

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem

Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Kharous Adel et Benazzouzi Youness

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN NUTRITION ET PATHOLOGIE

Spécialité: Nutrition et pathologie

THÈME

Activité antibactérienne des feuilles de l'olivier

Olea europea L. subsp. europaea

var. sylvestris lehr

Soutenue publiquement le /09/2020

DEVANT LE JURY

Présidente	Melle ZERROUKI. K	Grade MCB	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. BOUKEZZOULA. N	Grade MAA	U. Mostaganem
Co-encadreur	Mme. HAMED. J	Grade Doctorante	U. Mostaganem
Examineur	Mr CHAALEL. A	Grade MCA	U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de LMBAFS

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

Avant tout, nous remercions **Dieu** le tout puissant, le Miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance.

Nous remercions profondément nos encadreur **Mme Boukezzoula .N** pour leurs soutien et les efforts fournis pour nous diriger vers la bonne voie et *pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.*

Nos vifs remerciements pour les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce modeste travail.

. Nous souhaitant ensuite d'adresser nos remerciements les plus sincères à **Mme. Djahira** responsable de laboratoire de LMBAFS.

On n'oublie pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je remercie tout d'abord, Allah, le tout puissant et clément de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ensuite ce fameux travail aux deux êtres les plus chers au monde qui ont souffert nuit et jour Pour nous couvrir de leur amour : mes parents.

A mon père pour sa patience avec moi et son encouragement.

A ma source de bonheur la prunelle de mes yeux ma mère

Que le bon dieu vous garde en bonne santé.

A mes très chers frères et sœurs et toute ma famille sans exception.

*A mon encadreur Mme **Boukezzoula. N** qui mérite tous mon respect et tribut*

Pour mes chers amis : Jamal, Bachir et Ali.

A toute la promotion 2019/2020

Adel

Dédicace

Je remercie tout d'abord, Allah, le tout puissant et clément de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ensuite ce fameux travail aux deux êtres les plus chers au monde qui ont souffert nuit et jour Pour nous couvrir de leur amour : mes parents.

A mon père pour sa patience avec moi et son encouragement.

A ma source de bonheur la prunelle de mes yeux ma mère

Que le bon dieu vous garde en bonne santé.

A mes très chers frères et sœurs et toute ma famille sans exception.

*A mon encadreur Mme **Boukezzoula. N** qui mérite tous mon respect et tribut*

Pour mes chers amis : Mohammed, Amine et Khaled,

A toute la promotion 2019/2020

Youness

Résumé

Notre travail a pour objectif d'évaluer les effets antibactériens d'extrait des feuilles d'olivier vis-à-vis sept souches pathogènes : *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATTC, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 par méthode de diffusion en puits sur agar AWDT et la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

L'évolution de cet effet antibactérien montre que la zone d'inhibition la plus intéressante mesurée sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, tandis que le diamètre d'inhibition inférieur (08 mm) par la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Le classement des souches selon un ordre décroissant de leur sensibilité : *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 diamètre d'inhibition de 30 mm, *Bacillus cereus* ATCC10876 de diamètre d'inhibition de 25 mm, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 diamètre de 14 mm, *Escherichia coli* ATCC 25922 diamètre d'inhibition de 12 mm, *Klebsiella pneumoniae* ATTC 13883 diamètre de 10 mm, de diamètre de 09 mm pour *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 un diamètre de 08 mm.

Les valeurs enregistrées de CMI la plus élevée est de 100 µg/mg pour *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, alors que la CMI la plus faible a été enregistrée est 25 µg/ml pour *Klebsiella pneumoniae* ATTC 13883.

Mots-clés : *Olea europea* - Activité antimicrobienne – souches pathogènes – CMI.

Abstract

Our work aims to know the evaluation of the antibacterial effects of extract of olive leaves against seven pathogenic strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATTC, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 by AWDT agar well diffusion method and Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

The evolution of this antibacterial effect shows that the most interesting zone of inhibition measured on the *Staphylococcus aureus* strain ATCC 33862, while the lower diameter of inhibition (08 mm) by the strain *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Classification of the strains By order of decreasing sensitivity : *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 inhibition diameter of 30 mm, *Bacillus cereus* ATCC10876 of inhibition diameter of 25 mm, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 diameter of 14 mm, *Escherichia coli* ATCC 25922 diameter inhibition of 12 mm., *Klebsiella pneumoniae* ATTC 13883 diameter of 10 mm, diameter of 09 mm for *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a diameter of 08 mm.

The highest recorded MIC values are 100 µg / mg for *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, while the lowest recorded MIC is 25 µg / ml for *Klebsiella pneumoniae* ATTC 13883.

Keywords: *Olea europea* - Antimicrobial activity - pathogenic strains - MIC.

Liste des abréviations

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

ARN : Acide Ribonucléique

LDL : Lipoprotéine de faible densité

VLDL : Lipoprotéine de très faible densité

CP : Composés Phénoliques

DNID : Diabète Non Insulino- Dépendant

- **LMBAFS** : Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé.

- **ATCC** : American Type Culture Collection.

- **AWDT** : Agar Well Diffusion Test

- **CMI** : Concentration Minimal Inhibitrice

Tsh : thyroestimuline hormone

- ***E. coli*** : *Escherichia coli*.

- ***C. albicans*** : *Candida albicans*.

B. Cereus : *Bacillus Cereus*

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

S. Aureus : *Staphylococcus aureus*

TIA : toxi-infection alimentaire

Les MIA : maladies infection alimentaires

ECEP : *Escherichia coli* entéro-pathogène

ADN : acide désoxyribonucléique

USI : les unités de soins intensifs

LPS : lipo-polysaccharides

IVU : infections des voies urinaires

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimé en g/100 g de matière fraîche)	25
Tableau 2 : principales méthode d'extraction de polyphénols	28
Tableau 3 : Effets bénéfiques de l'oleuropéine	30
Tableau 04 : La nature et l'origine de différentes souches pathogènes utilisées	49
Tableau 5 : Composition de bouillon nutritif (g/l).....	52
Tableau 6 : Composition de Mueller Hinton (g/l).....	52
Tableau 07: diamètres des zones d'inhibition (mm) d'extrait des feuilles d'olivier vis-à-vis des souches bactériennes et des champignons.....	58
Tableau 08 : Diamètre des zones d'inhibition (en mm) en présence d'extrait brut des feuilles d'olivier vis- à-vis de <i>Bacillus cereus</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Tableau 09: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) en présence d'extrait brut des feuilles d'olivier vis- à-vis de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Escherichia coli</i>	60
Tableau 10: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) en présence d'extrait brut des feuilles d'olivier vis- à-vis de <i>candida albicans</i>	62
Tableau 11: valeurs des CMI des souches bactériennes	65

Liste des figures

Figure 1 : <i>Olea europea</i> subsp <i>sylvestris</i>	20
Figure 2: Répartition de l'olivier dans la méditerranée (Carrion et <i>al.</i> , 2010)	22
Figure 3: Structure chimique de l'oleuropéine	23
Figure 4 : Les étapes de l'extraction les feuilles d'olivier	50
Figure 5 : Méthode d'extraction des feuilles d'olivier	51
Figure 6 : La méthode de diffusion en puis AWDT	54
Figure 7 : Représentation graphique de rendement d'extraction d' <i>Olea europea</i>	57
Figure 08 : Pouvoir antibactérien d'extrait brut (des feuilles d'olivier) par la méthode de diffusion en puits vis à vis des souches gram positifs	59
Figure 9: Diamètres des zones d'inhibition en (mm) vis- à-vis de <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i>	59
Figure 10 : Pouvoir antibactérien d'extrait brut (des feuilles d'olivier) par la méthode de diffusion en puits vis à vis des souches gram	60
Figure 11: Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) vis- à-vis Les souches gram négatifs <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
Figure 12 : Pouvoir antibactérien d'extrait des feuilles d'olivier vis-à-vis des champignons.....	61
Figure 13: Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition d'extrait des feuilles d'olivier en (mm) vis- à-vis de <i>Candidas albicans</i>	62
Figure 14: Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition d'extrait des feuilles d'olivier en (mm) vis- à-vis des souches pathogènes	63
Figure 15: Représentation graphique des valeurs des CMI	66

Table de matière

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des tableaux et des figures

Table des matières

Introduction

PARTIE 01 : Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Olea europea*

I.1. Généralité sur l'olive

I.2. *Olea europea sylvestris*

I.2.1. Classification botanique

I.2.2. Description botanique

I.2.3. Répartition géographique

I.2.4. Composition chimique

I.2.5. Propriétés biologiques

I.3. Les feuilles d'olivier

I.3.1. Composition chimique

I.4. Composés phénoliques des feuilles d'olivier

I.4.1. Généralités sur les composés phénoliques

I.4.2. Classification des composés phénoliques

I.4.3. Principales voies de biosynthèse des composés phénoliques

I.4.5 Extraction des polyphénols

I.4.6. Activités biologiques des composés phénoliques

I.4.7. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques

I.5. Les principales propriétés des feuilles d'oliviers

I.5.1. Propriétés anti-oxydantes

I.5.2. Propriétés hypotensives

I.5.3. Propriétés hypoglycémiantes

I.5.4. Propriétés antimicrobiennes

I.5.5. Propriétés hypocholestérolémiantes

I.6. domaines utilisations

Chapitre II : Activité antagoniste des bactéries

II.. Généralité sur les bactéries

II.1. *Escherichia coli*

II.1.1. Pathogénicité

II.1.2. Épidémiologie

II.2. *Staphylococcus aureus*

II.2.1. Pouvoir pathogène

II.3. *Pseudomonas aeruginosa*

II.3.1. Toxicité

II.4. *Klebsiella*

II.4.1. Caractéristiques

II.4.2. Mode de transmission

II.4.3. Transmissibilité

II.5. *Bacillus cereus* pathogènes

II.5.1. Morphologie et composition

II.5.2. Pouvoir pathogène

II.5.3. Épidémiologie

II.6. *Candida albicans*

II.6.1. Morphologie

II.6.2. Mode de transmission

II.6.3. Pathogénicité et toxicité

II.7. *Proteus mirabilis*

I II.7.1. Caractéristiques

II.7.2. Mode de transmission

II.7.3. Pathogénicité

Deuxième Partie : Partie Expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1. Matériel

I.1.1. Lieu de stage

I.1.2. Matériel végétal

I.1.2.1. Récolte des feuilles d'olive

I.1.3. Matériel bactérien utilisé

I.2. Méthode

I.2.1. Extraction des feuilles d'olive

I.2.2. Les milieux de culture utilisée

I.2.2.1. Milieu **D**e Bouillon Nutritif

I.2.2.2. Milieu de Muller Hinton

I.2.3. Réactivation des souches indicatrices

I.2.4. Méthodes de diffusion en puis AWDT

I.2.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Test de confirmation des souches bactériennes

II.2. Détermination de l'activité antibactérienne des feuilles d'olivier

II.3. Méthode de diffusion en puits AWDT

II.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Conclusion

Références bibliographique

Introduction

Introduction

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

L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques (**Djenane *et al.*, 2012**). Par ailleurs, les feuilles d'olivier sont connues par leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine, due à leurs richesses en composés phénoliques, notamment l'oleuropéine (**Bisignano *et al.*, 1999 ; Sudjanan *et al.*, 2009 ; Aouidi, 2012**).

Ces composés possèdent entre autres un large éventail d'activités biologiques : antioxydante (**Benavente-Garcia *et al.*, 2000; Dekanski *et al.*, 2011**), antivirale (**Micol *et al.*, 2005**), antimicrobienne (**Aziz *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 2008; Lee et Lee, 2010; Susalit *et al.*, 2011**) qui les rendent très importants pour les domaines de la santé publique et l'industrie agroalimentaire.

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

Notre travail a pour objectif de déterminer l'éventuelle activité antimicrobienne de l'extrait des feuilles d'olive vis-à-vis de différents souches bactériennes pathogènes à Gram négatif et à Gram positif ainsi les champignons.

Chapitre I :

Synthèse

bibliographique

I.L' Olivier

I.1. Historique

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

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

I. 2. Caractéristique de l'olivier

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

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

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

I.3. L'olivier sauvage (*Olea europaea sylvestris*)

Les produits végétaux sauvages récoltés ont généralement une valeur soit de consommation, de subsistance ou commerciale. Parmi eux, on retrouve les arbres d'oliviers sauvages, connus sous le nom oléastres (*Olea europaea subsp europaea var sylvestris*) (**Campbell et Luckert, 2002**).

Les populations d'oliviers sauvages sont distribuées dans différents environnements, avec des altitudes différentes et des sols qui peuvent être une source très importante de sa résistance aux stress abiotiques tels que la sécheresse, le sel, le vent et la baisse de température (**Aranda et al., 2011**).

Pour les botanistes, l'olivier normal est appelé *Olea europaea* subsp *europaea* var *Europe*, alors que l'oléastre est de variété *sylvestris*. L'olivier est cultivé tandis que l'oléastre est sauvage. L'olivier peut s'échapper des cultures et revenir à un état apparemment sauvage. Dans la plupart des pays, certains cultivars portent des fruits de petite taille, comme, «Arbequina» en Espagne, ou «Cailletier» en France (**Breton et al., 2008**).

