 32. Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition provoquées par les composés phénoliques commercialisés

En comparant les activités antibactériennes des CP commercialisés, on remarque que l'AT exerce un large spectre d'activité car il agit sur toutes les bactéries Gram positif et négatif (figure 33), mais généralement le degré de sensibilité diffère d'un acide à un autre et d'une souche à une autre (tableau XI).

Une forte activité antibactérienne est notée pour l'AT avec des diamètres des zones d'inhibitions supérieures à 13 mm (figure 32), ce qui permet de conclure que ce CP est très actif vis-à-vis de toutes les souches bactériennes. Comparativement aux résultats obtenus par MADJ (2009), l'AT possède un effet considérable et important sur *S. aureus* ATCC 43300 (15 mm), ce qui est en accord avec notre résultat sur la même souche ($13,5 \pm 0,70$) mm. Selon Cueva *et al.* (2010), les acides phénoliques ont une activité antibactérienne contre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, et *B. megaterium*.

Les polyphénols, tel que les tanins et les flavonoïdes, ont une activité antibactérienne importante (MACHADO *et al.*, 2002). 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).

Les tanins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales, dont certaines sont sporogènes, comme *Clostridium aminophilum*, *Butyvirbio fibrisolvans*, *C. proteoclasterium* (CHATTERJEE *et al.*, 2004 ; LEITAO, 2005), ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'Homme : *E. coli*, *S. aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*. L'inhibition bactérienne par les tanins est dépendante de la structure et du degré dépolymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (SIVAKUMARAN, 2004).

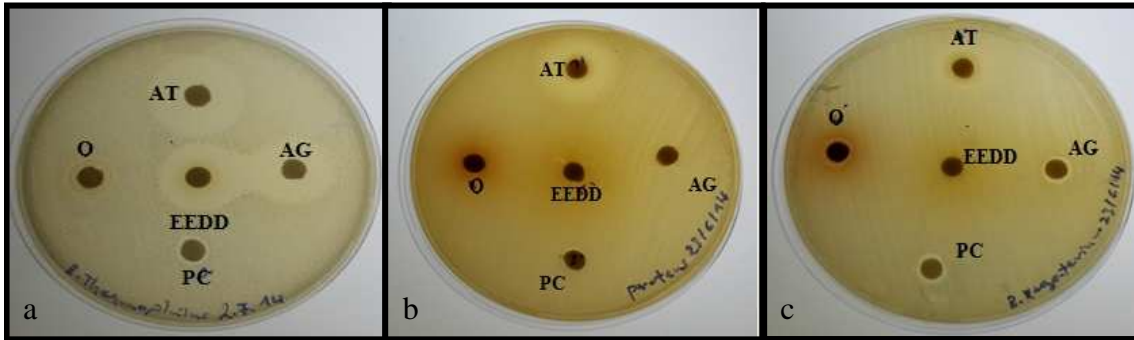


Figure 33. Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les CP commercialisés contre *B. stearotherophilus* ATCC 10149 (a), *Proteus sp* (b), et *B. megaterium* ATCC 9885 (c).

L'AG présente un diamètre assez élevé ($12,5 \pm 2,12$) contre *S. aureus* ATCC 43300 par rapport aux autres souches, malgré sa résistance aux plusieurs antibiotiques (comme la méthicilline). Selon MADI (2009), l'AG est pourvu d'un effet inhibiteur très important vis-à-vis de *S. aureus*, qui présente le diamètre le plus élevé par rapport aux autres CP contre les autres bactéries (*Entérobacter sp*, *E. coli*), ce qui confirme nos résultats.

La sensibilité de la souche *S. aureus* peut s'expliquer par la probabilité de 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).

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

Toutes les bactéries testées révèlent une résistance pour l'AV. La R, l'AB, l'acide CIN, l'AC, et la Q se sont avérés inactifs vis-à-vis de la majorité des souches bactériennes. Cependant, l'acide PC montre une activité contre *S. aureus* ATCC 43300, *P. marginalis* DSM 13124, *B. thermosphacta* CIP 103251, et *B. stearotherophilus* ATCC 10149. Cette dernière été sensibles pour tous les CP à l'exception de l'AV (figure 34).

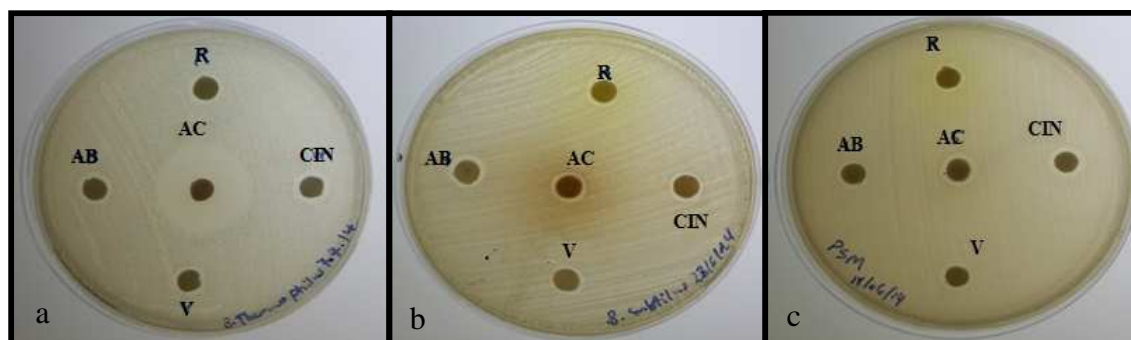


Figure 34. Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les CP commercialisés contre *B. stearothermophilus* ATCC 10149 (a), *B. subtilis* ATCC 6633 (b), et *P. marginalis* DSM 13124 (c).

Selon (LEON *et al.*, 2012), le diamètre d'inhibition provoqué par la Q est de l'ordre de ($8,5 \pm 2,12$) mm contre *E. coli* 81nr.149 SKN541 (bactérie impliquée dans les maladies gastro entériques), ce qui se rapproche de nos résultats ($7,25 \pm 1,06$) mm contre *E. coli* ATCC 25322. En fait COWAN (1999), suppose que les CP sans groupement hydroxyles libres ont une activité antibactérienne plus que ceux qui en sont pourvus. Cela augmente leur affinité chimique à la membrane lipidique microbienne. Le groupement hydroxyle de la Q peut être substitué en position 3 par un sucre qui pourrait justifier la différence de l'activité antibactérienne de ces CP.

Il a été signalé que les flavonones ayant un groupement glycosylé ont aussi montré une activité antimicrobienne, tandis que certaines flavonolignanes n'ont montré aucune activité inhibitrice envers les microorganismes (SANDHAR *et al.*, 2011).

A partir de ces résultats, on peut déduire et confirmer le pouvoir antibactérien des polyphénols, dont les acides phénoliques (principalement c'est l'AT) sont les plus puissants par rapport aux flavonoïdes (Q, et la R sont des flavonols). En outre, 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).

Les résultats obtenus par l'analyse statistique, montrent qu'il ya une différence très hautement significative au seuil de 5% entre les diamètres d'inhibitions, en dépend de deux facteurs : type d'extrait ou CP testé et de la souche utilisée.

- Concentration en CP déposé dans le disque

La même concentration est préparée pour chaque CP commercialisé dans du DMSO. Donc c'est la même concentration qui existe dans le volume déposé par chaque disque ($200\mu\text{g}/20\mu\text{l}$).

Les CP sont produits en réponse à l'infection microbienne par les plantes. Par conséquent, l'efficacité de ces substances évaluées *in vitro* ont montré une action inhibitrice sur les microorganismes.

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir antibactérien n'est pas le même, sachant que la même concentration de chaque CP commercialisé est appliquée pour toutes les

bactéries. En effet, l'inhibition de la croissance dépend de deux facteurs ; la bactérie utilisée, et la nature du CP testé.

2.6.2. Résultats des paramètres d'inhibitions

2.6.2.1. Résultats de l'activité antibactérienne testée par la méthode de micro-dilution en milieu liquide (détermination des CMI)

Nous rapportons dans le (tableau VIII) les CMI de nos extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide, dont les diamètres d'inhibition sont supérieurs à 10 mm (choix arbitraire). Ces CMI sont obtenues par la méthode de microdilution en milieu liquide (Microplaque).

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement au témoin de croissance, il y a une diminution du trouble provoqué par la croissance des bactéries dans les puits au fur et à mesure que la concentration en extrait augmente. Les extraits et les CP commercialisés ont inhibé la croissance des bactéries selon une relation dose-réponse au sein du même extrait ou CP. Cela nous a donc permis de déterminer les différents paramètres antibactériens à savoir la CMI et la CMB.

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

- Les CMI retenues pour les extraits de feuilles de l'olivier et les composés phénoliques commercialisés

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

Tableau XII. Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimées en µg/ml) retenues pour les extraits de feuilles de l'olivier.

Extractions	T°C ambiante	T°C 100°C	EAEF	EEF
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	353,85	NT	NT	NT
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	353,85	366,67	NT	NT
<i>B. thermophilus</i> ATCC 10149	NT	183,33	615,21	1637,96

NT : non testé.

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

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

D'après le tableau XII, l'extrait aqueux à température ambiante inhibe *P. marginalis* DSM 13124 et *B. thermosphacta* CIP 103251 à la même CMI (353,85 µg/ml). De même, l'extrait aqueux à 100°C inhibe *B. thermosphacta* CIP 103251, et *B. stearothermophilus* ATCC 10149 à des CMI de l'ordre de 366,67 ; 183,33 µg/ml, respectivement pour les deux souches. Ces CMI enregistrées pour les deux extraits aqueux possèdent également une forte inhibition. Cependant, l'EAEF inhibe *B. stearothermophilus* ATCC 10149 à une CMI égale à 615,21 µg/ml, donc c'est une inhibition modérée. Tandis que, l'EEF inhibe *B. stearothermophilus* ATCC 10149 à une CMI supérieure à celles obtenues avec les autres extraits (CMI > 1600 µg/ml), c'est de ce fait alors la plus faible inhibition par rapport aux autres extraits. Nous avons comparé nos résultats avec ceux de THUILLE et ses collaborateurs, (2003), lesquels ont déterminé les CMI d'extraits méthanoliques de *Thymus vulgaris* sur sept souches microbiennes, notamment : *S. aureus* ATCC 25923 (2 500 µg/ml), *E. coli* ATCC 25922 (> 5 000 µg/ml). Ils ont enregistré une faible activité par rapport à nos extraits.

Tableau XIII. Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimées en µg/ml) retenues pour les composés phénoliques commercialisés.

