



Université Mohamed Khider de Biskra



Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :

OURAK Amel

BENBRAHIM Soumaya

Le:10 juillet 2019

**Evaluation de l'activité antibactérienne des
extraits aqueux obtenus par trois méthodes
d'extraction à partir des feuilles d'*Olea europea.L***

Jury :

Mme.	BOUKHAROUBA.khadidja	PROF	Université Mohamed Khider de Biskra	président
Mme.	CHOUIA .Amel	MAA	Université Mohamed Khider de Biskra	Rapporteur
Mme.	BOUATROUS .Yamina	MCA	Université Mohamed Khider de Biskra	examineur

Année universitaire : 2018-2019

Remerciement

Avant tout, on remercie Dieu le tout Puissant, de nous avoir donné la force, la patience et la volonté pour accomplir ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères et les plus dévoués à l'égard de notre encadreur de mémoire, Mme CHOUIA Amel, maitre-conférence à la faculté des sciences de la nature et de la vie pour la documentation qu'il m'a procure, ses précieux conseils, et pour son suivi tout au long de réalisation de se mémoire.

Avec beaucoup de respect, je remercie les membres de jury, pour avoir donné de leur temps et de leur énergie afin de suivre les étapes de notre travail.

Je tient à remercier tout le personnel de la bibliothèque et tout les techniciens de laboratoire de la faculté de science exacte et science de la nature et de la vie. Tous nos enseignants du Département, pour leurs soutiens et formation ainsi qu'à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

En fin je remercie chaleureusement toutes mes amies et tout ceux qui ont contribué de près et loin à la réalisation de ce travail.

« **Soumaya** » et « **Amel** »

Table de matière

Remerciement	
Table de matière	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Chapitre 1 : Généralité sur <i>Olea europea</i>	
1.1. Olivier <i>Olea europea</i>	03
1.2. Description botanique	04
1.3. Taxonomie d' <i>Olea europea</i>	05
1.4. Composition d' <i>Olea europea</i>	05
1.5. Utilisation d' <i>Olea europea</i>	05
Chapitre 2 : Composés phénoliques et leurs activités	
2.1. Les métabolites secondaires	06
2.2. les composés phénoliques.....	06
2.3. Principales structure phénoliques	06
2.3.1. Acide phénoliques	06
2.3.1.1. Acides hydrox benzoïques	06
2.3.1.2. Acides hydroxycinnamique	07
2.3.2. Flavonoïdes	07
2.3.3. Tanins	07
2.4. Effets biologique.....	08
2.4.1. Effet antibactérienne.....	09
Chapitre 3 : Matériel et méthodes	
3.1. Matériel végétal	10
3.2. Préparation de l'extrait aqueux.....	10
3.2.1. Extraction par macération	10
3.2.2. Extraction par décoction.....	10

3.2.2. Extraction par infusion.....	10
3.3. Dosage des polyphénols totaux.....	11
3.4. Dosage des flavonoïdes.....	12
3.5. Analyse microbiologique des feuilles.....	13
3.5.1. Activité Antibactérienne.....	13
3.5.2. Milieu de culture	13
3.5.3. Préparation des dilutions des extraits.....	14
3.5.4. Préparation de pré-culture.....	14
3.5.5. Préparation de la suspension bactérienne	14
3.5.6. Ensemencement.....	14
3.5.7. Application des disques.....	14
3.5.8. Expression des résultats.....	15

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4.1. Calcul du rendement.....	16
4.2. Teneur en polyphénols totaux	17
4.3. Teneur en Flavonoïdes totaux.....	17
4.4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	18
4.5 Résultats selon la dilution et les extraits aqueux.....	20
4.5.1. Extrait préparé par décoction.....	20
4.5.2. Extrait préparé par macération.....	20
4.5.3. Extrait préparé par infusion.....	21
4.6. Résultat selon les souches (type de Gram).....	24
Conclusion	26
Bibliographie	28

Annexe

Résumé

Liste des tableaux

Tableau.1. Les microorganismes testés.....	13
Tableau.2 . teneur en polyphénols des extraits aqueux.....	17
Tableau.3 . teneur en flavonoides totaux des extraits aqueux.....	18
Tableau.4. Diamètres des zones d'inhibition bactériennes en (mm).....	19
Tableau.5. Les zones d'inhibitions vis-à-vis les sept souches.....	23