Depuis l'antiquité, l'olivier a façonné le paysage méditerranéen (**Doveri et Baldoni, 2007**). Il est connu chez les phéniciens depuis la haute antiquité ; il est désigné par le mot zeitoun, ce mot est couramment employé dans le vocabulaire Amazigh (**Boudribila, 2004**). Cependant, l'olivier sauvage est désigné par le mot zebbouj, berb (**Jacques-Meunié, 1982**). Cette appellation est celle utilisée dans notre langage.

L'olivier cultivé (*O. europaea* L. var. *sativa*) a été dérivé de la domestication de l'olivier sauvage ou l'oléastre (*O. europaea* L. subsp. *sylvestris*), car ils sont semblables à la forme sauvage (**Zohary, 1973**).

L'olivier sauvage africain *Olea europaea* ssp. *Cuspidata* est un arbre précieux de la forêt afro-montagnarde sec, capable de se régénérer naturellement (**Aerts et al., 2006**). Les formes sauvages de l'olivier (oléastres), sont toujours membres du maquis naturel (**Green, 2002**).

L'utilisation de la population d'oliviers sauvages peut être également une autre alternative pour la reproduction d'olive (**Guerin et al., 2003**).

➤ *Olea europaea* subsp *sylvestris*

L'oléastre est la forme sauvage de l'olivier (*Olea europaea* subsp *sylvestris*), c'est un arbuste buissonnant (Fig. 1) de 6 m de haut, avec un tronc lisse et gris, les branches régulières, il a la particularité de posséder des rameaux épineux, de petites feuilles et de petites fleurs blanc jaunâtre. Les fruits sont moins charnus et fournissent moins d'huile. Il pousse dans le maquis de la zone littorale, sur des sols schisteux ou il forme des fourrés denses en compagnie d'autres arbustes, notamment le lentisque (**Polese, 2009**).



Figure 1 : *Olea europaea* subsp. *Sylvestris* station de chaaba elhamra (originale,2020)

I.4.Classification :

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé "Olea" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce cultivée en Méditerranée est "*Olea europaea* ", dans laquelle on trouve l'oléastre ou l'olivier sauvage, et l'olivier cultivé. La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon (**Ghedira., 2008**) est la suivante :

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre: Olea L.

Espèces: *Olea europaea* L.

Sous-espèces : *Olea europaea* L. ssp.Oleaster Hoffm.et Link (= *O. europaea* L. ssp. *Sylvestris* Miller)

I.5. Description botanique:

L'olivier est sempervirent, c'est-à-dire qu'il est toujours vert, ses feuilles sont lancéolées, vert grisâtres. Ses fleurs s'épanouissent en petites grappes blanches, chaque grappe donnera un seul fruit. Son fruit ovoïde (drupe), il a un noyau fusiforme. Son bois très dur est imputrescible et est utilisé en ébénisterie (**Artaud, 2008**).

L'oléastre diffère de l'olivier cultivé par la présence des pousses courtes et épineuses, des fruits de petite taille, une faible teneur en huile (**Terral et Arnold-Simard, 1996**). Les feuilles de l'olivier sauvage sont de courte longueur, de largeur moyenne. Les fruits de la plupart des oliviers sauvages en une forme elliptique, et avec un faible poids.

Une corrélation élevée et significative des dimensions du fruit et la teneur en huile a été observée. Cela pourrait être d'intérêt pour l'utilisation des oliviers sauvages. En dépit de cela, il convient de mentionner que les oliviers sauvages avec des poids de fruits 1,3 g et le pourcentage d'huile d'olive dans la matière sèche 33,8 % est comparable aux valeurs mentionnées pour certains cultivars d'oliviers (**Hannachi et al., 2008**).

I.6.Répartition géographique:

L'olivier (*Olea europaea* subsp *europaea* var *europaea*) est l'une des plus anciennes cultures d'arbres agricoles dans le bassin méditerranéen avec une importance culturelle et économique remarquable. En fait, à ce jour, plusieurs travaux se sont concentrés sur l'évaluation de la distribution et de la variabilité entre les olives cultivées et sauvages (**Lavee, 2013**).

Plusieurs centaines de divers cultivars d'oliviers géographiquement existent dans le bassin méditerranéen. Ils se distinguent par la morphologie des feuilles, la forme de drupe et la couleur, la composition de l'huile et de la phénologie (adaptation avec les climats) (**Breton et al., 2008**). Les populations d'olivier sauvage sont limitées à quelques secteurs isolés des forêts natales de la Méditerranée, où le pollen peut être distribué par le vent et les oiseaux (**Lumaret et al., 2004**).

La sélection de nouveaux cultivars de la population de l'olivier sauvage devient problématique, même dans les régions où l'olivier est très répandu, dus à la diminution graduellement à cause de l'augmentation des oliviers domestiques dans les vergers. D'autre part, la pollinisation croisée entre les oliviers sauvages restants et les cultivars domestiqués plantés pourraient conduire à une augmentation des olives sauvages (**Lavee, 2013**).

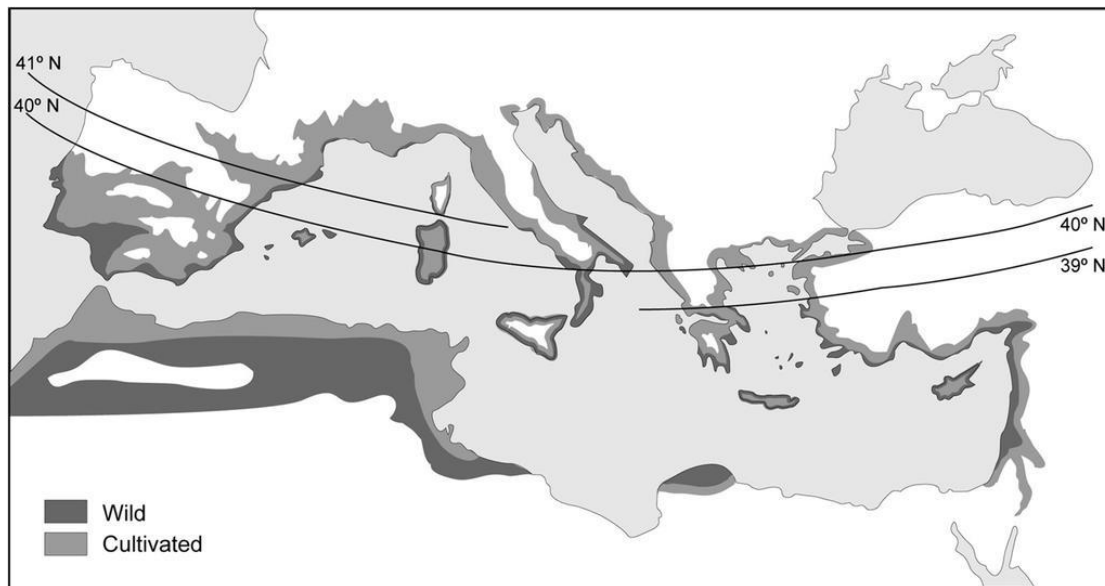


Figure 2: Répartition de l'olivier dans la méditerranée (Carrion *et al.*, 2010).

I.7.Composition chimique

Des études récentes ont montré que les olives contiennent des antioxydants en abondance (jusqu'à 16g/kg), représentés par les actéosides, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et les acides phénylpropioniques ainsi que d'autres composés (Owen *et al.*, 2004).

L'huile d'olive se caractérise par son parfum délicat et unique. Cet arôme très particulier est dû à toute une gamme de composants présents en très faibles quantités tels que les alcools, les composés polyphénoliques, la chlorophylle, les caroténoïdes, les stérols, les tocophérols et les flavonoïdes.

Certains de ces composés dont les tocophérols et les phénols, jouent un rôle important comme antioxydants naturels qui piègent les radicaux libres de l'oxygène et préservent la qualité et la stabilité de l'huile durant des périodes prolongées de conservation, ainsi ils contribuent à la qualité organoleptique comme le goût, la saveur et la valeur nutritive (Doveri et Baldoni, 2007).

Elle a aussi d'excellentes propriétés nutritionnelles, sensorielles et fonctionnelles et est un produit agricole avec une importance économique majeure dans la région méditerranéenne. L'huile d'olive vierge est particulièrement appréciée pour sa grande stabilité par rapport aux autres huiles végétales et de sa teneur élevée en constituants tels que les acides gras monoinsaturés (AGMI) et les composés phénoliques (Bendini *et al.*, 2006).

Les acides gras dominants sont les acides gras monoinsaturés (AGMI) dont l'acide oléique (C 18:1), et les acides gras polyinsaturés (AGPI) dont l'acide linoléique (C 18 : 2) et l'acide

Les polyphénols de l'olivier ont une énorme capacité à piéger les radicaux libres et montrent un comportement synergique lorsqu'ils sont combinés, ce qui se déroule naturellement dans les feuilles d'olivier et donc dans leurs extraits (**Polzonetti et al., 2004**).

Parmi ces polyphénols, l'hydroxytyrosol et tyrosol qui contribuent au goût amer, astringence, et à la résistance à l'oxydation (**Visioli et Galli, 2002**).

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

Il est mentionné par certains auteurs que l'extrait de feuille d'olivier réduit la pression artérielle et le cholestérol du plasma chez les rats (**Perrinjaquet-Moccetti et al., 2008**). De plus, les acides gras mono-insaturés disponibles dans les feuilles d'olivier tels que l'acide oléique, diminuent les lipides du plasma dont les LDL et VLDL et préviennent des maladies cardio-vasculaires (**Huang et al., 2010**).

L'extrait de feuilles d'olivier peut contenir des traces d'éléments vitaux tels que le sélénium, le fer, le zinc, la vitamine C, la β -carotène et une grande partie d'acides aminées (**Polzonetti et al., 2004**). Les feuilles contiennent aussi du cinchonidine, un alcaloïde quinoléique aux propriétés antipaludiques. Les feuilles, l'écorce et les fruits contiennent l'oleuropéine qui possède des activités antioxydantes, hypotensives, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes et antiseptiques (**Ghedira, 2008**).

II. Feuilles d'olivier

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

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

Les feuilles sont opposées sur les branches et les rameaux. Elles sont inodores, amères et acerbes, elles se renouvellent par tiers tous les trois ans, jaunissent et tombent principalement en été (**Anginot et Isler, 2003**). La face supérieure est de couleur vert foncé ou vert-gris lisse et luisante, est recouverte d'une épaisse cuticule; la face inférieure est plus claire; de

couleur argentée et est recouverte surtout le long de la nervure médiane et des principale nervures latérales d'un fin duvet de petits poils qui peuvent retenir la plus infime quantité d'humidité ce dernier est détachable par grattage (Polese., 2009 ; Rombi *et al.*, 2015).

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

II.2. Composition chimique

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

Tableau 1 : Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimé en g/100 g de matière fraîche).

Composition en %	Garcia- Gomez <i>et al.</i> , 2003	Martin- Garcia <i>et al.</i> , 2006	Boudhrioua <i>et al.</i> , 2009	Erbay et Icier, 2009
Eau	Nd	41,4	46,2-49,7 A	49,8 A
Protéines	Nd	Nd	5-7,6 A	7 B
Lipides	6,2 B	3,2 B	1-1,3 A	6,5 A
Minéraux	26, B	16,2 B	2,8-4,4 A	3,6 B
Glucides	Nd	Nd	37,1-42,5 A	27,5 A
Fibres brutes	Nd	Nd	Nd	7 A
Cellulose	19,03 B	Nd	Nd	Nd
Hémicellulose	25,4 B	Nd	Nd	Nd
Legnine	30,4 B	Nd	Nd	Nd
Polyphénols totaux	Nd	2,5 B	1,3-2,3 B	Nd

Tannins lubles	Nd	Nd	Nd	Nd
Tannins condensés	Nd	0,8 B	Nd	Nd

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

II.3.Composés phénoliques des feuilles d'olivier

II.3.1.Généralités sur les composés phénoliques

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

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

La désignation «polyphénols» est fréquemment utilisée dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, elle devrait être réservée aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux.

Donc la désignation générale CP concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (**Collin et al., 2011**).

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

II.3.2. Classification des composés phénoliques

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

➤ **Crozier et al. (2010)** ont séparé ces composés en deux catégories : les flavonoïdes et les non flavonoïdes.

➤ **Manach et al. (2004)** distinguent six sous classes de *flavonoïdes*.

➤ **Harbone et Simmonds (1964)** ont classifié les composés phénoliques en groupes en se basant sur le nombre du carbone dans la molécule.

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

II.3.3. Principales voies de biosynthèse des composés phénoliques

les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

a) La voie de l'acide shikimique, conduit des oses aux amino-acides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers aux acides cinnamiques et à leurs dérivés.

b) La voie de l'acide acétique, conduit à des poly- β -cétosters (polyacétates) de longueur variable, qui engendrent par cyclisation ou condensation, des composés souvent polycycliques : les flavonoïdes et les tannins condensés (**Bruneton ,2009**).

II.3.4. Extraction des polyphénols

D'après **Vercauteren et Cheze (1998)**, les solvants d'extraction jouent un rôle capital en assurant le transfert de phase du produit à extraire. Au départ, la matière première qui est un mélange hétérogène (solide végétal ou liquide de fermentation), est soumise au contact d'un solvant (liquide) afin d'obtenir un extrait primaire complexe utilisable directement.

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

L'extraction des composés phénoliques se fait selon plusieurs méthodes, les plus utilisées et employées sont résumées dans le tableau 2

Tableau 2 : Principales méthodes d'extraction de polyphénols.