Extraits Souches	AT	AG	Q	AC
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	500	62,5	NT	NT
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	250	NT	NT	NT
<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	62,5	NT	NT	NT
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	250	NT	NT	NT
<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	250	NT	NT	NT
<i>B. thermophilus</i> ATCC 10149	500	NT	250	500
<i>E. coli</i> ATCC 25322	250	NT	NT	NT
<i>Proteus. sp</i>	250	NT	NT	NT
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	125	NT	NT	NT
<i>P. marginalis</i> DSM 13124	62,5	NT	NT	NT

Selon la classification précédente, on constate une forte inhibition obtenues avec les CP (CMI ≤ 500 µg/ml) vis-à-vis de toutes les souches bactériennes. Avec une efficacité très marquée de l'AT qui inhibent fortement toutes les bactéries testées (Gram positif, et Gram négatif).

- Les CMI retenues pour les extraits de margines

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

Tableau XIV. Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimées en µg/ml) retenues pour les extraits de margines.

Extraits	Souches	CMI
EA	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	103,55
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	103,55
	<i>E.coli</i> ATCC 25322	103,55
	<i>Proteus sp</i>	103,55
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	51,77
	<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	103,55
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	103,55
	<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	103,55
	<i>P. marginalis</i> DSM 13124	103,55
	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1656,9
EB	<i>B. sterothermophilus</i> ATCC 10149	1941,5
ED	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC10149	495,23
EHA	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	293,36
EHAB	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	73,75

En ce qui concerne les CMI retenues pour les extraits de margines, on remarque que l'EA exerce une forte inhibition vis-à-vis de toutes les souches (CMI < 500 µg/ml) à l'exception de *B. stearothermophilus* ATCC 10149 qui été inhibé à une CMI de 1656,9 µg/ml. C'est alors une faible inhibition. Les autres extraits testés (EB, ED, EHA, et l'EHAB) vis-à-vis de *B. Stearothermophilus* ATCC 10149 exercent aussi une inhibition forte à l'exception de l'EB qui montre une inhibition faible avec une CMI de 1941,5 µg/ml.

L'inhibition de *B. stearothermophilus* ATCC 10149 diffère d'un extrait à un autre concernant l'ED, EHA, EHAB. Les CMI de ces derniers, sont respectivement de 495,23 µg/ml, 293,36 µg/ ml et 73,75 µg/ml). L'inhibition est donc plus forte par rapport à EA et EB dont les CMI sont de l'ordre de 1656,9 µg/ml et de 1941,5 µg/ml respectivement. Dans ce cas l'inhibition est faible.

2.6.2.2. Détermination des CMB et la nature de l'activité antibactérienne

La CMB est déterminée après l'ensemencement des bactéries prélevées à partir des puits où la concentration est supérieure ou égale à la CMI (\geq CMI). Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

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).

- **Les extraits de feuilles de l'olivier et les composés phénoliques testés**

Tableau XV. Les CMB et la nature de l'activité obtenues avec les extraits de feuilles de l'olivier et les composés phénoliques commercialisés.

Extraits	Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
T°C 100°C	<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	1/4	1/4	1	Bactéricide
	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/8	ND	ND	ND
T°C ambiante	<i>P. marginalis</i> DSM 13124	1/4	1/4	1	Bactéricide
	<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	1/4	1/4	1	Bactéricide
EAEF	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/4	ND	ND	ND
EEF	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/2	ND	ND	ND
AT	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	1/2	ND	ND	ND
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1/4	1/4	1	Bactéricide
	<i>E. coli</i> ATCC 25322	1/4	1/2	2	Bactériostatique
	<i>Proteus sp</i>	1/2	ND	ND	ND
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1/8	1/4	2	Bactériostatique
	<i>P. marginalis</i> DSM 13124	1/16	1/16	1	Bactéricide
	<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	1/16	1/16	1	Bactéricide
	<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	1/4	ND	ND	ND
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1/4	ND	ND	ND
	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/2	ND	ND	ND
AG	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	1/16	1/16	1	Bactéricide
Q	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/16	1/16	ND	ND
AC	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/2	ND	ND	ND

ND : non déterminé.

D'après le tableau ci-dessus, l'AT exerce un effet bactéricide contre *S. aureus* ATCC 25923, *P. marginalis* DSM 13124 et *B. thermosphacta* CIP 103251. Par contre, il provoque un effet bactériostatique contre *E. coli* ATCC25322 et *P. aeruginosa* ATCC 27853. L'AG montre également un effet bactéricide contre *S. aureus* ATCC 43300.

Les CMI des extraits de feuilles de l'olivier testés varient de 183,33 à 1637,96 µg/ml et les CMB varient de 353,85 à 366,67µg/ml pour *P. marginalis* DSM 13124, *B. thermosphacta* CIP 103251. Alors que, les CMI, et les CMB des CP varient de 62,5 à 500 µg/ml selon les CP et les souches testées.

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait aqueux à T°C ambiante présente un effet bactéricide contre *P. marginalis* DSM 13124 et *B. thermosphacta* CIP 103251, de même que celle de la T° 100°C qui provoque un effet bactéricide contre *B. thermosphacta* CIP 103251.

D'après HOEKOU *et al.* (2012), L'extrait de feuilles de *Phyllanthus muellerianus* et de *Leptadenia hastata* provoque un effet bactériostatique contre *E. coli*. Néanmoins, les extraits de feuilles de *Pupalial appacea* et de *Byrsocarpus coccineus* présentent également un effet bactériostatique contre *E. coli*, *S. typhi* et *S. enteritidis*.

Selon KAROU (2006), les extraits de feuilles de *Khayasene galensis* exerce un effet bactéricide contre *Sh. dysenteriae*, *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923.

- Les extraits de margines

Tableau XVI. Les CMB et la nature de l'activité obtenues avec les extraits de margines.

Extraits	Souches	CMI	CMB	CMB/CMI	Interprétation
EA	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	1/32	1/32	1	Bactéricide
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1/32	1/2	16	Bactériostatique
	<i>E. coli</i> ATCC 25322	1/32	1/16	2	Bactériostatique
	<i>Proteus sp</i>	1/32	1/2	16	Bactériostatique
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1/64	1/32	2	Bactériostatique
	<i>B. megaterium</i> ATCC 9885	1/32	1/32	1	Bactéricide
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1/32	1/32	1	Bactéricide
	<i>B. thermosphacta</i> CIP 103251	1/32	1/2	16	Bactériostatique
	<i>P. marginalis</i> DSM 13124	1/32	1/32	1	Bactéricide
	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/2	ND	ND	ND
EB	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/2	ND	ND	ND
ED	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/4	ND	ND	ND
EHA	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/4	ND	ND	ND
EHAB	<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 10149	1/16	ND	ND	ND
Margine (M)	<i>P. marginalis</i> DSM 13124	1/8	ND	ND	ND

Les CMI des extraits de margines testés varient de 51,77 à 1941,5 µg/ml, alors que les CMB testées varient de 207,11 à 1656,9µg/ml selon les extraits et les souches testées

L'effet marqué par l'extrait de margines (EA) à un effet bactéricide contre *S. aureus* ATCC 43300, *B. megaterium* ATCC 9885, *B. subtilis* ATCC 6633, et *P. marginalis* DSM 13124 ; alors qu'il exerce un effet bactériostatique contre *S. aureus* ATCC 257923, *E. coli* ATCC 25322, *Proteus sp.*, et *P. aeruginosa* ATCC 27853. En générale, nos résultats montrent donc une grande variabilité des qualités bactériostatiques et bactéricides des extraits vis-à-vis des différentes souches.

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

La plupart des méthodes utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs. Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus concernant l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations. Les notions de CMI, CMB, CMFS et CMFC ne sont pas définies de façon précise et universelle, les auteurs ont exprimé les résultats avec différentes unités. Ces concentrations peuvent être exprimées en µg/mL (OUSSOU *et al.*, 2008) en µl/mL (De BILLERBECK *et al.*, 2002) ou en % (vol/vol) (BOURKHIS *et al.*, 2007) ce qui rend la comparaison des résultats entre eux difficile.

Conclusion et perspectives

Nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne et la mise en évidence de l'activité anti-oxydante des CP issus des feuilles et des margines de la variété *Chamlal*, afin de mettre en valeur les deux sous-produits oléicoles.

Les rendements d'extraction des extraits de feuilles de l'olivier diminuent proportionnellement avec l'ordre de polarité décroissant des solvants (extrait de feuilles à l'éthanol > extrait aqueux (100°C) > extrait de feuilles au n-butanol). La même constatation est notée avec l'abaissement de la température pour les extraits aqueux (T°C ambiante, 40°C).

La quantification des CP extraits de feuilles de l'olivier, a permis de mettre en relief la richesse de ces extraits en CP avec la prédominance de ces derniers dans l'extrait de feuilles à l'éthanol (22,67 ± 1,48) mg EAG/g de poudre végétale, en raison de leur solubilité plus élevée dans l'éthanol. Ces résultats montrent que le type de solvant, sa polarité, et la température d'extraction ont une influence sur le rendement et la teneur en PPT.

Néanmoins, l'extrait à l'acétate d'éthyle, au n-butanol et à diéthyle éther de margines sont tous très riches en PPT que les autres extraits, malgré leurs différentes polarités, ce qui peut s'expliquer par la quantité importante et qualité différente des polyphénols (polaires et apolaires) ramenées par les trois solvants. Donc l'extraction des polyphénols des margines avec des solvants à polarités différentes permet de solubiliser les différents polyphénols selon leur affinité aux solvants utilisés.

Les CP de l'olive, qui se partagent entre l'huile et les margines durant le processus de l'extraction de l'huile d'olive pourraient constituer des substances à valoriser. Particulièrement, les margines connues sous le nom de déchet oléicole, pourraient constituer une source riche en molécules phénoliques actives. Ce qui permettrait à un certain degré de palier au problème de pollution de l'environnement causés principalement par les CP difficilement dégradables par les microorganismes.

Le test antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, a permis de conclure que les extraits de feuilles de l'olivier et des margines ont une source prometteuse d'agents antioxydants avec forte activité anti-radicalaire liée au contenu en polyphénols.

Généralement, indépendamment du type d'extrait et la concentration déposée dans le disque, les bactéries Gram positifs révèlent une sensibilité apparente que les Gram négatifs pour les extraits de feuilles de l'olivier. Toutefois, les extraits de margines ont une efficacité très marquée vis-à-vis des bactéries Gram positif et des Gram négatif. Ces dernières testées dans la présente étude possèdent des résistances naturelles à plusieurs agents antimicrobiens et multi-résistantes aux antibiotiques (*P. aeruginosa*). Ce qui conduit à dire que les extraits de deux sous-produits ont une forte action antibactérienne. En outre, la sensibilité bactérienne est également influencée par le type d'extrait et la concentration en PPT déposée dans le disque.