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

II.3.5. Activités biologiques des composés phénoliques

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

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

vieillessement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires) (Leong et Shui, 2002).

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

II.3.6. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques

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

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

a) Monomères phénoliques

Selon Altiok *et al.* (2008) les monomères phénoliques sont représentés par :

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

b) Polymères phénoliques Les polymères phénoliques sont représentés par :

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

c) L'oleuropéine

L'oleuropéine ou oleuropéoside, un hétéroside sécoiridoïde, est présent dans l'olivier et ses produits dérivés (huile d'olive, margines et grignons). C'est le composé

bioactif le plus abondant et majeur dans les feuilles d'olivier la teneur moyenne varie de (60- 90 mg/g) (Araças, 2013 ; Talhaoui *et al.*, 2015).

L'oleuropéine possède de nombreux effets bénéfiques (Tab.3). Ces derniers sont résumés ainsi ;

Tableau 3 : Effets bénéfiques de l'oleuropéine.

Effets bénéfiques de l'oleuropéine	Références
Antioxydant	Benavente-Garcia <i>et al.</i>, 2000
Antimicrobien	Pereira <i>et al.</i>, 2007
Antiviral	Micol <i>et al.</i>, 2005
Anti-inflammatoire	Visioli <i>et al.</i>, 1998
Cardio-protecteur	Andreadou <i>et al.</i>, 2006
Neuro-protecteur	Omar, 2010
Anti-tumoral	Hamdi et Castellon, 2005
Inhibe l'activité du facteur d'activation des plaquettes	Andrikopoulos <i>et al.</i>, 2006
Amélioration du métabolisme des lipides	Polzonetti <i>et al.</i>, 2004

II.3.7. Les principales propriétés pharmacologiques des feuilles d'oliviers

1. Propriétés anti-oxydantes

Les propriétés antioxydantes de la feuille d'olivier ont clairement été mises en évidence. Elles sont attribuées aux phénols, plus particulièrement à l'acide malique à l'oleuropéoside et à l'hydroxytyrosol (Rombi *et al.*, 2015). Les propriétés antioxydantes sont référées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH•) et superoxydes (O₂•) (Rice-Evans *et al.*, 1995; Bartosz, 2003)

2. Propriétés hypotensives

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

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

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

3. Propriétés hypoglycémiantes

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

- Augmentation de la libération d'insuline induite par un pic de glucose sanguin lors des repas ainsi permettre une meilleure absorption cellulaire du glucose.
- Provocation de l'augmentation de l'utilisation périphérique du glucose, ce qui va entraîner une seconde diminution de la glycémie. (Al-Azzawie *et al.*, 2006). L'acide oléanolique aurait aussi des propriétés hypoglycémiantes, cette molécule ralenti la prise du poids induit par une forte consommation de graisse et dispose d'un puissant potentiel contre l'hyperglycémie, et donc une forte action contre le DNID (diabète non insulinant dépendant) (Sato *et al.*, 2007).

4. Propriétés antimicrobiennes

L'extrait de feuille d'olivier renforcerait le système immunitaire et permettrait de lutter contre de nombreux agents infectieux; bactéries, parasites, virus et certains champignons. (Walker, 2000 ; Lee-Huang *et al.*, 2003 ; Markin *et al.*, 2003 ; Sudjana *et al.*, 2009), L'extrait de feuilles d'olivier interfère avec les infections virales et leur diffusion en désactivant les cellules virales spécifiques, ou en inhibant leur prolifération et leur croissance à la membrane cellulaire.

- L'extrait de feuilles d'olivier interfère avec la production d'acides aminés, essentiels à la survie des microbes spécifiques, qu'ils soient virus, bactéries, parasites ou champignons.
- Il neutralise également la protéase nécessaire au rétrovirus pour modifier l'ARN d'une cellule saine.
- L'extrait de feuilles d'olivier peut entrer dans les cellules humaines altérées, et inhiber la reproduction microbienne.
- L'extrait de feuilles d'olivier peut directement stimuler la formation de cellules immunitaires pour combattre de nombreux types de microbes (**Sudjana *et al.*, 2009**)

5. Propriétés hypocholestérolémiante

Cette action hypocholestérolémiante est associée à une diminution du LDL-C, des LDL oxydées et des triglycérides (**Bennani-Kabchi *et al.*, 1999 ; Somova *et al.*, 2002**).

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

II.3.8. Domaines d'utilisation des feuilles d'olivier

✓ **Domaine de l'alimentation animale**

Les feuilles sont utilisées dans l'alimentation des moutons et chèvres (**Delgado-Pertinez *et al.*, 2000 ; Martin-Garcia *et al.*, 2003**). Elle sont également utilisées dans l'alimentation des cailles pour améliorer la qualité de leurs œufs (**Botsoglou *et al.*, 2010**).

✓ **Domaine thérapeutique**

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

✓ **Domaine pharmaceutique**

La valorisation concerne l'extraction des tocophérols et de l'oleuropéine, ainsi que la production de l'hydroxytyrosol (**De Lucas *et al.*, 2002; Bouaziz et Sayadi, 2003**).

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

✓ **Domaine cosmétologique**

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

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

✓ **Industries Alimentaires**

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

III. Les bactéries lactiques

Les bactéries pathogènes sont les bactéries susceptibles d'entraîner des maladies, les TIA (toxi-infection alimentaires), ou intoxications, qui apparaissent lorsque ces bactéries produisent des toxines: botulisme. Les MIA (maladies infection alimentaires) qui sont dues au développement des bactéries dans l'organisme, après ingestion d'un aliment contaminé: gastro-entérites, listérioses, fièvres typhoïdes, brucellose.

Les **bactéries pathogènes** sont des bactéries responsables d'une maladie même chez le sujet sain " (ex typhoïde, choléra, tuberculose, méningite...).

Le **pouvoir pathogène** conditionne le type de maladie et va dépendre de l'espèce bactérienne responsable de l'infection. Par exemple, le choléra dont l'agent est *Vibrio cholerae* est une maladie complètement différente de la méningite à méningocoque. Cette notion de pouvoir pathogène est à distinguer de celle de virulence. Ces bactéries pathogènes peuvent (pneumocoque, *Haemophilus*, méningocoque..) ou non (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*..) appartenir à la flore humaine commensale. Pour certaines bactéries, comme le méningocoque (agent

de la méningite cérébrospinale), le portage sain dans le nasopharynx est la situation de loin la plus fréquente, la maladie est l'exception puisqu'elle ne touche qu'un porteur sain sur 10 000. Ce point souligne que pour ces bactéries qui en réalité appartiennent à la flore commensale de l'homme bien que "pathogènes", il existe une susceptibilité individuelle qui peut être l'âge (plus fréquentes chez les jeunes enfants) ou propre à certains individus, de nature encore indéterminée (**Thierry, 2008**).

III.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un genre bactérien dans lequel on ne retrouve qu'une seule espèce mais il existe plus de 1.000 types antigéniques. Ces sérotypes sont définis selon leurs antigènes somatiques O (171), capsulaires K (80) et flagellaires H (56). De plus, K sont subdivisés en types A, B ou L. Le type B est rencontré exclusivement dans les souches associées aux diarrhées infantiles.

Assez court (2 à 3 µm x 0.7 µm), isolé, groupé par 2 ou plus rarement en amas. *Escherichia* peuvent apparaître sous forme coccobacillaire ou filamenteuses dans les vieilles cultures. Mobilité, péritriche très réduite, voire immobiles (ex sérotype O111) parfois capsulés (antigène A). Sa culture est très facile avec une grande tolérance de variation du pH, pH optimum 7.5. La température optimum est de 37°C mais pousse entre 15°C et 45°C.

Il résiste bien à la chaleur incubé à 45°C il fermente le glucose, le mannitol et le lactose avec production importante de gaz.

Il reste relativement sensible aux antibiotiques, Il réduit les nitrates en nitrites. Il fermente irrégulièrement le saccharose et la salicine. Il dégrade le tryptophane en indole. La plupart possèdent une lysine décarboxylase (**Pouffer, 2008**).

III.1.1. Pathogénicité

.a. Infection urinaire *Escherichia coli* est la bactérie le plus souvent en cause dans les infections urinaires communautaires qu'elles soient basses (cystite) ou hautes (pyélonéphrite). L'infection des voies urinaires se fait en générale par voie ascendante. Elle est plus fréquente chez la femme en raison de la brièveté de l'urètre. La gravidité augmente le risque de pyélonéphrite. Chez l'homme, l'infection est également secondaire à un obstacle sur les voies urinaires. Elle peut se compliquer de prostatite. *E. coli* est souvent impliquée dans les infections urinaires nosocomiales (**Nauciel et Vildé, 2005**).

.b. Infection intestinale à *E. coli* peut être responsable de gastro-entérites ayant des traductions cliniques variables : diarrhée d'allure banale, diarrhée peut entraîner assez rapidement un état de déshydrations. Dans certains cas (surtout chez l'enfant) le diamètre peut être suivi d'un syndrome hémolytique et urémique Les diarrhées dues à *E. coli* sont probablement peu fréquente dans nos régions actuellement. Elles sont plus fréquentes dans les pays en voie de développement et peuvent atteindre les voyageurs qui les visitent (tourista). Elles relèvent de mécanismes physiopathologiques multiples qui seront discutés plus loin.

.c. Infection diverses à *E. coli* est impliqué dans de nombreuse infection à point de départ digestif ou urinaire : suppurations localisées ou septicémies. Il peut s'agir d'infections communautaires ou nosocomiales (Nauciel et Vildé, 2005).

III.1.2. Épidémiologie

Les bactéries ECEP typiques causent principalement la maladie chez le nouveau-né et le jeune enfant, la plupart des cas survenant chez des enfants de moins de 2 ans, en particulier ceux de moins de 6 mois. La maladie peut survenir chez les adultes si une quantité suffisante d'inoculum est ingérée (Wilson *et al.*, 2001). Des éclosions sont survenues dans des services pédiatriques hospitaliers, des pouponnières et des garderies, et chez des adultes ayant consommé des aliments contaminés provenant d'un buffet. Dans les pays en voie de développement, les infections à ECEP sont très courantes et sont une cause importante de maladies diarrhéiques et de décès attribuables à la déshydratation chez les enfants. Des études menées au Brésil, au Mexique et en Afrique du Sud ont démontré que de 30 à 40% des cas de diarrhée infantile peuvent être attribués à ECEP (Stuntes *et al.*, 2006). Les bactéries ECEP atypiques sont très répandues dans les pays développés et dans les pays en développement. Elles causent la maladie chez des sujets appartenant à une plus large fourchette de tranches d'âge et ont été associées à des éclosions dans des pays développés (Moura *et al.*, 2009).

III.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie de la famille des Micrococcaceae de forme sphérique (coque), de 0,8 Pm à 1,0 Pm de diamètre. Ces coques a Gram+ se présentent généralement en grappe, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture. C'est une bactérie non mobile, asporulée et aérobie facultatif possédant une catalase.

S. aureus est un microorganisme pathogène dont on connaît au moins deux types de manifestations cliniques chez l'homme. Les staphylocoques sont d'abord souvent mis en cause dans les cas de toxi-infections alimentaires où il y a production d'une entérotoxine thermorésistante responsable de gastro-entérites Ils sont également responsables d'infections rhinopharyngées et cutanée qui sont de loin prédominantes par rapport aux infections gastrointestinales (**Québec, 2000**).

III.2.1. Pouvoir pathogène

a. Lésions suppurées

Les plus fréquentes sont cutanées et sous-cutanées : folliculite, furoncles, anthrax, impétigo bulleux, panaris, surinfection de plaies traumatiques ou postopératoires. *S. aureus* est aussi responsable de mastites chez les femmes qui allaitent. *S. aureus* tient également une place dominante dans les infections osseuses primitives (ostéomyélite) ou post-chirurgicales, ainsi que dans les arthrites suppurées. Des atteintes pulmonaires peuvent s'observer notamment chez les nourrissons et chez les malades sous ventilation assistée, elles peuvent parfois se compliquer de pleurésie purulente (**Guiraud, 1998**).

b. Septicémies et endocardites

Les lésions suppuratives peuvent se compliquer de septicémie. Une forme particulière est la staphylococcie maligne de la face. Elle a pour origine furoncle de la lèvre ou de la narine qui se complique d'une thrombophlébite suppurée. Les toxicomanes utilisant la voie intraveineuse peuvent présenter des septicémies souvent accompagnées d'une endocardite du cœur droit. En milieu hospitalier, les septicémies à *S. aureus* représentent une proportion importante des septicémies d'origine nosocomiale. La porte d'entrée est souvent un cathéter intravasculaire. Toute fois certaines septicémies surviennent sans porte d'entrée apparente. Les septicémies à *S. aureus* se complique volontiers de métastases septique notamment au niveau du poumon et de l'appareil ostéo-articulaire, plus rarement au niveau de l'appareil urinaire ou du système nerveux centrale (**Nauciel et Vildé, 2005**).

c. Manifestation d'origine toxinique

Staphylococcus aureus est responsable d'intoxications alimentaires à incubation courte (quelques heures). Ces intoxications sont dues à l'ingestion d'aliments contaminés par le personnel les manipulant et conservés trop longtemps à température ambiante. L'infection à *S. aureus* est parfois à l'origine d'un syndrome dit de choc toxique staphylococcique. Ce syndrome associe une fièvre élevée, un rash scarlatiniforme, de la diarrhée et une hypotension accompagnée de signes de défaillance poly viscérale. Il entraîne une certaine mortalité. Il peut s'observer dans deux circonstances. Dans la première, le syndrome survient pendant les règles chez des femmes utilisant des tampons hyper absorbants. Dans la seconde, il s'agit de sujets de l'un ou l'autre sexe. Présentant une suppuration localisée à *S. aureus*. Dans certains cas l'infection staphylococcique peut s'accompagner d'une éruption scarlatiniforme sans état de choc associé. L'infection cutanée à *S. aureus* peut se traduire chez le nouveau-né par une dermite exfoliatrice (maladie de Ritter) (Nauciel et Vildé, 2005)

III.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 Pm de diamètre sur 1,5 à 3,0 Pm de longueur, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature monotriche (quelques rares cellules portent cependant plusieurs flagelles polaires), non sporulés, aérobies, à métabolisme strictement respiratoire, nitrate réductase positive et respirant les nitrates, catalase et oxydase positives.