La détermination des paramètres d'inhibitions (CMI, CMB, et CMB/CMI) des extraits testés, montrent que ces derniers inhibent la majorité des bactéries avec une forte inhibition.

Ce travail a aussi démontré l'effet antibactérien des polyphénols commercialisés (flavonoïdes et acides phénols) vis-à-vis les bactéries testées, ce pouvoir est appréciable et mérite d'être mieux développé et étudié.

Les résultats obtenus dans ce travail ne constituent qu'une première étape dans la valorisation de deux sous produits de l'olivier. Des essais complémentaires seront nécessaires. A l'issue de la présente étude les perspectives suivantes peuvent être dégagées :

- ✓ Il serait intéressant de déterminer la composition chimique de chaque extrait de feuilles de l'olivier (*Chamlal*) et des margines ;
- ✓ D'autres tests antibactériens plus avancés sont nécessaires pour l'évaluation de cet effet antibactérien des polyphénols, afin de valoriser ces produits naturels et les utilisés en phytothérapie et la pharmacologie ;
- ✓ Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes et de faire des tests *in vivo* afin de déterminer de nouveaux agents thérapeutiques ;
- ✓ *In vitro* partant du fait qu'une substance pouvant être très active, *in vivo* peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps ; une étude est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits testés ;
- ✓ La présente étude met en évidence des propriétés antibactériennes de deux sous produits, qu'on pourrait exploiter dans la recherche des molécules à large spectre d'action qui réduisent la résistance aux antibiotiques.

Références bibliographiques

- ABU KHAYER M.D., MUKTADIRUL B.C., CHRISTOS S.A., DIMITRIOS V.V., STAVROS P. (2013).** Olive mill wastewater composting: A review. *Inter. Biodeter. biodegr.*, **85**, 108-119.
- AGUILERA M., QUESADA M.T., GUIRRA DEL AGUILA V., MORILLO J.A., RIVADENEYRA M.A., RAMOS-CORMONZANA A. et MONTEOLIVA-SANCHEZ M. (2008).** Characterization of *Paenibacillus jamilae* that produce exopolysaccharide during growth and detoxification of olive mill wastewaters. *Biores. technol.*, **99**, 5640-5644.
- AISSAM H. (2003).** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. *Universite sidi mohamed ben abdellah. Fes.* **156p.**
- AIT AMEUR S. et BOUZIDI F. (2013).** Etude de quelques paramètres physicochimiques et microbiologique des margines issues de deux système d'extraction d'huile d'olive : système de presse(traditionnel) et système de centrifugation à tris phases(moderne). Mémoire d'ingénieur. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Algérie.
- AIT BADDI G., CEGARRA J., MERLINA G., REVEL J.C., HAFIDI M. (2008).** Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste–wheat straw mixture. *Journal of Hazardous Materials. Article in press.*
- AKOWAUH G.A., ZHARI I., NORGYATI I., SADIKUN A., KHAMSAH S.M. (2004).** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, **87**, 559-566.
- 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.
- AL-AZZAWIE H.F., ALHAMDANI M.S. (2006).** Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Science*, **78**, 1371-1377.
- ALBANO S.M. and MIGUEL M.G. (2010).** Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 1-6.
- ALIGIANNIS N., KALPOTZAKIS E., MITAKU S., CHINOUE I. B. (2001).** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum species*. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 4168-4170.
- ALLOUCHE N., FKI I. et SAYADI S. (2004).** Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewater. *J. Agricul. Food. Chem.*, **52**, 267-273.
- ALMI D. (2010).** Etude du pouvoir antioxydant des composés et extraits phénoliques issus des olives et sous-produits de l'olivier (feuilles et margines) variété *chemlal* sur l'oxydation thermique simulant la friture de deux huiles à large consommation: huile d'olive et huile de tournesol. Mémoire de magister en sciences biologiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

- ALONSO-SALCES R.M., HEBERGER K., HOLLAND M.V., MORENO-ROJAS J.M., MARIANI C., BELLAN G., RENIERO F., GUILLOU C. (2010).** Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, **118**, 956–965.
- ALTIOK E. (2010).** Recovery of phytochemicals (having antimicrobial and Antioxidant characteristics) from local plants. These in Chemical Engineering. *İzmir Institute of Technology*.
- ALTIOK EVREN., DENIZ BAYCINLI., OGUZ BAYRAKTAR., SEMRA ÜLKÜ. (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.
- ANDRIKOPOULO N.K., KALIORA A.C., ASSIMOPOULOU A.N., PAPAGEORGIU V.P. (2002).** Inhibitory activity of minor polyphenolic and non polyphenolic constituents of olive oil against *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Medicinal Food*, **5**, 1-7.
- AMARAL CARLA., MARCO S., LUCAS., JOAˆO COUTINHO., ANTONIO L., CRESPIˆ., MARIA DO ROSA ˆRIO ANJOS A., CEˆLIA PAIS B. (2008).** Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal. *Bioresource Technology*, **99**, 7215–7223.
- ARRAEZ-ROMÁN D., CORTACERO-RAMIREZ S., SEGURA-CARRETERO A., MARTIN-LAGOS CONTRERAS J.A. and FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2006).** Characterization of the methanolic extract of hops using capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **27**, 2197-2207.
- ARRAEZ-ROMÁN D., ZUREK G., BÄBMANN C., ALMARAZ-ABARCA N., QUIRANTES R., SEGURA-CARRETERO A. and FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. (2007).** Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **389**, 1909-1917.
- ATHAMENA S., CHALGHEM I., KASSAH-LAOUAR A., LAROUİ S., KHEBRI S. (2010).** Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum L.* Mémoire de Magister en biologie. Université de Batna. Algérie.
- AZIZ N.H., FARAG S.E., MOUSA L.A. and ABO-ZAID M.A. (1998).** Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds *Microbios*, **93**, 43-54.
- BABAR A. M., HAHN E.J., PAK K.Y. (2007).** Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*, **12**, 607-621.
- BAHORUN T. (1997).** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritian*, p83-94.
- BAIDEZ A.G., GOMEZ P., DEL RIO J.A. and ORTUNO A. (2007).** Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea L.* against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpum destructans* (Zinssm.) Scholten. *Physiol Mol Plant*, **69**(4-6), 224-229.
- BALASUNDRAM N., SUNDRAM K. and 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 lipid oxidation and Meat Science color during storage of ground beef, *73*, 413-421
- BALLELL L., FIELD R.A., DUNCAN K., YOUNG R.J. (2005).** New small molecule synthetic antimycobacterials. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 2153-2163. <http://ukpmc.ac.uk/picrender.cgi?artid=244&blobtype=pdf>
- BATTINELLI L., DANIELE C., CRISTIANI M., BISIGNANO G., SAIJA A. and MAZZANTI G. (2006).** In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphaticaldehydes from *Olea europaea L.* fruit. *Phytomedicine*, **13**, 558-563
- BCHERRAWI N. (2002).** Extraction des polyphénols des margines. Mémoire de fin d'études d'Ingénieur Agronome. *Université Libanaise*. 111 pages.
- BECCARI M., BONEMAZZI F., MAJONE M., RICCARDI C. (1996).** Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive-oil mill effluent. *Water Research*, **30** (1), 183-9.
- BELAID C., KALLEL M. et ELLEUCH B. (2002).** Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive (margines). *Déchets sciences & technique*, **27**, 30-34.
- 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 ALESSANDRA., CERRETANI LORENZO., CARRASCO-PANCORBO ALEGRIA., GÓMEZ- CARAVACA ANA MARIA., SEGURA-CARRETERO ANTONIO., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ ALBERTO and LERCKER GIOVANNI. (2007).** Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. *An Overview of the Last Decade. Molecules*, **12**, 1679-1719.
- BENDINI A., BONOLI M., CERRETANI L., BIGUZZI B., LERCKER G. and TOSCHI T.G. (2003).** Liquid liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A*, **985**, 425-433.
- BENHAOUN G. et YVETTE L. (2007).** L'Olivier en Méditerranée : Du Symbole à l'Economie. *Ed. l'Harmattan, Paris*.
- BILLING J., SHERMAN P.W. (1998).** Antimicrobial function of spices. *Quarterly Review of Biology*, **73**, 3-49.
- BISIGNANO G., TOMAINO A., LO CASCIO R., CRISAFI G., UCCELLA N., SAIJA A. (1999).** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm Pharmacol*, **51**, 971-4.
- BITONTI M.B., CHIAPPETTA A., INNOCENT A.M., MUZZALUPOI. et UCCELLA N. (2000).** Biophenol functionality and distribution in *Olea Europa L.* Drupes. *Olivo & Olio*, **3**(1/2), 20-29.

- BITTER C.M., VIALE T.M., BASSAM DAMAJ B., CREA R. (2005).** Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti inflammatory activity. *J. Nutr*, **135**, 1475-4762.
- BLIKA K.P.S., STAMATILATOU K., KORNAROS M. et LYBERATOS G. (2009).** Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Glob. NEST. J*, **11**(3), 364-372.
- BONOLI M., MONTANUCCI M., TOSCHI T.G. and LERCKER G. (2003).** Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *J. Chromatogr. A*, **1011**, 163-172.
- BOSSOKPI I.P.L. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (*Rutaceae*). Thèse de pharmacie, Bamako, 133 p.
- BOROS B., JAKABOVA S., DORNYEI A., HORVATH G., PLUHAR Z., KILAR F., FELINGER A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 7972–7980.
- BOUDHRIOUA NOURHÈNE., BAHLOUL NEILA., BEN SLIMEN IMEN., KECHAOU NABIL. (2009).** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products. Article in Press*.
- BOUHDID S., IDAOMAR M., ZHIRI A., BOUHDID D., SKALI N.S., ABRINI J. (2006).** *Thymus essential oils*: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès Intrntional de biochimies, Agadir*, 324- 327.
- BOURKHIS B, OUHSSINE M, HNACH M, BOURKHISS 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.
- BOUSSEBOUA H. (2001).** Elément de microbiologie général. pp 160-167.
- 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., YAHIAI M., ABDEDDAIM M.C., ABERKANE. et A. AYACHI. (2011).** Evaluation de l’activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *l’aubépine monoxygéné*. *Leban. Scien. J*, **12**, 1-8.
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E. and BERSET C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*, **28**, 25-30.
- BRENES M., HIDALGO F., GARCIA A., RIOS J., GARCIA P., ZAMORA R. & GARRIDO A. (2000).** Pinoresinol and 1-acetoxypinoresind, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, **77** (7), 710-716.
- BRESCIA M.A., PUGLIESE T., HARDY E. and SACCO A. (2007).** Compositional and structural investigations of ripening of table olives, Bella della Daunia, by means of traditional and magnetic resonance imaging analyses. *Food Chem*, **105**, 400-404.
- BROUSSE G., LOUSSERT R. L’olivier. (1978).** Maisonneuse la rose, Paris.
- BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales,(3èmeéd). *Editions Tec & Doc Lavoisier*, p 1120.
- BRUNETON J., (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3ème Ed. *Lavoisier. Paris*, 199-388.

- CANDAN F, UNLU M, TEPE B, DAFERERA D, POLISSIOU M, SÖKMEN A. and AKPULAT H.A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Mille folium* A fan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 215-220.
- CAPONIO F. et CATALANO P. (2001). Hammer crushers versus disk crushers : The influence of working temperature on the quality and preservation of virgin olive oil. *Eur. Food. Res. Technol.*, **213**, 219-224.
- CARRASCO-PANCORBO A., ARRAEZ-ROMAN D., SEGURA-CARRETERO A. and FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2006). Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*, **27**, 2182-2196.
- 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. and 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.
- CHABOT S., BEL-RHLID R., CHÊNEVERT R., PICHÉ 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. *New Phytol*, **122**, 461-467.
- CHATTERJEE A. (2004). Inhibition of *Helicobacter pylori* ; in-vitro by various berry extracts with enhanced susceptibility of clarithromycine. *Mol. Cell. Biochem*, **265**(1-2), 19 - 26.
- CHIRA K., SUH J.H., SAUCIER C. and TEISSEDRE P.L., (2008). *Les polyphénols du raisin. Phytothérapie*, **6**, 75- 82.
- CHUN OK., CHUNG S.J, SONG W.O. (2007). Estimation de la dose de flavonoïdes alimentaires et les sources d'adultes américains majeurs alimentaires. *J Nutr*, **137**, 1244-1252.
- CLEMENTS J.M., COIGNARD F., JOHNSON I., CHANDLER S., PALAN S., WALLER A., WIJKMANS J., HUNTER M.G. (2002). Antibacterial activities and characterization of novel inhibitors of LpxC. *Antimicrob. Agents Chemother*, **46**(6), 1793-1799. <http://ukpmc.ac.uk/picrender.cgi?artid=136106&blobtype=pdf>
- CNUCED. (2010). Huile d'olive site internet:
<http://r0.unctad.org/infocomm/francais/olive/technologie.htm>
- COWAN M.M. (1999). Les produits végétaux comme des agents antimicrobiens. *Cliniques avis de microbiologie*, **12** (4), 564-570
- CROZIER A., DEL RIO D., CLIFFORD M.N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**, 446-467.

- 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.
- CUVELIER ME., BERSET C., RICHARD H., PELLERIN P. (1990).** Pouvoir antioxygène d'extraits naturels. *9ème journée internationale des huiles essentielles, Digne les Bains*, 374-385.
- DACOSTA Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. *Ed Yves Dacosta. Paris*, p **317**.
- DAGLIA M. (2011).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 1-8.
- 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 BILLERBECK VG., ROQUES C., VANIERE P., MARQUIER P. (2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Revue hygiène*, **10**, 248-254.
- DE BOER V.C.J. (2007).** Towards functional effects of polyphenols. Modulation of energy metabolism revealed. Thèse de Doctorat. Université de Wageningen. *Pays-Bas*.
- DE LA CASAJ., LORITE M., JEMENEZ J. et CASTRO E. (2009).** Valorization of waste water from two-phase olive oil extraction in fired clay brick production. *J.Hazard.Mat*, **169**, 271-278.
- DE LEONARDIS A., ACETINI A., ALFANO G., MACCIOLA V. et RANALLI G. (2008).** Isolation of a hydroxytyrosol rich extract from olive leaves (*Olea Europaea L*) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *Eur. Food. Res. Technol*, **226**, 653-659.
- DELGADO M.E., HAZA A.I., ARRANZ N., GARCIA A., et MORALES P. (2008).** Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *European journal of nutrition*, **47** (8), 479- 490.
- DEL RIO J.A., BAIDEZ A.G., BOTIA J.M. and ORTUNO A. (2003).** Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea L.*) and their influence on resistance against *Phytophthora sp.* *Food Chem*, **83**, 75-78.
- DE MARCO E., SAVARESE M., PADUANO A. et SACCHI R. (2007).** Characterisation and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chemistry*, **104**, 858–867.
- DE MARCO E., SAVARESE M., PADUANO A., et SACCHI R., (2007).** Characterization and fractionation of its antioxidants properties and bioactivity. *Eur. Food. Res. Technol*, **226**, 653-659.
- DEMBINSKA-KIEC A., MYKKÄNEN O., KIEC-WILK B., MYKKÄNEN H. (2008).** Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, **99**, 109-117.

- DE RIJKE E., ZAPPEY H., ARIESE F., GOOIJER C. & BRINKMAN U.A.T. (2003).** Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *Journal of Chromatography (A)*, **984** (1), 45-58.
- DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F., MICHAUD P.,** Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, **1538**, 1532-1552.
- 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. and 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.
- DIMITRIOS B. (2006).** Sources of natural phenolic antioxidants. *Trend in food Science and technology*, **17**, 505-512.
- DOMENICO T., FRANCESCO C., MARIA G.S., VINCENZA V., MARIATERESA C.D., ANTONELLA S., GABRIELA M., et GIUSEPPE B. (2005).** Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 2474-2478.
- DUPONT F.J., L. GUIGNARD. (2007).** Botanique systématique moléculaire. Edition Elsevier Masson. 14 éditions révisées. pp285.
- DWYER J. T. & PETERSON J. J. (2002).** «Measuring flavonoid: intake need for advanced tools». *PubLic Heath in the Northen territory*, **5** (6), 925-930.
- EDDARI H. (1994).** Etude de la sauge officinale, *Thèse de doctorat, université de Lyon*.
- EL HADJOUJI H., AIT BADDI G., YAACOOBI A., HAMDI H., WINTERTON P., REVEL J.C. et HAFIDI M. (2008).** Optimization of biodegradation condition for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol*, **99**, 5505-5510.
- ENA A., CARLOZZI P., PUSHBARAJ B., PAPERI R., CARNEVALE S. et SACCHI A. (2007).** Ability of the aquatic fern *Azolla* to remove chemical oxygen demand and polyphenols from olive mill wastewater. *Gras.Acei*, **58**(1), 34-39.
- 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. *Journal of Ethno pharmacology*, **132**, 200-205.
- ESRA S. Z., SEDAT I. et LALE E. (2001).** Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water. Res*, **35**(9), 2336-2340.
- FABRI R.L., NOGUEIRA M.S., BRAGA F.G., COIMBRA E.S. & SCIO E. (2009).** *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial anti leishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology*, **100**, 428-433.
- FALLEH H., KSOURI R., CHAIEB K., KARRAY-BOURAOU N., TRABELSI N., BOULAABA M., ABDELLEY C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331**, 372-379.

- FAVIER A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en chimie*, 108-115.
- FEDORAK P.M. et HRUDEY S.E. (1984).** The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. *Water.Res.*, **18**, 361-7.
- FIESS M. (1994).** Antioxygènes contre le rancissement. *Revue de l'Industrie Agroalimentaire*, **520**, 47-50.
- FIESTAS ROS J.A. (1986).** Vegetation water used as fertilizer, proceedings of international Symposium on olive By-Products Valorization. *FAQ, UNDP, Sevilla, Spain*, 321- 330.
- FKI INES., ALLOUCHE NOUREDDINE., SAYADI SAMI. (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.
- FLEMING H.P., WALTER W.M., JR. and ETCHELLS J.L. (1973).** Antimicrobial Properties of Oleuropein and Products of Its Hydrolysis from Green Olives. *appl. microbiol*, **26**(5), 777-782.
- FLEURIET A., JAY-ALLEMAND C., MACHEIX J.J. (2005).** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, 121-216.
- FLEURIET. et MACHEIX. (2003).** Les polyphénols en agroalimentaire, *Lavoisier* 2006 (France), ISBN 2-7430-0805-9, ISSN 0243-5624. pp 20.
- FLORENTIN E (Relu). (2004).** fruits et légumes, polyphénols et santé.
- FURNERI P M., MARINO A., SAIJA A., UCCELLA N. and BISIGNANO G. (2002).** In vitro antimycoplasmal activity vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob Ag*, **20**, 293-296.
- GAMEL T.H. et KIRITSAKIS A. (1999).** Effect of methanol extracts of rosemary and olive vegetable water on the stability of olive oil and sunflower oil. *Grasas y Aceites*, **50**, 345-350.
- GARCIA M., RUIZ Y., MOUMEN A., ALCAIDE M. (2006).** Effect of polyethylene glycol, urea and sunflower meal on olive (*Olea europaea var. europaea*) leaf fermentation in continuous fermenters. *Small Ruminant Research*, **61**, 53-61.
- GARDNER G. A. (1981).** *Brochothrix thermosphacta (Microbacterium thermosphactum) in the spoilage of meats: a review*, p. 139-173. In T. A. Roberts, G. A. Hobbs, J. H. B. Christian, and N. Skovgaard (ed.), Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. Academic Press, London, England.
- GARIBOLDI P., JOMMI G. and VEROTTA L. (1986).** Sercoiridoïds from *Olea Europaea*, *Phytochemistry*, **25** (4), 865-896.
- GAUSSORGUES R. (2009).** L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique ? *Revue française d'allergologie*, **49**, 2–6.
- GEE J.M., JOHNSON I.T. (2001).** Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*, **8**, 1-182.
- GHEDIRA K. (2005).** Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **04**, 162-169.
- GHEDIRA K. (2008).** L'olivier article de synthèse .Pharmacognosie. *Phytothérapie*, **6**, 83–89.