Pseudomonas aeruginosa est capable d'utiliser des sucres comme source de carbone et d'énergie en produisant de faibles quantités d'acides. Cette acidification résulte toujours d'un métabolisme oxydatif, elle est toujours faible et elle ne s'observe que lorsque les conditions d'oxygénation sont bonnes (Euzéby, 2005).

III.3.1. Toxicité

Les *Pseudomonas* sont des agents pathogènes opportunistes qui envahissent souvent le tissu de leurs hôtes et causent une infection et une bactériémie chez les hôtes immunodéprimés (p. ex. VIH/sida, fibrose kystique du pancréas, bronchiectasie et maladie pulmonaire obstructive chronique sévère, brûlures, affection maligne ou diabète sucré) (Liu et Murcer ,1963). L'infection siège souvent dans les voies respiratoires inférieures et sa gravité varie, allant de la colonisation

sans réponse immunologique à la bronchopneumonie nécrosante sévère; une telle infection grave chez des patients atteints de fibrose kystique est presque impossible à éradiquer une fois qu'elle est établie dans les voies respiratoires (**banerje et stabelfrth ,2000**).

La pneumonie à *Pseudomonas* se développe souvent après une contamination oro-pharyngée ou une bactériémie secondaire et cause fréquemment une pneumonie nosocomiale liée à la ventilation mécanique dans les unités de soins intensifs. Parmi les autres infections possibles, citons l'endocardite, l'ostéomyélite, les infections urinaires, les infections gastro-intestinales, la méningite et, fréquemment, la septicémie (**Mena et Gerba, 2009**). *P. aeruginosa* est l'agent le plus souvent associé à l'infection et à l'inflammation causée par les lentilles cornéennes. La bactérie colonise les lentilles et produit des protéases pour détruire ou envahir les cellules de la cornée, infection qui peut mener à la formation de tissus cicatriciels et à une perte d'acuité visuelle.

Cette espèce est également la plus virulente, s'accompagnant d'un taux de mortalité de 30 %, qui peut être plus élevé selon les facteurs prédisposants. *P. aeruginosa* peut aussi coloniser facilement les brûlures ouvertes, causant des infections, des abcès et une septicémie, avec œdème et/ou décoloration de la peau non brûlée sur le pourtour de la plaie et pigmentation verte dans la graisse sous-cutanée. Il est également associé à l'otite du baigneur (otite externe). D'autres espèces du genre *Pseudomonas* sont également opportunistes, mais les cas d'infection sont rares (**Keyser et al., 2001**).

III.4. *Klebsiella*

Le genre *Klebsiella* rassemble des bacilles à Gram négatif, de 0,3 à 1,0 Pm de diamètre sur 0,6 à 6,0 Pm de longueur, se présentant de manière isolée, ou en groupés par deux ou groupés en courtes chaînes et présentant les caractères généraux de la famille des Enterobacteriaceae. Ce sont des bactéries immobiles, non sporulées, aéro-anaérobies, ayant un métabolisme respiratoire et fermentatif, fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase négative, catalase positive, ODC négative, ADH négative, tryptophane désaminase et phénylalanine désaminase négatives, bêta-glucuronidase négative, n'hydrolysant ni l'ADN ni le Tween 80, ne produisant pas d'hydrogène sulfuré et fermentant de nombreux sucres dont l'inositol (**Grimont, 1999**).

III.4.1. Caractéristiques

Les espèces du genre *Klebsiella* sont des bactéries Gram négatif en forme de bâtonnet, non mobiles et généralement encapsulées, qui appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* (**Janda**

et Abbott, 2006). Ces bactéries produisent de la lysine-décarboxylase, mais pas d'ornithine-décarboxylase, et donnent en général un résultat positif au test de Voges-Proskauer. Les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* sont habituellement des anaérobies facultatifs, et leur taille varie de 0,3 à 1,0 μm de largeur et de 0,6 à 6,0 μm de longueur. Les espèces du genre *Klebsiella* forment souvent des colonies mucoïde (Abbott, 2007), le genre comprend 77 antigènes capsulaires (antigènes K) donnant naissance à différents sérogroupes.

III.4.2. Mode de transmission

Les bactéries du genre *Klebsiella* peuvent être transmises par contact cutané avec des objets ou des surfaces contaminées par l'environnement (Janda et Abbott, 2006), comme les éponges en luffa, le matériel médical (Podschun et Ullmann, 1998) et les produits sanguins. La possibilité d'une transmission fécale a également été avancée pour certains cas de bactériémie causés par *Klebsiella* (Janda et Abbott, 2006).

K. rhinoscleromatis peut être transmise d'une personne à une autre par des sécrétions aéroportées; toutefois, un contact prolongé avec l'individu infecté est nécessaire pour qu'il y ait infection.

K. granulomatis est transmise sexuellement. La transmission de cet organisme peut également se faire de manière verticale (de la mère à l'enfant) ou par inoculation accidentelle. Les taux de transmission entre partenaires sont faibles (< 50 %) comparativement à d'autres maladies transmises sexuellement (Abbott, 2007).

III.4.3. Transmissibilité

Les bactéries du genre *Klebsiella* peuvent être transmises d'une personne à une autre; toutefois, on ignore quelle est la période de transmissibilité. Environ un tiers des individus sont porteurs de bactéries du genre *Klebsiella* dans leurs fèces (Janda et Abbott, 2006). Selon plusieurs études, les taux de détection varient de 5 à 36 %. Dans le rhinopharynx, les taux de détection varient de 1 à 6 %. On a observé que des bactéries du genre *Klebsiella* sont souvent présentes sur les mains du personnel hospitalier.

III.4.4. Pouvoir pathogènes

Les espèces du genre *Klebsiella* sont d'importants pathogènes communs, à l'origine de pneumonies nosocomiales (7 à 14 % de tous les cas), de septicémies (4 à 15 %), d'infections

urinaires (6 à 17 %), d'infections de plaies (2 à 4 %), d'infections survenant dans les unités de soins intensifs (USI) (4 à 17 %) et de septicémies néonatales (3 à 20 %).

Elles peuvent également causer des bactériémies et des infections hépatiques et ont été isolées dans un grand nombre d'infections inhabituelles, notamment des cas d'endocardite, d'abcès médiastinal primaire gazeux, de péritonite, de cholécystite aiguë, de myonécrose crépitante, de pyomyosite, de fasciite nécrosante, d'abcès du psoas, d'infection de l'espace facial au niveau de la tête et du cou, et d'arthrite septique. Ce sont également des pathogènes opportunistes importants, en particulier chez les personnes immunodéprimées.

Les facteurs de pathogénicité des espèces du genre *Klebsiella* comprennent des adhésines, des sidérophores, des polysaccharides capsulaires, des lipopolysaccharides de surface cellulaire (LSP) et des toxines, qui jouent chacun un rôle particulier dans la pathogénèse associée à ces espèces. Selon le type d'infection et le mode d'infectivité, les bactéries du genre *Klebsiella* peuvent, en vue de les attaquer, adhérer aux cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures, aux cellules du tractus gastro-intestinal, aux cellules endothéliales ou aux cellules uroépithéliales, avant de coloniser les muqueuses. Les affections sous-jacentes sont souvent l'alcoolisme, le diabète sucré, l'atteinte chronique du foie (cirrhose), l'insuffisance rénale chronique, le cancer, les greffes, les brûlures et l'utilisation de cathéters (Janda et Abbott, 2006).

III.5. *Bacillus cereus* pathogènes

Bacillus cereus c'est une bactérie pathogène à coloration gram positive, de métabolisme aéroanaérobie facultatif et capable de produire des spores dans des conditions défavorable de croissance. C'est un micro-organisme mobile, en forme de bâtonnet de grand taille (> 1.0 µm), parfois en chaînette et aux colonies à l'aspect cireux et opaque sur milieu gélosés.

C'est également une bactérie ubiquitaire retrouvée principalement sous forme de spores, dans un grande nombre d'environnement tels que le sol (Arnesen *et al.*, 2008), la surface des végétaux (Koumé *et al.*, 2013) ou encore l'air ambiant (Lues *et al.*, 2007).

III.5.1. Morphologie et composition

Les spores contiennent un noyau cellulaire relativement déshydraté entouré par un peptidoglycane une couche externe protectrice contenant des couches protéiques et une couche extérieure appelée exosporium (Lekshmi *et al.*, 2011), ce dernier se compose d'une couche basique

soutenant une filamenteuse poilue (**Cybulski et al, 2009**). L'exosporium se compose d'une couche saccharidique qui diffère d'une souche à une autre, des lipides et des protéines, ces derniers sont susceptibles d'avoir des interactions avec l'environnement (**Cybulski et al, 2009 ; Swiecki et al, 2006**).

III.5.2. Pouvoir pathogène

B. cereus est responsable d'intoxications alimentaires spontanément résolutive (24-48 heures) de deux types (syndrome diarrhéique et syndrome émétique) ainsi que d'infections opportunistes; il est aussi associé à certaines infections cliniques comme l'endophtalmie et d'autres infections oculaires (**Le scanff et al., 2006**). La forme diarrhéique de l'intoxication à *B. cereus* est caractérisée par la présence de crampes abdominales, d'une diarrhée aqueuse profuse et d'un ténésme rectal parfois associés à de la fièvre et à des vomissements.

La forme émétique de l'intoxication alimentaire à *B. cereus* est quant à elle caractérisée par la présence de nausées, de vomissements et d'une sensation de malaise parfois associés à une diarrhée (**Logan et Rodrigez, 2006**).

B. cereus peut aussi être responsable d'infections des plaies, de bactériémies, de septicémies, de méningites, de pneumonies, d'infections du système nerveux central, d'endocardites, de péricardites, d'infections respiratoires et d'infections périphériques. Chez les patients immunodéprimés, l'infection peut être mortelle (**Le scanff et al., 2006**).

III.5.3.Épidémiologie :

Répandu dans le monde entier. Les affections attribuables à *B. cereus* sont couramment observées dans les régions où les aliments sont manipulés de façon inadéquate. Entre 1973 et 1985, *B. cereus* a été responsable de 17,8 % des intoxications alimentaires bactériennes observées en Finlande; cette proportion s'établissait à 11,5 % aux Pays-Bas, à 0,8 % en Écosse, à 0,7 % en Angleterre et au pays de Galles, à 2,2 % au Canada, à 0,7 % au Japon et à 15 % (entre 1960 et 1968) en Hongrie (**Kotiranta et al., 2000**). En Norvège, *B. cereus* a été le pathogène le plus fréquemment mis en cause dans les maladies d'origine alimentaire observées en 1990 (**Venkitanarayanan et Doyle, 2008**).

III.6. Proteus mirabilis

Ce sont des bactéries très mobiles (pouvant envahir les milieux de culture) qui se distinguent facilement des autres entérobactéries par leurs caractères biochimiques (uréase +, tryptophane désaminase +) et leur résistance naturelle à la colistine. C'est un commensal du tube digestif. *Proteus mirabilis* vient au second rang, après *E. coli*, dans l'étiologie des infections urinaires de ville (10 % des cas). C'est une espèce bactérienne habituellement sensible aux antibiotiques.

Les bactéries du genre *Proteus* sont parfois qualifiées de membres de la tribu des Protea (**Kim et al., 2003**). Certaines espèces qui appartenaient auparavant au genre sont maintenant considérées comme des synonymes homotypiques d'autres espèces bactériennes; ainsi, *P. inconstans* est maintenant synonyme de *Providencia alcalifaciens*, *P. morganii*, *Morganella morganii*, *P. rettger* et de *Providencia rettgeri* (**Euzéby, 2010**).

III.6.1. Caractéristiques

Les bactéries du genre *Proteus* sont des bacilles (en forme de bâtonnets) Gram négatif aérobies mobiles qui font partie de la famille des entérobactérie (**Coker et al., 2000**). Les entérobactéries mesurent habituellement de 0,3 à 1,0 µm de large par 0,6 à 6,0 µm de long. Il s'agit de bactéries uréase positives capables d'essaimage lorsque cultivées en milieu solide. Elles font partie de la flore gastro-intestinale normale de l'humain (**Abbott, 2007**).

III.6.2. Mode de transmission:

Les bactéries du genre *Proteus* font partie de la flore intestinale normale de l'humain (**Kim et al., 2003 ; Abbott, 2007**), et peuvent causer des infections lorsqu'elles quittent l'intestin. Elles peuvent aussi être transmises par des cathéters contaminés (notamment par des sondes urinaires) ou par inoculation parentérale accidentelle; cependant, leur mode de transmission spécifique n'a pas encore été déterminé (**Ronald, 2003**).