- GHOSH D., SCHEEPENS A. (2009).** Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53**, 322 – 331.
- GOMEZ-CARAVACA A.M., Gomez-Romero M., ARRAEZ-ROMAN D., SEGURA-CARRETERO A., FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1220-1234.
- GOMEZ-ROMERO M., ARRAEZ-ROMAN D., MORENO-TORRES R., GARCIA-SALAS P., SEGURA-CARRETERO A. and FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2007).** Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, **30**, 595-603.
- GOMEZ-ROMERO M., ARRAEZ-ROMAN D., SEGURA-CARRETERO A. and FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2007).** Analytical determination of antioxidants in tomato: Typical components of the Mediterranean diet. *J. Sep. Sci.*, **30**, 452-461.
- GONCALVES M.R., COSTA J.C., MARQUES I.P. et ALVES M.M. (2011).** Inoculum acclimation to promote the conversion of olive mill wastewater to methane. *Appl. Microbio. Biotechnol. Ener.*, **36**, 2138-2141.
- GONZALEZ-GALLEGO J., GARCIA-MEDIAVILLA M.V., SANCHEZ-CAMPOS S., TUNON M.J. (2010).** Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*, **104**, 15-27.
- 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.
- GUINEBERT E., DURAND P., PROST M., GRINAND R. and BERNIGAULT R. (2005).** Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*, 554-558.
- GULCIN I., HUYUT Z., ELMASTAS M. and ABOUL-ENEIN., H.Y. (2010).** Radical scavenging, and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry* , **3**,43-53.
- HADI M. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur.
- HALLIWELL B; GUTTERIDGE J.M.C. (1999).** Free radicals in biology and medicine, Oxford, UK.
- HALLIWELL B. (1994).** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutritional Review*, **52**, 253-265.
- 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.
- HAMDI K.H., CASTELLON R. (2005).** Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **334**, 769-778.
- HAMDI M. (1996).** Anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry*, **31**, 105-110.
- HAMDI M. (1993).** Valorisation et épuration des effluents des huileries d'olives : l'utilité de la microbiologie industrielle. *Olivae*, **46**, 20-24.

- HAMDI M. (1991).** Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse de l'université de Provence. Marseille, France. 166 p.
- HANDIQUE J.G. and BARUAH J.B. (2002).** Polyphenolic compounds: an overview. *React Funct Polym*, **52**, 163- 188.
- HARAGUCHI H., TANIMOTO K., TAMURA Y., MIZUTANI K., KINOSHITA T. (1998).** Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, **48**, 125-129
- HATANO T., KUSUDA M., INADA K., OGAWA T.O., SHIOTA S., TSUCHIYA T. and YOSHIDA T. (2005).** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, **66**, 2047-2055.
- HE Z., XIA W. and CHEN J. (2008).** Isolation and structure elucidation of phénolics compounds in Chinese olive (*Cnarium album L.*) fruit. *European Food Research and Technology*, **226**, 1191-1196.
- HEIM K.E., TAGLIAFERRO A.R., BOBILYA, D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, **13**, 572- 584.
- HEMAISWARYA S., KRUTHIVENTI A. K., & DOBLE M. (2008).** Synergism between natural Products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, **15**, 639- 652.
- HENNEBELLE T., (2006).** Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota Pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologique de Lille, Lille 1. Ecole Doctorale Sciences de la Matière du rayonnement et de l'Environnement. France.
- HILLIARD J.J., KRAUSE H.M., BERNSTEIN J.I., et autre. (1995).** A comparison of active site binding of 4- quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv. Exp. Med. Biol*, **390**, 59-69.
- HODGSON J. M., CROFT K.D. (2010).** Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**, 495-502.
- HOEKOU Y.P., BATAWILA K., GBOGBO K.A., KAROU D.S., AMEYAPOH Y. et SOUZA C. (2012).** Laboratoire de Microbiologie de l'Ecole Supérieure des Techniques Biologiques et Alimentaires (ESTBA), *Université de Lomé, Togo*. pp 3094.
- HOSTETTMANN K. et MARSTON A. (2002).** *Phytochem. Rev*, **1**, 275-285.
- HUANG A.C., WILDE A., EBMEYER J., SKOUROUMOUNIS G. and TAYLOR D.K. (2013).** Examination of the Phenolic Profile and Antioxidant Activity of the Leaves of the Australian Native Plant *Smilax glycyphylla*. *J. Nat. Prod*, **76**(10), 1930-6.
- HUANG D., OU B. and PRIOR R.L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.
- HUDAIB M., GOTTI R., POMPONIO R., and CAVRINI V. (2003).** Recovery evaluation lipophilic markers from *Echinacea purpurea* roots applying microwave-assisted solvent of extraction versus conventional methods. *J. Sep. Sci*, **26**, 97-104.

- JAPON-L UJAN R., LUQUE-RODRIGUEZ J.M., LUQUE DE CASTRO M.D. (2006b).** Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, **1108**, 76–82.
- JEMAI H., BOUAZIZ M., FKI I., EL FEKI A., SAYADI S. (2008).** Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from *Chemlali* olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, **176**, 88-98.
- JUST N., NYUNGA M., LELONG J., WALLAERT B. (2005).** Allergie immédiate aux glucocorticoïdes de synthèse oraux. *La Revue de Médecine Interne*, **26**, 331-334.
- KALAM S., SINGH R., MANI A., PATEL J., NAEM KF. and PANDEY A. (2012).** Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*, **1**, 18-34.
- KALMIS E., AZBAR N., YILDIZ H., et KALYONCU F. (2008).** Feasibility of using olive mill effluent(OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. *Biores.Technol*, **99**, 164-169.
- 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. and LEE H.S. (2003).** Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacol*, **87**, 231-236.
- KARAKAYA S. (2009).** Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, **67**(11), 632-8.
- KAROU. (2006).** Thèse de Doctorat Unique (Biochimie- Microbiologie).pp 53.
- 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, *journal of Biotechnology*, **4**(8), 823-828.
- KATARZYNA U., ANNA M., MARTA M., JOANNA J.B. and GRZEGORZ W. (2007).** Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, **62** (2), 132-135.
- KEBBAB R. (2014).** Etude de pouvoir antioxidant des polyphénols issues des margines d'olive de la variété *Chamlal* : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Algérie.
- KIM J., MARSHALL MR., WEI C. (1995).** Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43 pp. 2839-2845.
- KIRBY G.C. (1996).** *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*, **90**,605-609.
- KNAGGS A.R. (2003).** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, **20**, 119- 36.
- KOURI G., TSIMOGIANNIS D., HAIDO BARDOUKI H. & OREOPOULOU V (2007).** Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative of Food. Science and Emerging Technolgy*, **8**, 155-168.
- LAFKA T.A., LAZOU A.E., SINANOGLU J.V. et LAZOS E.S. (2011).** Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food. Chem*, **125**, 92-98.
- LAFKA T., LAZOU A.E., SINANOGLU V. J., LAZOS E. S. (2010).** Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, **125**, 92–98.

- LAKHTAR H., ISMAILI-ALAOUI M.A., PERRAUD-GAIME I., PHILIPPOSSIS A. et ROUSSOS S. (2010).** Screening of *Lentinula edodes* grow on model olive millwastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. *Inter.biodeterior. Biodegr*, **64**, 167-172.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 453- 462.
- LATTE L.P., KOLODZIEJ H. (2000).** Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch*, **55**(5-6), 467- 72.
- LEE-HUANG S., ZHANG L., P.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.
- LEE-HUANG S., HUANG P.L., ZHANG D., LEE J.W., BAO J., SUN Y., CHANG Y.T., ZHANG J. and 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 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. *Bio resource 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 *Bioresource Technology*, **101**, 3751–3754.
- LEGER C. (1999).** Co-produits de l'huilerie d'olive: les composés phénoliques et leurs propriétés biologiques. *OCL. Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **6**, 60-63.
- LEITAO DP., POLIZELLO AC., ITO IY., SPADARO AC. (2005).** Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J Med Food*, **8**(1), 36-40.
- LEON W., NITIEMA., SAVADOGO A., JACQUES S., DAYERI D. et ALFRED S. (2012).** Traoré Activité antimicrobienne in vitro de certains composés phénoliques (Coumarine et quercétine) contre la gastroentérite souches bactériennes, 183-187.
- LETELLIER M. and BUDZINSKI H. (1999).** Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, **27**, 259-271
- LEULMI N. (2011).** La valorization nutritionnelle des margine et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Thèse de Magister en biotechnologie microbienne. Faculté des Science de la Nature et de la Vie. Université Mentouri, Constantine, Algérie.
- LEV N., GILGUN-SHERKI Y., OFFEN D., and 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.
- LEVI-MINZI R., GAVIOZZI A., RIFFALDI R., et FALZI L. (1992).** L'épandage aux champs des margines : Effet sur les propriétés de sol. *Oliv*, **40**, 20-25.

- LIBERATORE L., PROCIDA G., D'ALESSANDRO N. and CICHELLI A. (2001).** Solid-phase extraction and gaz chromatographic analysis of phenolic compounds in vergin olive oil. *Food Chem*, **73**, 119-124.
- LISU W., JUI-HUNG Y., HSIAO-LING L., MING-JIUAN W. (2003).** Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifeca* Gertn), *Journal of food and drug analysis*, **11**(1), 60-66.
- LIU F., LIAOS., ZOU Y. and XIAO G. (2014).** Antioxidant activity of *Phellinusignarius* extracts, *The FASEB Journal*, **28**(1), 830-32.
- LOŽIENE KRISTINA., VENSKUTONIS PETRAS R., AUSRA SIPAILIENE., JUOZAS LABOKAS RADICAL (2007).** Scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides L.* chemotypes. *Food Chemistry*, **103**, 546–559.
- LUGASI A., HÓVÁRI J., SÁGI K.V. and BIRO L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, **47** (4), 119-125.
- MACHEIX J.J., FLEURIET A. and JAY-ALLEMAND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, *Lausanne*, p. 4-5.
- MACHEIX J.J., FLEURIET A. and JAY-ALLEMAND C.H. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, *Lausanne* p, 190. ISBN, 2- 88074-625-6.
- MADI A. (2009).** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Saugé) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de Magister (Biotechnologie végétale), Ecole doctorale. Université Mentouri de Constantine. pp 88.
- MAKOI J.H.J.R., NDAKIDEMI P.A. (2007).** Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*, **6**(12), 1358-1368.
- MANNA C., GALLETTI P., CUCCIOLLA V., MONTEDERO G. et ZAPPIA V. (1999).** Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **10**, 159-165.
- MANACH C., MAZUR A., SCALBERT A. (2005).** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, **16**, 1–8.
- MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C. and JIMENEZ L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, **79**, 727-747.
- MANN C.M., COX S.D., MARKHAM J.L. (2000).** The outré membrane of *Pseudomonas aeruginosa* infecting nc tc 6749 contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), letters in appl. *Microbial*, **30**, 294-297.
- MANSOUR-BENAMAR M., SAVOIE J.M. et CHAVANT L. (2013).** Valorisation of solid olive mill waste water by cultivation of a local strain of edibele mushrooms: Valorisation du grignon d'olive par la culture d'une souche locale de chompignon comestible. *C.R.Bio*, **336**, 407-415.
- MARFAK A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides: étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools (Formation des depsides). Thèse de Doctorat. *Faculté de Pharmacie, Université de Limoges (France)*.

- MARSILIO V., CAMPESTRE C., LANZA B. (2001).** Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, **74**, 55–60.
- 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 S., ANDRIANTSITOHAINA R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, **51**, 304–315.
- 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.
- MACHADO T.D., LEAL I.C.R., AMARAL A.C.F., DOS SANTOS K.R.N., DA SIVA M.G., KUSTER R.M. (2002).** Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J Braz Chem Soc*, **13**, 606-610.
- MASSADEH M.I., et MODALLALN. (2008).** Ethanol production from olive mill wastewater (OMWW) pretreated with pleurotus sajor-caju. *Energy.Fuels*, **150** (22), 150-154.
- MEKKI A., DHOUB A. et SAYADI S. (2006).** Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater. *Microbiol. Res*, **161**, 93-101.
- MENDEZ J.A., VAZQUEZ-MARTIN A., COLOMER R., BRUNET J., CARRASCO-PANCORBO A., GARCIA-VILLALBA R., FERNANDEZ-GUTIERRES A., SEGURA-CARRETERO A. (2007).** Olive oil's bitter principal reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2- over expressing breast cancer cells. *Journal of BMC Cancer*, **7**, p80.
- MEYER A., DEIANA J. (1988).** Cours de microbiologie générale. *Doin éditeurs, paris*. p 201-224.
- MICOL V., CATURLA N., PEREZ-FONS L., MAS V., PEREZ L. and ESTEPA A. (2005).** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antivir Res*, **66**, 129-136.
- MOHSEN S.M., AMMAR A.S.M. (2009).** Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem*, **112**, 595-598.
- MOMPON B., LEMAIRE B., MENGAL P. and SURBLED M. (1998).** Extraction des Polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. In : Veracauteren, Joseph. *Polyphénols* 96.édition. *INRA. Paris*. 31-43. ISBN 2-7380-0796-1.
- 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*, **38** p, 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 fiabilité de nouvelles techniques pour la valorisation du déchet dans le secteur agroalimentaire au Maghreb. *REME*, 1- 51.
- NACZK M., SHAHIDI F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 95–111.

- NEFZAOUI A. (1991).** Valorisation des sous produits de l'olivier. Options Méditerranéennes-Série séminaire. **16**: 101-108.
- 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.
- NEURATH AR et al.,** *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infect Dis*, (2004), Oct 14; 4:41.
- NIAOUNAKIS M., HALVADAKIS C.P. (2006).** Olive processing waste management: literature review and patent survey, second ed. *Elsevier, Amsterdam*.
- NIKI E. (2010).** Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, **49**, 503-515.
- NOUBIKH A., ABDERRABBA M. et PROVIST E. (2007).** Temperature and addition effects on the solubility behavior of some phenolic compounds in water *J. Chem. Thermody*, **39**, 297-303.
- 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 mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 823–837.
- OLCOTT HS., MATHILL HA. (1936).** Antioxidants and autoxidation of fats. VII. Preliminary classification of inhibitors. *J Am Chem Soc*, **58**, 2204-2208.
- OMAR S.H. (2010).** Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Journal of Sci Pharm*, **78**,133- 154.
- ORTURNO A., BAIDEZ A., GOMEY P., ARENAS MC. (2005).** *Citrus perasidi* and *Citrus sinensis* flavonoïds: Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*.
- 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. et JOHENS T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, **64**, 149-160.
- PAGES J.M., GARNOTEL E. (2003).** Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. *Revue Française des Laboratoires*, **352**, 57-63.
- PAIXAO N., PERESTRELO R., MARQUES J.C. and CAMARA J.S. (2007).** Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem*, **105**, 204-214.
- 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.

- PANSERA M.R., IOB G.A., ATTI-SANTOS A.C., ROSSATO M., ATTI-SERAFINI L. and CASSEL E. (2004). Extraction of Tannin by *Acacia mearnsii* with Supercritical Fluids. *Braz Arch BioL Techn*, **47** (6), 995-998.
- PARASKEVI. and MOUTSATSOU. (2007). The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones*, **6** (3), 173-193.
- PEREIRA S.A., PEREIRA A.P.G., FERREIRA C.F.R., VALANTAO P., ANDRADE P.B., SEABRA R., ESTEVINHO L. and BENITO A. (2006). Table olive from Portugal : Phenolic compounds antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **54**, 8425-8431.
- PEREIRA M., TRIPATHY S., INDAMDAR V., RAMESH K., BHAVSAR M., DATE A., IYYER R., ACCHAMMACHARY A., MEHENDELE S., RISBUD A. (2005). Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in seropositive and seronegative HIV-TB patients in Pune, India. *Indian J. Med. Res*, **121**(4), 235-239.
- PEREIRA A.P., FERREIRA I., MARCELINO F., VALENTAO P., ANDRADE P.B., 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.
- POURRUT B. (2008). Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut National Polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité. *Ecotoxicologie. France*.
- PRASAIN J.K., WANG C.C., BARNES S. (2004). Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, **37**(9), 1324-1350.
- PRIEGO-CAPOTE F., RUIZ-JIMENEZ J. and LUQUE DE CASTRO M.D. (2004). Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis diode array detection Application to the characterisation of alperujo after ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatogr. A*, **1045**, 239-246.
- PROCIDA G. et CECCON L. (2006). Gas chromatographic determination of free fatty acids in olive mill waste waters. *Anal. Chim. Acta*, **561**, 103-106.
- PROESTOS C. and SERELL D., KOMAITIS M., (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, **95**, 44-52.
- PROESTOS, C., BOZIARIS I.S., NYCHAS G-J.E. et KOMAITIS M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of Food Chemistry their antioxidant capacity and antimicrobial activity, **95**, 664- 671.
- PUNYASIRI P.A., ABEYSINGHE S.B., KUMAR V. (2005). Performed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infections. *J Chem Agri*, **31**(6), 1315-1324.
- RAMOS-CORMENZANA A., JIREZ-JIMENEZ B. et GARCIA-PAREJA M.P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration et Biodegradation*, **38**, 283-290.
- RANALLI A., LUCERA L. et CONTENTO S. (2003). Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, pp.7636-7641.

- RANNALI A. (1991).** The effluent from olive mills: Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Oliv*, **37**, 30-39.
- 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. Pub Med Abstract.
- RAYAN D. et ROBARDS K. (1998).** Phenolic compounds in olives. *Analyst*, **123**, 31R-44R.
- RICHTER G. (1993).** Composés phénoliques in *Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Ed Presse polytechnique et universitaire romande*, 317-339.
- RIOS J.L. and RECIO M.C. (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 80-84.
- 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
- ROGINSKY V. and LISSI E.A. (2005).** Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food. Chem*, **92**, 235-254.
- ROIG A., CAYUELA M.Y. et SANCHEZ- MONEDERO M.A. (2006).** An overview on olive mill wastes and there valorization methods. *Was. Manag*, **26**, 960-969.
- ROSS R. (1999).** Atherosclerosis, an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, **340** (2), 115-126.
- RYAN D., ROBARDS K. and LAVEE S. (1999).** Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 265–274.
- SABBAH I., MARSOUK T. et BASHEERS. (2004).** The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. *Process. Biochem*, **39**, 1947- 1941.
- SAITTA M., LO CURTO S., SALVO F., DI BELLA G. and DUGO G. (2002).** Gas fchromatographictandem mass spectrometric identication of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analyt Chim Acta*, **466**, 335-344.
- SAKANAKA S, JUNEJA L.R. and TANIGUCHI M. (2000).** Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *J Biosci Bioeng*, **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. and SHARMA P (2011).** A Review of, Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1**, 25-41.
- SARKER S D, LATIF Z and GRAY A I. (2005).** Natural Product Isolation. In: Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa),1- 23.
- SARNI-MANCHADO PASCALE. & CHEYNIER VERONIQUE. (2006).** Les Polyphénols en Agroalimentaire. Technique et Documentation. *Lavoisier. Paris*. 398p.

- SAVARESE TM., STROHSNITTER WC., LOW HP., LIU Q., BAIK I., OKULICZ W., CHELMOW DP., LAGIOU P., QUESENBERRY PJ., NOLLER KL., HSIEH CC. (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., J. AGRIC. (2001).** *Food Chem*, **49**, p 618.
- SAYADI S., ALLOUCHE N., JAOUA M. et ALOUI F. (2000).** Determinal effects of high molecular-mass polyphénols on olive mill wastewater biotreatment. *Process. Biochem*, **35**, 725-735.
- SCALBERT A., WILLIAMSON G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, **130**, 2073-2085.
- SCALBERT A., MANACH C., MORAND C., REMESY C., JIMENEZ L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**, 287-306.
- 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.
- SENANI N. (2010).** Etude du pouvoir antifongique (inhibition de croissance et de production d'aflatoxines) des composés et extraits polyphenoliques issus des olives et sous produits de l'olivier (feuilles et margines) variété *chamlal* sur deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Mémoire de Magister (Biochimie Appliquée et biotechnologies). Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. pp 66.
- SERAPHIM P., MARIA G.P., STYLIANOS F., MICHAEL K., GEORGE A. (2008).** Citric acid production by *Yarwinia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, **99**, 2419-2428.
- SERVILI MAURIZIO., SELVAGGINI ROBERTO., ESPOSTO SONIA., TATICCHI AGNESE., MONTEODORO GIANFRANCESCO., MOROZZI GUIDO. (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. Journal of Chromatography, (A)*, **1054**, 113-127.
- SERVILI M. & MONTEODORO G. (2002).** Contribution of phenolic compounds in virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 602-613.
- 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*, **17**, 76-84.
- SHAN B., CAI Y.Z., BROOKS J.D. and CORKE H. (2007).** The in vitro antibacterial activity of diet aryspice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, **117**, 112-119.
- SHIMIZU H. (2004).** Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, *Stroke*, **35** (9), 2072-2077.
- SIFOUNE N. (2008).** Traitement des effluents des huileries d'olive par oxydation au H₂O₂. Thèse de magister en Génie de l'Environnement Faculté des Sciences de l'Ingénieur. Université M'Hamed bougera- Bumerdes, Algérie.