III.6.3. Pathogénicité :

Les espèces du genre *Proteus* sont fréquemment en cause dans les infections des voies urinaires (IVU) compliquées (**Kim et al., 2003**). Les bacilles sont habituellement observés dans les voies urinaires hautes (siège fréquent de l'infection) et peuvent entraîner des urolithiases (formation de pierres dans le rein ou la vessie), des cystites et des pyélonéphrites aiguës (**Coker et al., 2000**). De rares cas de bactériémie secondaire à une IVU imputables à des bactéries du genre *Proteus* ont aussi été signalés, de même que des cas de septicémie et d'infection des plaies. Après fixation aux

parois et colonisation des voies urinaires, les bacilles libèrent de l'uréase, qui catalyse la conversion de l'urée en ammoniacque et en CO₂. Il en résulte une diminution du pH urinaire, et, éventuellement, la formation de calculs rénaux ou vésicaux. *P. mirabilis* est l'espèce du genre *Proteus* la plus souvent en cause en présence d'une infection (**Ronald, 2003**).

III.7. *Candida albicans*

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (**Chu et al., 1993**), se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (**Graser et al., 1996**), formant ainsi des colonies blanches crémeuses. Les levures du genre *Candida* sont la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques (**Pfaller et Diekema, 2007**), en particulier chez des patients immunodéprimés (**Benedict and Colagreco, 1994**).

III.7.1. Morphologie *Candida albicans*

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm, et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver in vitro et in vivo et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* (**Lagane, 2007**).

III.7.2. Mode de transmission

La plupart des infections sont attribuables à la flore endogène du patient, et non à une infection croisée (**Ryan, 2004**). Bien que la transmission nosocomiale soit rare, des cas secondaires à une contamination des surfaces inanimées et des mains des professionnels de la santé et des cas de transmission entre patients ont été signalés (**Odds, 2010**).

III.7.3. Pathogénicité et toxicité :

C. albicans est un microorganisme commensal qui fait partie des flores microbiennes endogènes gastro-intestinale, oropharyngée et génitale féminine (**Ryan, 2004**). Cependant, il s'agit aussi chez l'humain d'un pathogène opportuniste (**Odds, 2010**) pouvant causer des affections

potentiellement mortelles chez les sujets immunodéprimés comme immunocompétents (**Schell, 2006**). La manifestation clinique la plus fréquente de l'infection à *C. albicans* est la candidose buccale.

Candida albicans peut aussi entraîner des infections des ongles (paronychie et onychomycose à *Candida*), des atteintes superficielles des muqueuses, des infections cutanées consécutives à une macération de la peau (plis inguinaux et région fessière, chez le jeune enfant) et des infections oculaires (enophthalmies, etc)(**Ryan, 2004**).

Chapitre II

Partie expérimentale

Chapitre II : Matériels et Méthodes

- Origine de la plante

Le matériel végétal utilisé au cours de l'expérimentation est représenté par des feuilles d'olivier d'*olea europaea sylvestris* récolté de la wilaya de Relizane. Les feuilles récoltés séchés a l'air libre a labri de la lumière et de l'humidité elles sont par la suite coupé finement et broyé au moulin électromécanique, la poudre qui en résulte sert de support à nos extractions.

II.1. lieu de stage :

Notre étude expérimentale est réalisée au sein du laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem ou on a réalisé les expériences suivantes :

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

II.2. Matériel bactérien utilisé

Pour tester l'activité antibactérienne des extraits des feuilles d'olivier, nous avons opté pour sept souches bactériennes (Tableau 04).

Tableau 04 : La nature et l'origine de différentes souches pathogènes utilisées.

Gram	Souches bactériennes	Référence
Les souches Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659

Les souches Gram positif	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862
Les champignons	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

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

II.3. Méthodologie de travail

II.3.1.Extraction des feuilles d'olivier

L'extraction a été effectuée selon la méthode qui consiste à nettoyer, découper et broyer 400g de *Olea europea* auxquels on ajoute 500 ml de méthanol pur 99 % avant de laisser le mélange sous agitation pendant 24h à température ambiante et à l'obscurité .

L'extrait brut est ensuite filtré par papier Whatman N°4, puis le résidu a été récupéré dans un autre récipient avec 500 ml d'éthyle acétate 99% et laissé sous agitation pendant 30 mn puis les suspensions sont encore filtrées par un papier Whatman N°4 (Figure 04).

Les deux filtrats obtenus ont été mélangés pour être séchés par évaporation du solvant à 45°C avec un rota vapeur.



1-les feuilles d'olivier



2- lavage



3- broyage



4- macération N°01



5- filtration N°01



6- macération N° 02



7- filtration N° 02



8- rotavapeur



9- extrait brut

Figure 4 : les étapes de l'extraction des feuilles d'olivier (*Olea europea*).

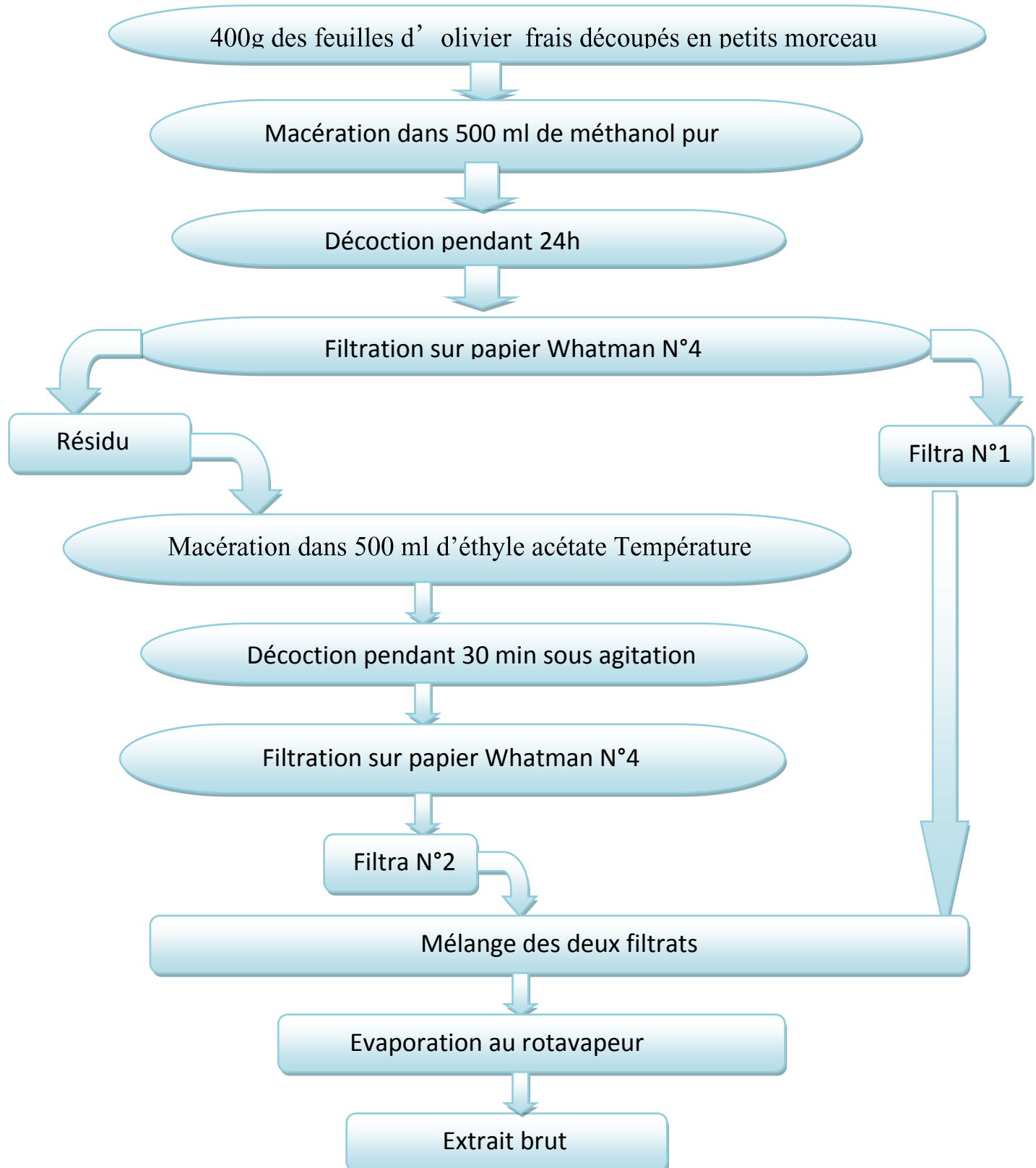


Figure 5 : Méthode d'extraction des feuilles d'olivier (Annok et al., 2012)

II.3.2.L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits phénoliques ?

II.3.2.1.Les milieux de cultures utilisées

- **Bouillon nutritif** (pour la réactivation des souches pathogènes) (Tableau 5).

Tableau 5 : Composition de bouillon nutritif (g/l).

Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium 5	5

- **Milieu de Mueller Hinton** (Milieu non sélectif pour l'étude de la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques et les sulfamides) (Tableau 6).

Tableau 6 : Composition de Mueller Hinton (g/l).

Extrait de viande	3
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar (manque dans le bouillon)	16

II.3.2.2.Réactivation de souches indicatrices

La réactivation des souches consiste le transfert de 10 µl de culture conservé a 10 ml de bouillon nutritif de chaque bactérie pathogène testé et incubée 37°C pendant 24h. Puis ajuster la densité optique de 0.08 0 à 0.1 a une longueur d'onde de 600 nm qui correspond a 108 UFC / ml (**Kishor, 2005**).

II.3.3. Tests d'activité antimicrobienne

II.3.3.1. Méthode de diffusion en puits AWDT

La méthode de diffusion en puits est très utilisée en microbiologie (antibiogramme et anti fongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle), l'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition.

En fonction du diamètre d'inhibition la souche sera qualifiée sensible, intermédiaire ou de résistante (**Broadasky et al., 1976**).

Cette méthode consiste à ensemencer 21 ml Mueller Hinton molle avec 100 µl d'une culture jeune de 18h d'incubation sur une boîte de pétri. Après solidification à température ambiante dans une zone stérile, des puits sont creusés à l'aide d'un embout jaune stérile (Figure 06).

Généralement ont réalisé 1 puits par boîte de 6mm de diamètre (chaque test est réalisé en triplicata). Un volume de 80µl de l'extrait brut est mis dans les puits, et les boîtes de pétri sont incubées à 37°C pendant 24h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (pré-diffusion) (**Doumandji et al., 2010**).

La lecture des résultats se fait par la mesure de diamètre des zones d'inhibition apparaissant, il sera considéré comme positif si le diamètre est supérieur à 2 mm.

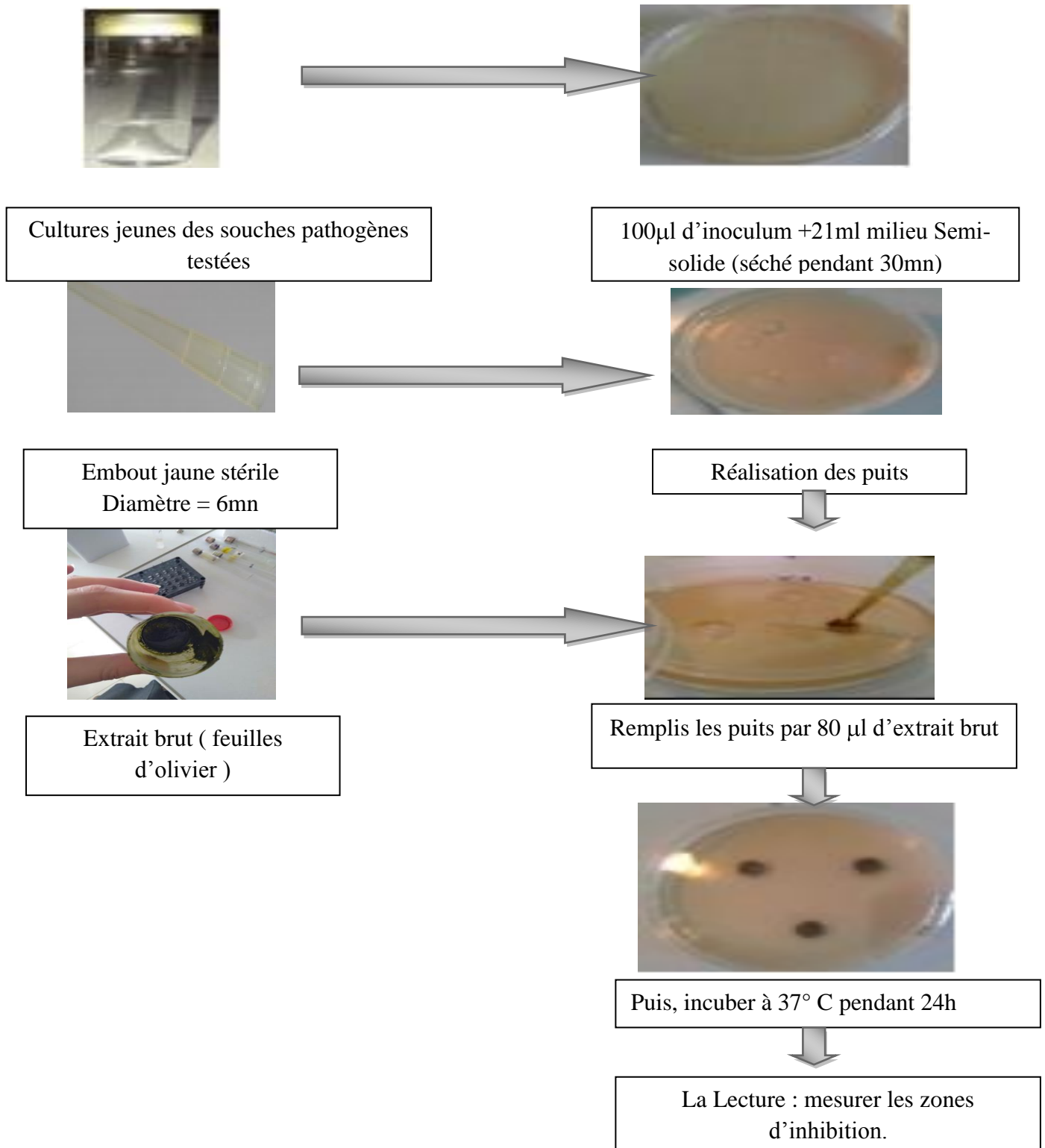


Figure 6 : La méthode de diffusion en puits AWDT (Barefoot et Klaenhammer, 1983).