- SILBERBERG M., MORAND C., MATHEVON T., BESSON C., MANACH C., SCALBERT A. and REMESY C. (2006).** The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur J Nutr*, **45**, 8896
- SILVA BY SANDRA., LUCÍLIA GOMES., FAUSTO LEITÃO., MARIA BRONZE., ANA V COELHO. and LUÍS VILAS BOAS. (2010).** Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Food Science. Technology*, **61** (2), 157-164.
- SIVAKUMARAN S., MOLAN A.L., MEAGHER L.P., KOLB B. (2004).** Variation in antimicrobial action of pranthocyanidins from *Dorycrum rectum* against rumen bacteria. *Phys Chem*, **5**(3), 106-111.
- SMITH., DUNEZ., LELLIOT., PHILLIPS. and ARCHER. (1988).** European Handbook of Plant Disease. Blackwell Scientific Publications.
- SOLER-RIVAS C., GARCIA-ROSADO A., POLONIA I., JUNCA-BLANCH G., MARIN F.R. and WICHERS H.J. (2006).** Microbiological effects of olive mill waste addition to substrates for *Pleurotus pulmonarius* cultivation. *Int. Biodeter. Biodegr*, **57**, 3744.
- SOUSA A., FERREIRA I.C. F. R., CALHELHA R., ANDRADE P.B., VALENTAO P., SEABRA R., ESTEVINHO L., BENTO A. and PEREIRA J.A. (2006).** Phenolics and able olives ‘alcaparra’. antimicrobial activity of traditional stoned Bioorg. *Med. Chem*, **14**, 8533-8538.
- SPENCER J.P. (2010).** Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **69**, 244-260
- SPICHIGER R.E et al. (2002).** Botanique systématique des plantes à fleurs. Edition Presses polytechniques et universitaires romandes. *2eme édition*, pp 418.
- STAMATAKIS G. (2010).** Energy and geo-environmental application for Olive Mill Wastes. *A revi*, **45**, 269-282.
- STOVER C.K., PHAM X.Q., ERWIN A.L., MIZOGUCHI S.D., WARRENER P., HICKEY M.J., BRINKMAN F.S., HUFNAGLE W.O., KOWALIK D.J., LAGROU M., GARBER R.L., GOLTRY L., TOLENTINO E., WESTBROCK-WADMAN S., YUAN Y., BRODY L.L., COULTER S.N., FOLGER K.R., Kas A., Larbij K., LIM R., SMITH K., SPENCER D., WONG G.K., WU Z., PAULSEN I.T., REIZER J., SAIER M.H., HANCOCK R.E., LORY S., OLSON M.V. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, pp 959-964.
- SUDJANA AN., D’ORAZIO C., RYAN V., RASOOL N.Ng J., ISLAM N., RILEY TV. and HAMMER KA. (2009).** Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *I. J. Antimicrob. Agents*, **33**, 461- 463.
- SUSALIT E., IDIAGUSB N., EFFENDIA I., TJANDRAWINATAC R.R., PERRINJAQUET MOCCETTID T., VERBRUGGEN M. (2010).** Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*.
- SU X., DUAN J., JIAN Y., SHI J. and KAKUDA Y. (2006).** Effect of soaking conditions on the antioxidant potensials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 348-353.

- SZENT-GYÖRGYI A.** The identification of vitamin C. *Science*, 1938, **87**, 214-215.
- TANCHEV S., JONCHEVA N., GENOV N., CODOUNIS M. (1980).** Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna*, **4**, 5-13.
- TAO L. and LAMBERT J.D. (2014).** Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer. *Polyphenols in Human Health & Disease*, **2**, 1191-1198.
- 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).
- THUILLE N., 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 *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, **113**, 173-179.
- TOMATI U, GALLI E. (1992).** In *Humus, its structure and role in agriculture and environment*, *Kuban J. Ed. Elsevier, London*, 117-126.
- 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.
- TSAO R. and DENG Z. (2004).** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B*, **812**, 85-99.
- TSUCHIYA H. and IINUMA M. (2000).** Reduction of membrane fluidity by antibacterial *sophoraflavanone G* isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, **7**, 161- 5.
- ULANOWSKA K. (2006).** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbial*, **184** (5), 271-8.
- ÜNAL K.M. (1994).** Polyphénols, o-diphénols et acides phénoliques totaux dans les grignons d'olive et la margines. *OLIVAE*, **15**, 34-35.
- USAQUEN-CASTRO X., MARTINEZ-RUBIO M., AYA-BAQUERO H and GONZALEZ-MARTINEZ G. (2006).** Ultrasound-assisted Extraction of Polyphenols from Red-grape (*Vitis vinifera*) Residues. *IUFoST*, 1315- 1324.
- VASILEIOS ZIOGAS., GEORGIA TANOU B., ATHANASSIOS MOLASSIOTIS A., GRIGORIOS DIAMANTIDIS B., MILTIADIS VASILAKAKIS. (2010).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry*, **120**, 1097-1103.
- VERCAUTEREN J., CHEZE C., TRIAUD J. (1998).** Polyphénols. 18th international conference on polyphenols, N°87. Ed. IRNA
- VILLEMUR P. et DOSBA F. (1997).** Oléiculture : évolution variétale et acquisition de la maîtrise des pratiques culturales : Huile d'olive. *OCL*, **4** (5), 351-355.
- VISIOLI F. and 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 extra virgin olive oil in mildly dyslipidémie patients. *Eur. J. Clin. Nutr*, **6**, 1-7.

- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3397-3401.
- VISIOLI F., BELLOMOG., GALLI C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **247**, 60-64.
- WAGNER W.L., HERBST D.R., SOHMER S.H. (1999). Manual of the Flowering Plants of Hawai'i. 2 vols. *Bishop Museum Special Publication 83, University of Hawai'i and Bishop Museum Press*, **4**, 1- 9.
- WILLIAMSON G. and MANACH C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*, **81**, 246-255.
- WINKELHAUSEN E., POSPIECH R. and LAUFENBERG G. (2005). Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, **24**(1), 41-46.
- WU D. and CEDERBAUM A. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research and Health*, **27**, 277-284.
- XIUZHEN H., TAO S., HONGXIANG L. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, **8**, 950-988.
- YAAKOUBI A., CHAHLAOUI A., RAHMANI M., ELYACHIOUI M., OULHOTE Y. (2009). Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. *Agrosolutions*, **20**, 1.
- YALA D., MERAD A.S., MOHAMEDI D. and OUAR KORICH M.N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, n° 91.
- YOU-CHENG HSEU., WEN-HUEI CHANG., CHEE-SHAN CHEN., JIUNN-WANG LIAO CHIN-JUNG HUANG., FUNG-JOU LU., YI-CHEN CHIA., HSENG-KUANG HSU., JIA-JIUAN WU., HSIN-LING YANG. (2008). Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 105-114.
- YRJÖNEN T. (2004). Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Thèse de Doctorat. Université d'Helsinki. Finlande.
- YU R., MANDLEKAR S., TONY KONG A.N. (2000). "Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c". *Molecular Pharmacology*, **58**, 431- 437. EPHE.
- ZBAKH H. et EL ABBASSI A. (2012). Potential use of mill wastewater in the preparation of functional beverages. *J.funct.foods*, **4**, 53-65.
- ZIOGAS V., TANOU G.B., MOLASSIOTIS A.A., DIAMANTIDIS G.B. et VASILAKAKIS M. (2010). Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food. Chem*, **120**, 1097-1103.

Annexe 1. 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.

➤ **Composition de la Gélose MH** (composition en g/l)

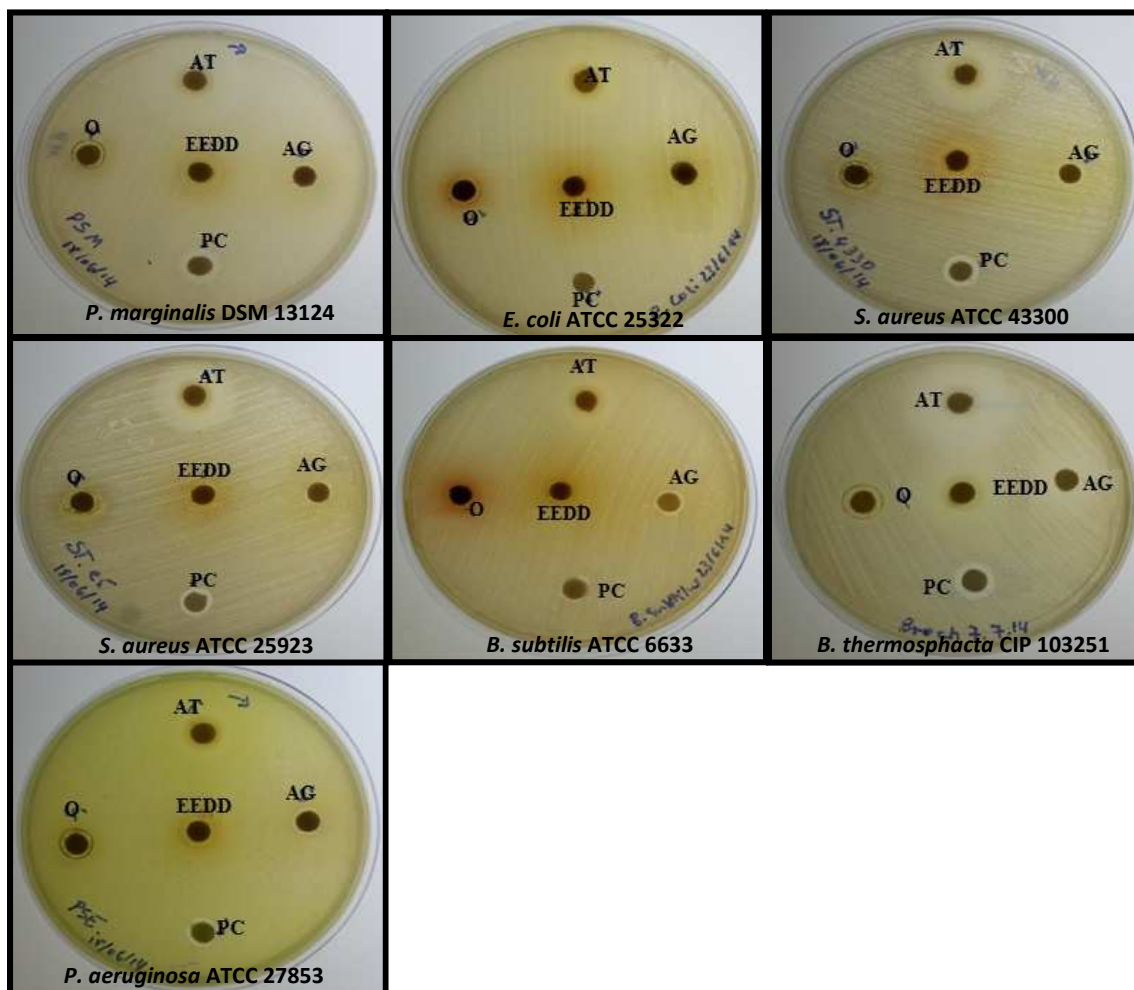
- Extraits de viande 3g
- Amidon 1,5g
- Hydrolysa acide de caséine 17,5g
- Agar 18g
- Eau distillée 1L
- PH=7,4.
- Stérilisation à 120°C/15 min.