II.3.4.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

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

Lors de notre travail, nous avons déterminé la CMI pour les extraits de feuilles d'oliviers vis-à-vis des souches qui ont montrés une sensibilité importante (diamètre d'inhibition important).

Les CMI sont déterminées par la méthode de micro dilutions en puits, en utilisant des microplaques contenant 96 puits selon (**Orhan *et al.*, 2005**).

Chapitre III :

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Le Rendement d'extraction d'*Olea europea*

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

$$RT(\%) = (P1 - P2/P3) \times 100$$

P1 : poids de ballon après évaporation.

P2 : poids de ballon avant évaporation.

P3 : poids de la matière végétale de départ.

Nous avons calculé le rendement d'extraction, le résultat obtenu est présent dans la figure suivante :

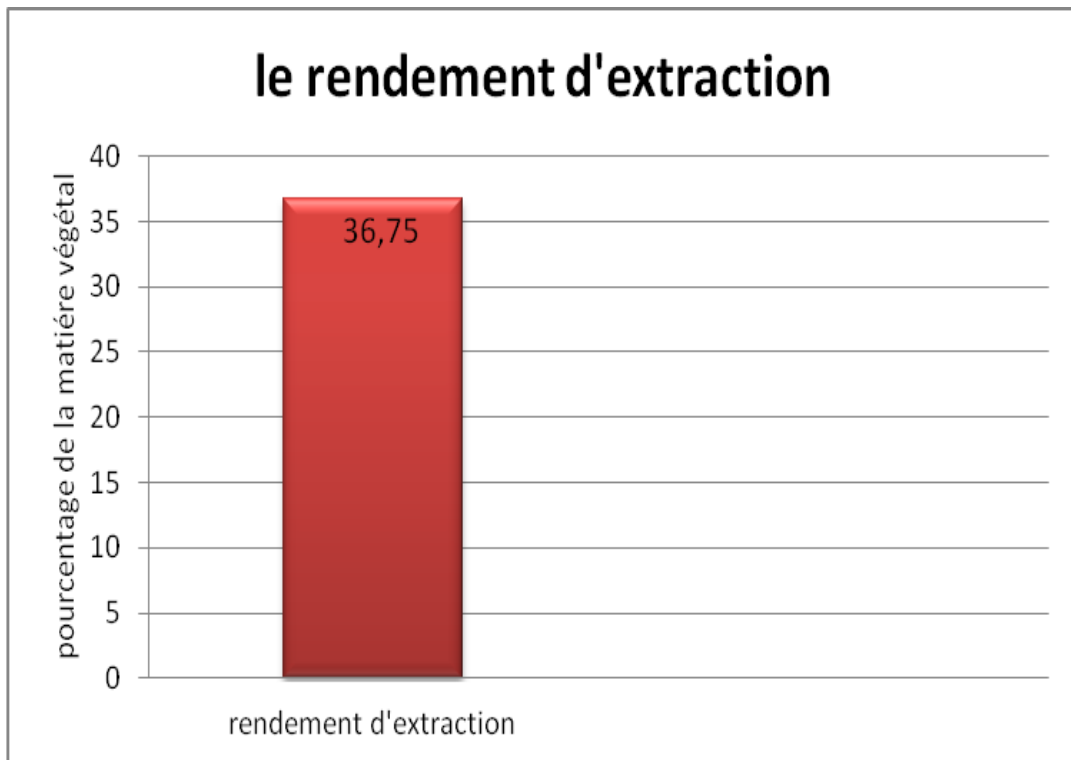


Figure 07 : Représentation graphique de rendement d'extraction d'*Olea europea*.

III. 2. Détermination de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne de l'extraits brut des feuilles d'olivier vis-à-vis des souches bactériennes testées à savoir les Gram positifs (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), et

les Gram négatifs (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*), et les champignons (*Candida albicans*) se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque imprégné d'extraits de feuille d'olivier.

Cette dernière est appréciée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle. Ce travail vise à montrer la présence ou l'absence d'une activité antibactérienne de l'extrait des feuilles d'olivier.

Les résultats concernant les propriétés antimicrobiennes dans ce test ont montré que l'extrait brut des feuilles d'olivier influence totalement sur toutes les souches.

Tableau 07: Diamètres des zones d'inhibition (mm) d'extrait des feuilles d'olivier vis-à-vis des souches bactériennes et des champignons.

Espèces	Gram	Diamètres des zones en mm
<i>Bacillus cereus</i> ,	+	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	30
<i>Escherichia coli</i>	-	12
<i>Proteus mirabilis</i>	-	14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	08
Champignons (<i>Candida albicans</i>)		09

A- Les souches bactériennes gram positifs :

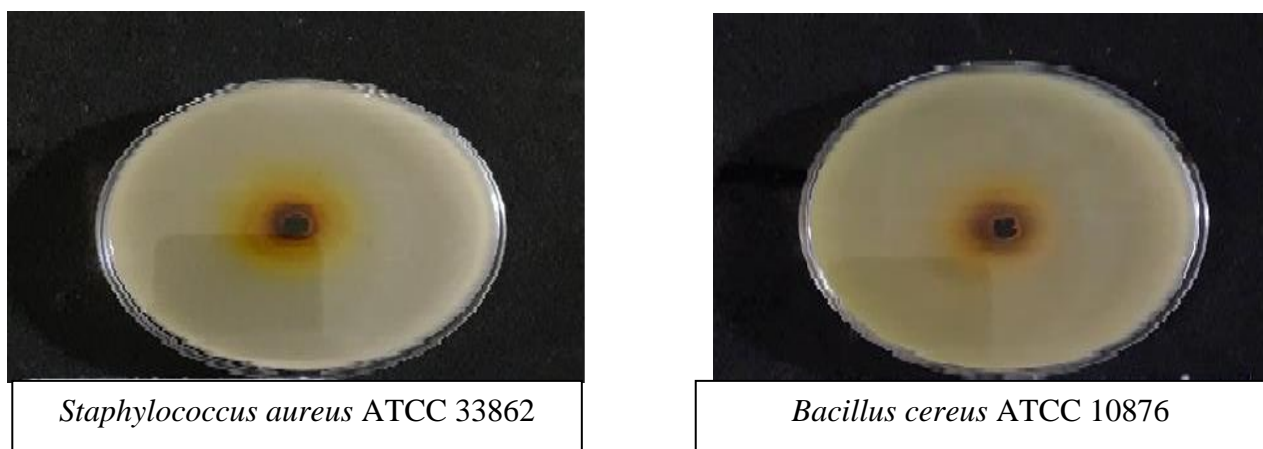


Figure 08: Pouvoir antibactérien d'extrait phénolique (des feuilles d'olivier) par la méthode de diffusion en puits vis à vis des souches gram positifs.

Tableau 08: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) en présence d'extrait phénolique brut des feuilles d'olivier vis- à-vis de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

Espèces	Gram	Diamètres des zones en mm
<i>Bacillus cereus</i>	+	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	30

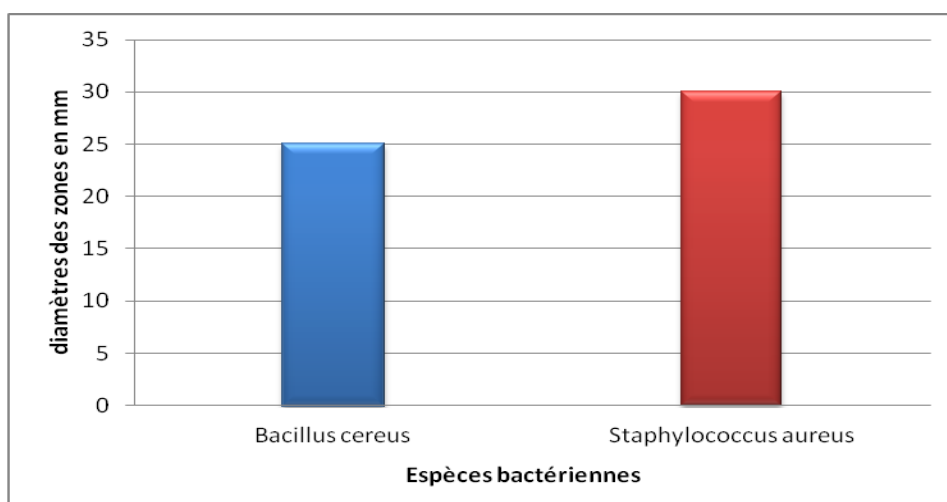


Figure 09: diamètres des zones d'inhibition en (mm) vis- à-vis de *B. cereus* et *S. aureus*.

L'extrait brut des feuilles d'olivier a montrée des diamètres d'inhibitions compris entre 30 mm à 25 mm vis à vis toutes les souches.

Ainsi qu'il possède une activité inhibitrice importante vis-à-vis **les** deux souches bactériennes, un diamètre d'inhibition de 25 mm pour *Bacillus cereus* ATCC 10876 et de 30 mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC 33862.

B- Les souches bactériennes gram négatifs

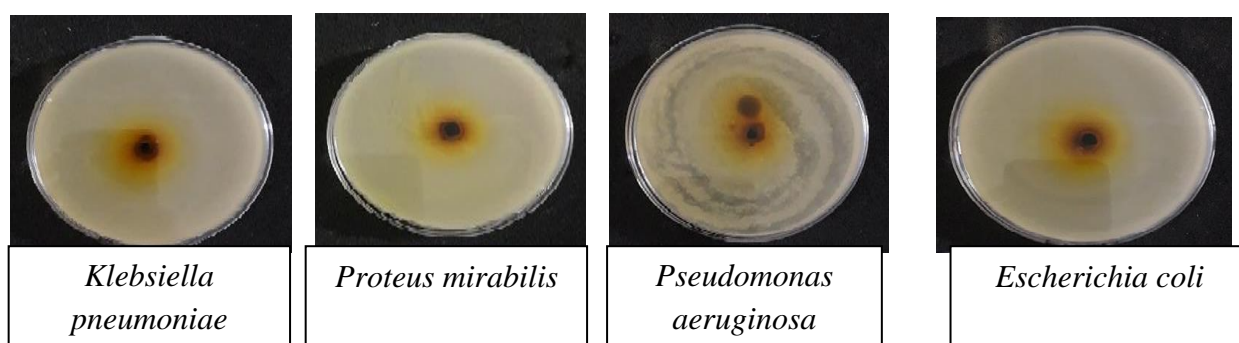


Figure 10 : Pouvoir antibactérien d'extrait brut (des feuilles d'olivier) par la méthode de diffusion en puits vis à vis des souches gram.

Tableau 09: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) des souches gram négatifs en présence d'extrait brut des feuilles d'olivier.

Espèces	Gram	Diamètres des zones en mm
<i>Escherichia coli</i>	-	12
<i>Proteus mirabilis</i>	-	14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	8

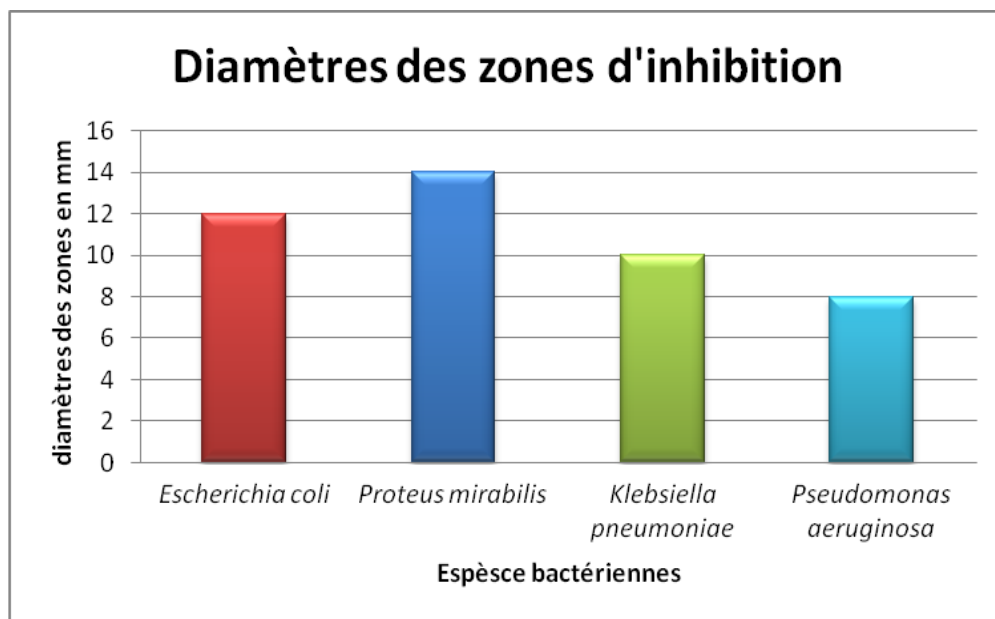


Figure 11: Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) vis-à-vis des souches gram négatifs.

L'extrait brut des feuilles d'olivier influence totalement sur toutes Les souches bactériennes gram négatifs, nous avons enregistré des diamètres d'inhibitions différents.

En ce qui concerne *Escherichia Coli* ATCC 25922 on a révélée un diamètre d'inhibition de 12 mm, pour *Proteus Mirabilis* ATCC 35659 nous avons enregistré un diamètre de 14 mm. Concernant *Klebsiella Pneumoniae* ATTC 13883 et *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853 un diamètre d'inhibition très proche, de 10 mm et 08 mm respectivement.

C- Les champignons

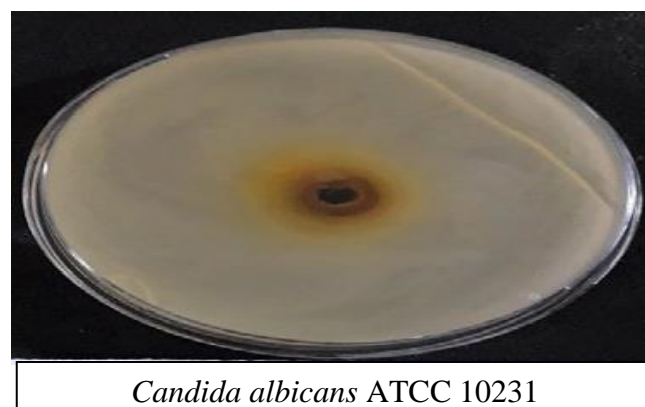


Figure 12 : Pouvoir antibactérien d'extrait des feuilles d'olivier vis-à-vis des champignons.

Tableau 10: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) en présence d'extrait brut des feuilles d'olivier vis-à-vis de *Candida albicans* :

Espèces	Diamètres des zones en mm
Champignons (<i>Candida albicans</i>)	09

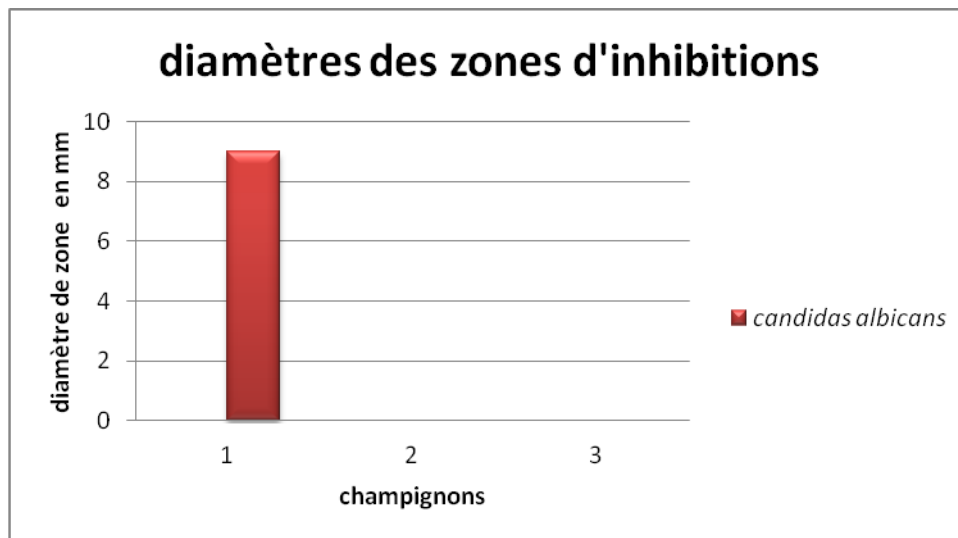


Figure13: Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition d'extrait des feuilles d'olivier en (mm) vis-à-vis de *Candidas albicans*.

L'extrait brut des feuilles d'olivier a montrée un diamètre d'inhibition de 09 mm vis-à-vis *Candida albicans* ATCC 10231.

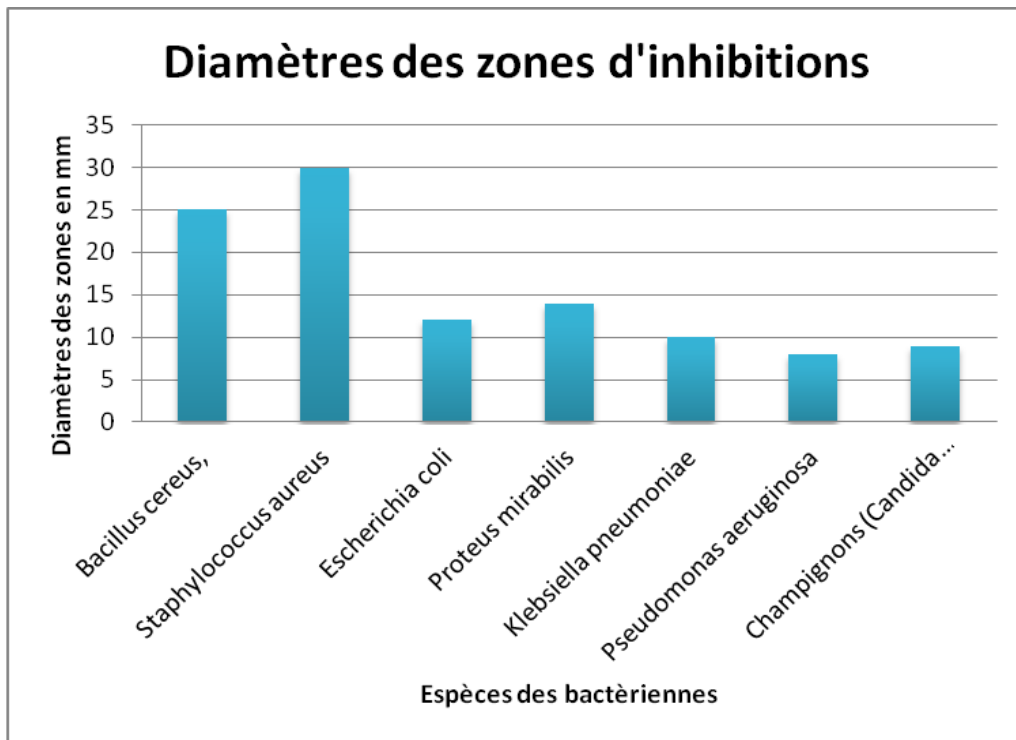


Figure 14 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition d'extrait des feuilles d'olivier en (mm) vis-à-vis toutes les souches pathogènes.

Nous remarquons que le diamètre d'inhibition le plus important a été observée par la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, avec une valeur de 30 mm tandis que le plus bas diamètre d'inhibition est marqué par la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec une valeur de 08 mm.

Dans l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que toutes les souches pathogènes sont sensibles vis à vis l'extrait des feuilles d'olivier.

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, ce qui explique la différence de sensibilité d'une souche à l'autre.

Tepe et al. (2004), ont montré que les bactéries à Gram négatif, sont généralement résistantes aux agents antimicrobiens hydrophobes grâce à leur structure lipopolysaccharidique qui favorise la résistance à ces agents, cet effet dépend de la composition en lipide et de la charge extérieure nette des membranes microbiennes.

Selon (**Shan et al., 2007**), la membrane des bactéries Gram positif peut être traversée facilement par les polyphénols qui peuvent atteindre leur site d'action.

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

La tolérance des bactéries aux polyphénols dépend essentiellement de l'espèce bactérienne et de la structure des polyphénols (**Almajano et al., 2008**). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est très complexe. Parmi les hypothèses avancées nous citons, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Harrar, 2012**).

III.3. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

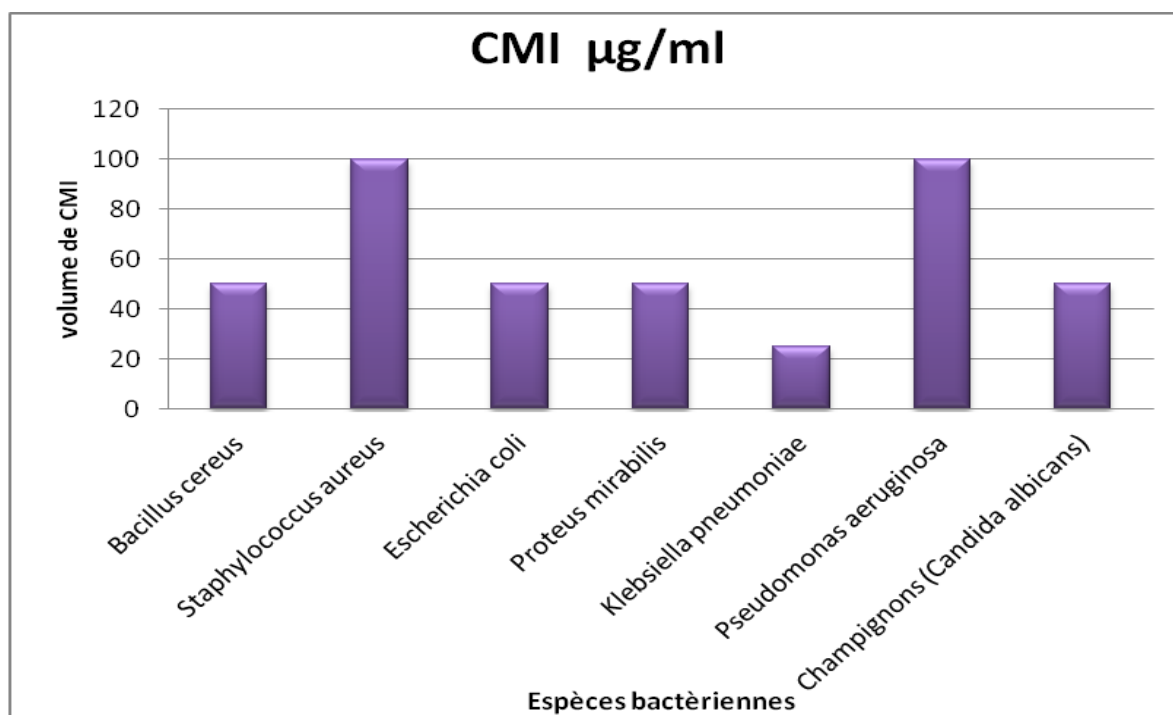
La CMI pour une souche pathogène donnée, représente la plus faible concentration d'extrait brut des feuilles d'olivier qui inhibe toute croissance visible après 24h d'incubation. La CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis d'un inhibiteur donné.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI en $\mu\text{g/ml}$ d'extrait brut des feuilles d'olivier) des différentes souches pathogènes testées dans ce travail sont respectivement variables, selon la souche, de 25 $\mu\text{g/ml}$ à 100 $\mu\text{g/ml}$.

Les CMI sont déterminées vis-à-vis des bactéries testées par la méthode de microdilution sur microplaques à 70 puits, le résultat de CMI est représenté dans le tableau 11 suivant :

Tableau 11: Valeurs des CMI de chaque souche :

Espèce	CMI $\mu\text{g/ml}$
<i>Bacillus cereus</i>	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	100
<i>Escherichia coli</i>	50
<i>Proteus mirabilis</i>	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
Champignons (<i>Candida albicans</i>)	50

**Figure 15:** Représentation graphique des valeurs des CMI.

Nous remarquons que la CMI la plus faible obtenue par extrait des feuilles d'olivier est égale à 25 $\mu\text{g/ml}$ vis-à-vis la souche *Klebsiella pneumoniae* ATTC 13883, pour les autres CMI obtenues

on a enregistré 50 ug/ml pour *Bacillus cereus* ATCC10876, *Proteus Mirabilis* ATCC 35659, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Candida albicans* ATCC 10231.

La CMI la plus élevée a été obtenue avec *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 qui est de l'ordre de 100 µg/ml.

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales sont une autre source importante pour une grande variété d'antibactériens naturels, elles possèdent des propriétés biologiques très importantes dans divers domaines à savoir médical, pharmaceutique, cosmétique et d'agriculture.

Au cours des dernières années, des études sur les activités antibactériennes des plantes médicinales ont augmenté de façon remarquable due à un intérêt accru pour leur potentiel d'être utilisé en tant que source d'antibactériens riche et naturel. Parmi ces plantes : *Olea europaea*.

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'évaluation des effets antibactériens d'extrait des feuilles d'olivier vis-à-vis sept souches pathogènes par méthode de diffusion en puits AWDT et la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

L'évolution de cet effet antibactérien montre que la zone d'inhibition la plus intéressante mesurée sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, tandis que le diamètre d'inhibition le moins important et de (08 mm) par la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Pour le classement des souches selon un ordre décroissant de leur sensibilité nous avons: *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 diamètre d'inhibition de 30 mm, *Bacillus cereus* ATCC10876 de diamètre d'inhibition de 25 mm, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 diamètre de 14 mm, *Escherichia coli* ATCC 25922 diamètre d'inhibition de 12 mm, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 diamètre de 10 mm, de diamètre de 09 mm pour *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 un diamètre de 08 mm.