➤ **Gélose Nutritive (GN)** (composition en g/l)

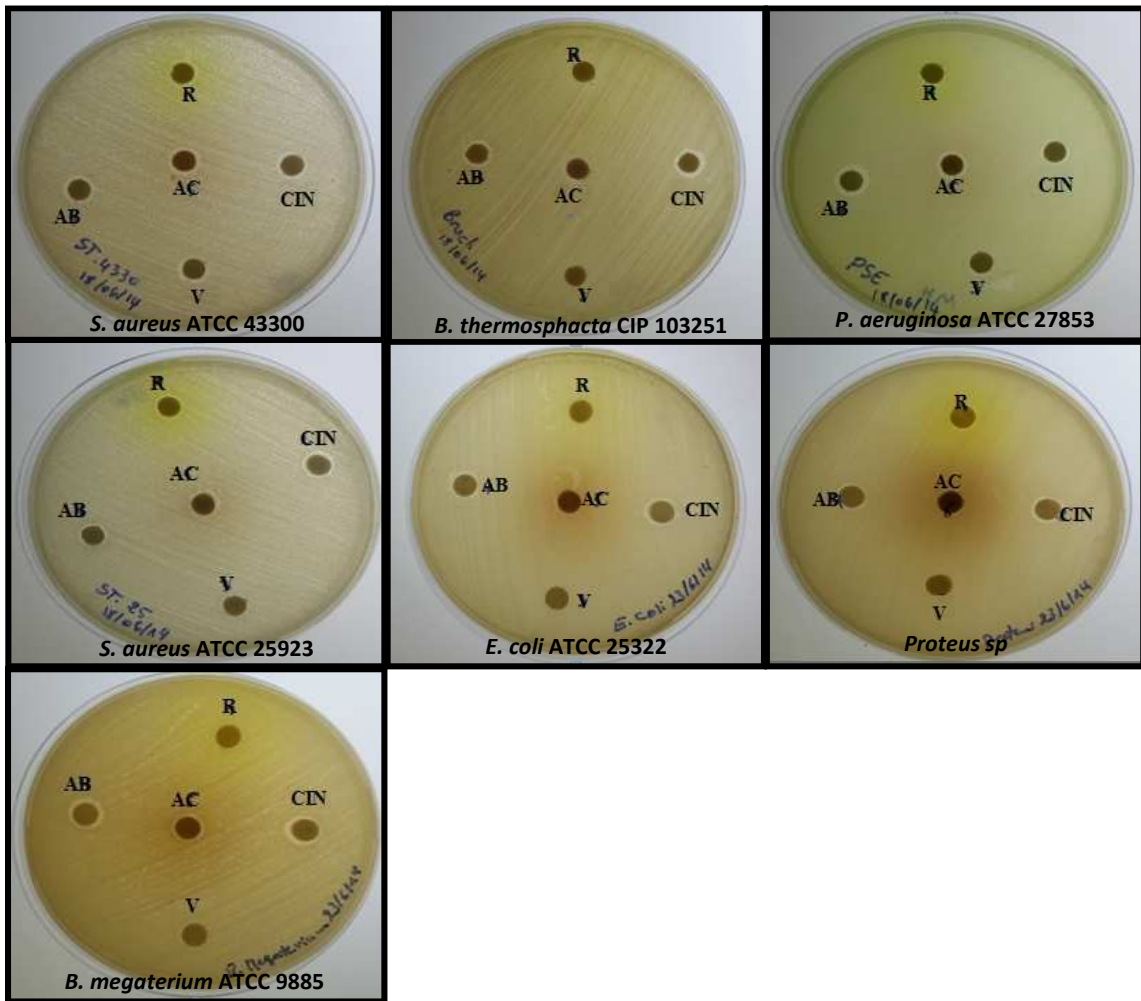
- Peptone 10g
- Extrait de viande 3g
- Extrait de levure 3g
- Chlorure de sodium 5g
- Agar 18g
- PH=7,3 ± 0,2
- Stérilisation à 120°C/15 min.

Annexe 2.

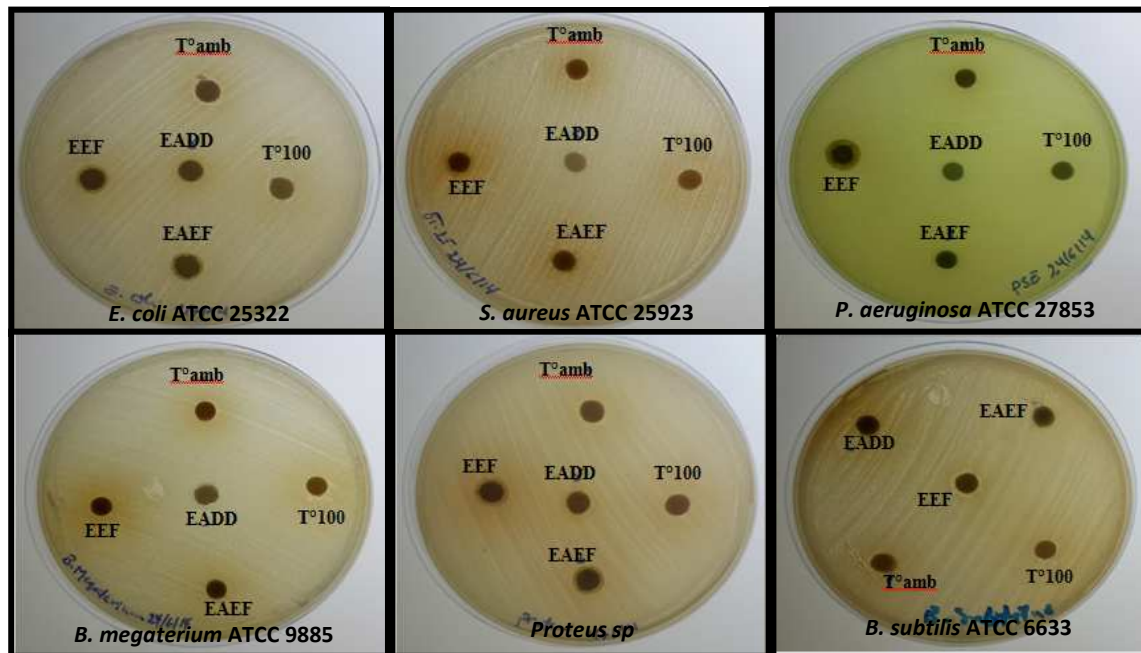
a)- Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les CP commercialisés.



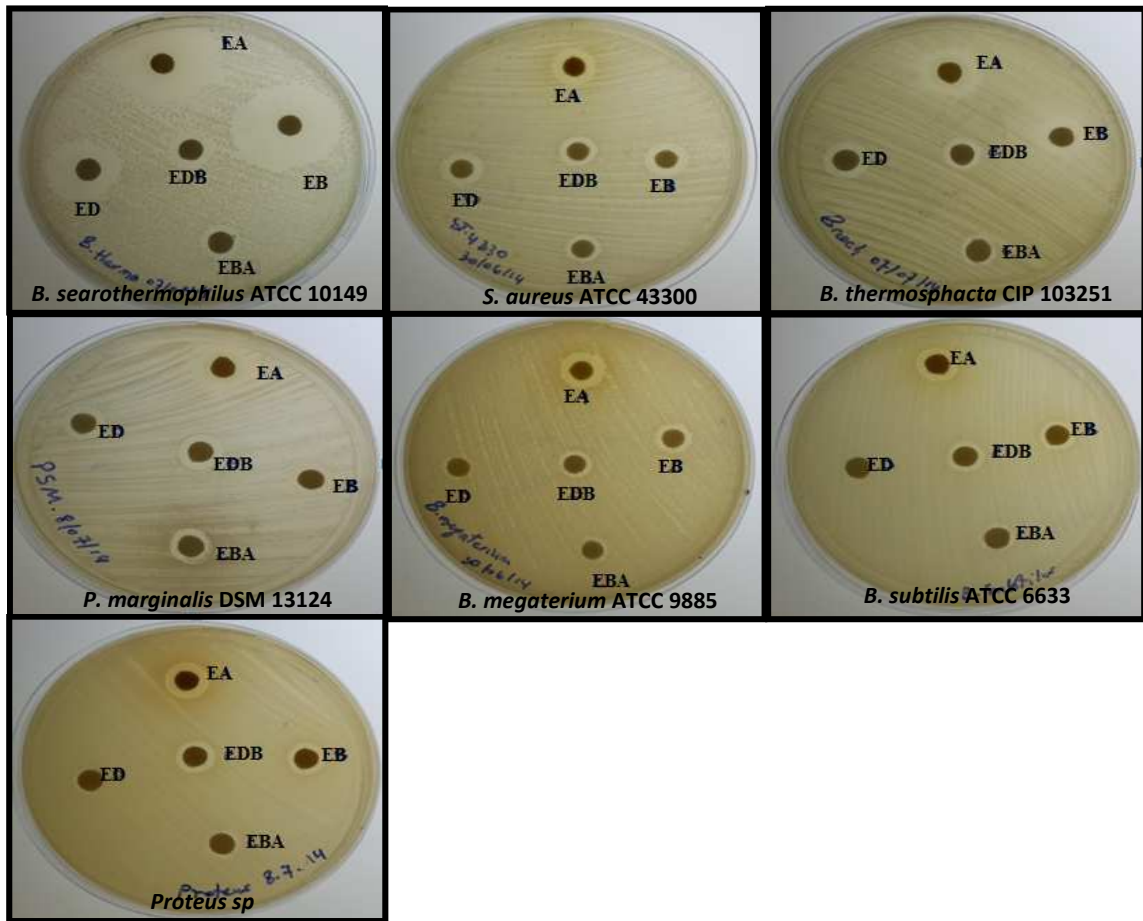
b)- Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les CP commercialisés.



- Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les extraits de feuilles de l'olivier.



a)- Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les extraits de margines.



b)- Photos montrant les zones d'inhibitions provoquées par les extraits de margines.