Les valeurs enregistrées de CMI vont de 100 µg/mg pour *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 à 25 µg/ml pour *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

On conclut que l'extrait des feuilles d'olivier étudié représente un effet inhibiteur intéressant contre les souches indicatrices testées.

Références bibliographiques

AERTS, R., NOVEMBER, E., VAN DER BORGHT, I., BEHAILU, M., HERMY, M., MUYS, B. Effects of pioneer shrubs on the recruitment of the fleshy-fruited tree *Olea europaea ssp. Cuspidate* in Afromontane savanna. *Applied Vegetation Science* 9, 2006; 117–126.

AOUIDI F. (2012). Etude et Valorisation des Feuilles d'Olivier *Olea Europaea* dans l'Industrie Agro-Alimentaire. Mémoire de Doctorat. Université de Carthage, Tunisie: 3

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.

ALTIOK E., BAYCIN D., BAYRAKTAR O et ULKU S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.* 62 (2): 342-348.

ARAQAS H. (2013). Extraction des composés phénoliques de feuilles d'olivier et étude de leurs activités biologiques. Mémoire d'Obtention du Master CMBA. Univ Sidi Mohammed Ben Abellah, FST FES : 3-4

ANGINOT P et ISLER F (2003). *L'Olive*. Libris: 43.

AVENARD V. (2008). *L'olivier et les vertus thérapeutiques de ses feuilles*. Université de Nantes : 64-88.

AL-QARAWI A.A., AL-DAMEGH M.A and ELMOUGHY S.A. (2002). Effect of freeze dried extract of *Olea europaea* on the pituitary-thyroid axis in the rats. *Phytotherapy Research*. 16: 286-287.

AL-AZZAWIE H. F et ALHAMDANI M.S. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci*; 78: 1371-1377.

AKROUR N et HARANI F. (2011). Contribution à l'amélioration de l'activité antibactérienne d'extrait de feuilles d'olivier par addition de la Nisine, et leur application à la conservation de la viande hachée bovine. Mémoire d'ingénieur Spécialité: Technologie Alimentaire. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou Algérie: 3-18.

ARGENSON C., REGIS S., JOURDAIN J.M et VAYSEE P. (1999). *Olivier* Centre Technique interprofessionnel des fruits et légumes : 12

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

ARTAUD MONIQUE. L'olivier et ces contributions dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique. 2008 ; 06-07.

BENAVE NTE-GRACIA O., CASTILLO J., LORENTE J., ORTUNO A and DEL J.A. (2000). Antioxydant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* leaves. *Food Chem.* 68 (4): 457-462.

BISIGNANO G., TOMAINO A., LO CASCIO R., CRISAFI G., UCCELLA N and SAIJA A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* Vol. 51: 4-971.

BOUDRIBILA M- M., Les anciens Amazighs avant les phéniciens : Mode de vie et organisation sociale, *AWAL* n°29, 2004; 17- 31

BRETON CATHERINE, PINATEL CHRISTIAN, MEDAIL FREDERIC, BONHOMME FRANÇOIS, BERVILLE ANDRE. Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms, 2008; 524-200.

BLAZQUEZ M. (1997). *Encyclopédie Mondiale de l'olivier.* Conseil Oléicole internationale: 19.

BROSSE J. (2000). *Larousse des arbres: Dictionnaire des arbres et des arbustes:* 291- 292

BENNANI KABCHI N., FDHIL H et CHERRAH Y., (1999). Effets of *Olea europaea* var. *oleastre* leaves in hypercholesterolemic insulin-resistant sand rats. *Thérapie.* 54: 23-717.

BOTSOGLOU E., GOVARIS A., CHRISTAKI E and BOTSOGLOU N. (2010). Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food chemistry,* 121: 17-22.

BENDINI A., L. CERRETANI, S VECCHI, A. CARRASCO-PANCORBO, G. LERCKER. Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil Phenolics on Oxidative Stability in the Presence or Absence of Copper Ions. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4880-4887.

BOUAZIZ M., GRAYER R.J., SIMMONDS M.S., DAMAK M. ET SAYADI S. Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53, 2005; 236-241.

BIANCO A., UCCELLA N. Biophenolic components of olives. *Food Research International*, 33, 2000; 475-485.

BOLMONT R., BUSSLER L., JAUBERT J-P et le chantier BT de l'ICEM. (2015). *L'Olivier*: 3

BOUABDALLAH A. (2014). Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europaea sylvestris*). Mémoire de Master. Univ Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie

BRUNETON J. (2009). *Pharmacognosie : Phytochimie.* Lavoisier, 4eme édition. Paris : 901-904.

COWAN MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microb. Rev.* Vol. 12: 564-582.

COLLIN S., COUNET C., CALLEMIEN D et JERKOVIC V. (2011). Nomenclature et voies de synthèse des principaux polyphénols; in «Polyphénols et Procédés: Transformation des polyphénols aux travers des procédés appliqués à l'agroalimentaire». Lavoisier., Paris: 5-25.

CAMPBELL, B. M., & LUCKERT, M. (Eds.). *Uncovering the hidden harvest: Valuation methods for woodland and forest resources.* London: Earthscan, 2002.

CROZIER A., DEL RIO D and CLIFFORD M-N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine. Phytochemicals and Cardiovascular Protection.* 31: 446-467.

CHAN K.N and MAZNAH I. (2009). Supercritical carbon dioxide fluid extraction of hibiscus *Canna bimus L.* seed oil: Apotential solvent-free and high antioxydative edible oil. *Food chem* 6: 1291-1296

DJENANE D., YANGUELA J., DERRICHE F., BOUARAB L et RONCALES P. (2012). Extrait de feuilles d'olivier; tests *in vitro* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa*; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie*: 10-18.

DEKANSKI D., RISTIC S., RADONJIC N., PETRONIJEVIC N., DEKANSKI A and MITROVIC D. (2011). Olive leaf extract modulates cold restraint stress- induced oxidative changes in rat liver. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76 (9): 1207-1218

DELGADO-PERTINEZ M., GOMEZ-CABRERA A and GARRIDO A. (2000). Predicting the nutritive value of the olive leaf (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and *in vitro* studies. *Animal Feed Science and Technology*, 87: 187-201.

DE LUCAS A., MARTINEZ de la OSSA E., RINCON J., BLANCO M.A and GRACIA I. (2002). Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*, 22 (3): 221-228.

DJENANE D., YANGUELA J., DERRICHE F., BOUARAB L et RONCALES P. (2012). Extrait de feuilles d'olivier; tests *in vitro* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa*; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie*: 10-18.

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

FARAG R.S., MAHMOUD E.A et BASUNY A.M. (2007). Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating. *International Journal of Food Science & Technology*, 42: 107-115

GREEN P. S., A revision of *Olea*. (Oleaceae). *Kew Bull.* 57, 2002 ; 91 -140. Guerin, J., Mekuria, G., Burr, M., Collins, G., Sedgley, M. Selection of olive cultivars. *Acta Hort.* 622, 2003; 231 – 234.

GHEDIRA K. L'olivier. *Phytothérapie*. 6, 2008 ; 83-89.

HANNACHI HEDIA, BRETON CATHERINE, MSALLEM MONJI, SALEM BEN EL HADJ SALEM BEN, EL GAZZAH MOHAMED, BERVILLE ANDRE. Differences between native and

introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia, *Scientia Horticulturae* 116, 2008; 280–290.

HANSEN K., ADSERSEN A., BROGGER CHRISTENSEN S., JENSEN SOREN R., NYMAN U and WAGNER SMITT U. (1996). Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lincea*. *Phytomedicine*; 2: 19-325

HARBONE J.B and SOMMONDS N.W. (1964). *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, London: 101.

HAYOUNI E.A., ABEDRABBA M., BOUIX M and HAMDI M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. Fruit extracts. *Food Chem.* 105: 1126-1134.

HUANG, C.L.; SUMPIO, B.E. Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *J. Am. Coll. Surg.* 207, 2008; 407–416.

JACQUES-MEUNIE D. *Le Maroc saharien des origines à 1670*, Klincksieck, Paris. 2vol, 1982; 990.

LUMARET, R., OUZZANI, N., MICHAUD, H., VIVIER, G., DEGUILLOUX, M.F., DI GIUSTO, F. ALLOZYME variation of oleaster populations wild olive tree *Olea europaea* L. in the Mediterranean Basin. *Heredity* 92, 2004; 343–351.

LAVEE SHIMON. Evaluation of the need and present potential of olive breeding indicating the nature of the available genetic resources involved. *Scientia Horticulturae*, Volume 161, 2013; 333–339.

LEONG L.P and SHUI G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem* 76: 69-75.

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

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

MACHEIX J.J., FLEURIET A et MANCHADO P.S. (2006). Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles; in: «Les Polyphénols En Agroalimentaire». Edition Tec et Doc., Lavoisier., Paris: 3-26.

MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C and JIMENEZ L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *AmJ. ClinNutr*, 79: 727-747.

MERAH H. (2016). Activité antioxydante et antimicrobienne des fractions polyphénoliques d'olive local (*Olea europaea* L.), Mémoire présenté en vue d'obtention du diplôme de Magister Spécialité: Substances Naturelles et Innovation thérapeutique S.N.I.T. Université Mustapha Stambouli Mascara. Algérie. Pp: 3.

MOTILVA M-J., SERRA A and MACIA A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An Overview. *Journal of Chromatography A, State of the art of (UHP) LC-MS (-MS). Techniques and their Pratical Application.*1292: 62-82.

MICOL V., CATURLA N., PEREZ-FONS L., MAS V and ESTEPA A (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Researh.*, 66 (2-3): 129-136.

MYLONAKI S., KLIASSOS E., MAKRIS D.P and KEFALAS P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (5): 977-985.

OWEN R- W., HAUBNER R., WURTELE G., HULL W. E., SPIEGELHALDER B., BARTSCH H. Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 13, 2004; 319-326.

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

POLESE JM. (2009). Olivier pas à pas. EDISSUD Provence: 9-12

POLZONETTI V., EGIDI D., VITA A. Involvement of oleuropein in digestive metabolic pathways. *Food Chemistry*. 88, 2004 ; 1-15.

RICE-EVANS C.A., MILLER N.J., BOLWELL P.G., BRAMLEY P.M and PRIDHAM J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Research, Rochelle, Université de La Rochelle, 22: 375-383

ROBARDS K., PRENZLER P.D., TUCKER G., SWATSITANG P and GLOVER W., (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food chemistry, 66, 401-436

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ R., HERRERA M.-D., DE SOTOMAYOR M.-A and RUIZ-GUTIERREZ V. (2007). Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxidesynthase expression. Am. J. Hypertens; (7): 728-734.

SINGH I., MOK M., CHRISTENSEN A.M., TURNER A.H and HAWLEY J.A (2008). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 18: 127-132.

SUDJANA A.-N., D'ORAZIO C., RYAN V., RASOOL N., NG J., ISLAM N., RILLEY T.-V and HAMMER K.-A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* leaf extract. Int. J. Antimicrob; Agents; 33 (5): 461-463.

SUSALIT E., AGUS N., EFFEND I., TJANDRAWINATA R.R., NOFIARNY D., PERRINJAQUET-MOCCEZZI T and VERBRUGGEN M. (2011). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. Phytomedicine, 18 (4): 251-258.

SCHUCHARDT H. (1997). Encyclopédie Mondiale de l'olivier. Conseil Oléicole international: 21.

SIGUERDJIDJENE K. (2010). Contribution à l'étude bibliographique de l'olivier (*Olea europaea* L). Mémoire d'Etude Supérieure en Biologie et Physiologie Végétale. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Algérie. Pp: 3.

SAVARESE TM, STROHSNITTER WC, LOW HP, LIU Q, BAIK I, OKULICZ W, CHELMOW DP, LAGIOU P, QUESENBERY PJ, NOLLER KL, HSIEH CC. 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, 2007

SOMOVA L.I., SHODE F.O., RAMNANAN P and NDAR A., (2002). Antihypertensive antiaterosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *Journal of Ethnopharmacol*: 1-7, 22 (3): 221-228.

TADASHI U. (2006). Antiaging food compositions containing collagen, and heir manufacture. Patent written in Japanese. Application: JP 2006191845 A 20060727: 7.

TALHAOUI N., TAAMALLI A., GOMEZ-CARAVACA A.M., FERNANDEZ- GUTIERREZ A and SEGURA-CARRETERO A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77: 92-108. TAO and LAMBERT J.D. (2014). Polyphenols in the Prevention and Treatment of Vascular and Cardiac Disease, and Cancer. *Polyphenols in Human Health and Disease.*, 2: 1191-1198.

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

THOMAS D., NEMONE T., MARIANNE W-L and ARMIN W. (2006). Cosmetic and dermatological composition for the treatment of aging or photodamaged skin. Patent written in German. EP2005-20052 20050915: 40.

VERCAUTERN J and CHEZE C. (1998). Polyphénols 96: 18th International Conference on Polyphenols. *Les Colloques*, N°87. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Paris: 11-89.

ZARZUELO A., DUARTE J and JIMENEZ J. (1991). Vasodilatator effect of olive leaf. *Planta Med.* 57: 417-419.