Liste des figures

Figure.1. les principales parties d'un olivier (Argenson.1999).....	04
Figure .2. Exemples de phénols simples et leurs dérivés (PEREZ et <i>al.</i> , 2008)..	07
Figure.3. Familles des flavonoïdes (PEREZ M.E et <i>al.</i> , 2008).....	08
Figure.4. Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérés comme sites d'action pour les composés naturels (Silva NCC et <i>al.</i> , 2010).....	09
Figure.5. protocole d'extraction de polyphénols.....	11
Figure. 5. Histogramme représente le rendement d'extraction d'O.europa.....	16

Liste des abréviations

EAD : extrait aqueux par décoction.....	10
EAM : extrait aqueux par macération	10
EAI : extrait aqueux par infusion	11
AML : amoxicilline.....	13
GEN : gentamicine.....	13
TE : tétracycline.....	13
UFC : unité fondamentale des colonies.....	14
MS : masse sèche	16
PPT : polyphénols totaux.....	16
DMSO : Diméthylsulfoxyde.....	17
SM : solution mère.....	19
AUG : amoxicilline + acide clavulanique.....	19

Introduction

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques et pharmacologique. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) ou sont des dérivés de produits naturels. En dépit de cela, dans les dernières décennies, principalement en raison de l'avancée de la chimie de synthèse, la recherche sur les produits naturels dans l'industrie pharmaceutique a connu un lent déclin (Boldi. 2004).

Toutefois, des données récentes de l'industrie pharmaceutique montrent que, pour certaines maladies complexes, les produits naturels représentent toujours une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques, car ils représentent des structures privilégiées choisies par les mécanismes d'évolution sur une période de millions d'années (Boldi. 2004).

la résistance des microorganismes aux antibiotiques est un problème majeur de la santé publique (Decoussera JW et *al.*, 2010).

En effet, depuis quelques années, un intérêt accru s'est porté sur des molécules d'origine végétal ayant montré des propriétés antimicrobiennes.

En Algérie, les plantes ont une importance dans la médecine traditionnelle. Les remèdes utilisant les plantes, sont moins chères et sans effet indésirables. Dans le cadre d'attribuer les effets biologiques à l'olivier, la majorité des études sont faites sur les propriétés pharmacologiques de l'huile d'olive (Owen et *al.* ,2000).

Concernant les feuilles, elles font actuellement l'objet de recherches dans le vaste domaine de la médecine et de la pharmacologie (Chebaibi et *al.* , 2007).

L'olivier est un arbre légendaire à forte résonance symbolique qui représente à la fois, la paix, la longévité et la sagesse. Ayant survécu au poids des siècles grâce aux mythes et croyances qui lui étaient attribués, il a de tout temps été un arbre privilégié des civilisations méditerranéennes. En effet, plus de 5000 ans en arrière, l'olivier était déjà considéré comme une importante source d'alimentation (Polèse, 2009).

Il est très probablement le tout premier arbre fruitier domestiqué, faisant de lui l'un des plus anciens produits de l'agriculture, à la portée tant économique que culturelle (Vossen .2007).

Cette étude a pour but d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits aqueux issus a partir des feuilles d'*Olea europea* de la région de Biskra vis-à-vis des sept souches pathogène.

Partie Bibliographique

- Chapitre 1 -
Généralité sur
Olea europea

1.1. Olivier *Olea europea*

Olivier est un arbre qui donne une véritable marqué végétal à l'échelle des territoires qui occupe des grandes implications écologiques, sociales et économiques.

Les paysages de l'olivier sont multiples. la grosseur des troncs, leur espacement, le port des frondaisons, les superficies mises en culture sèche ou irrigué, la saveur des olives, tout concourt à la diversité avec une même végétale espace. (Schauenberg et *al.*, 2013).

L'olivier (*Olea europea*) est une espèce largement cultivée dans le bassin méditerranéen depuis la plus haute antiquité (Djnane et *al.*, 2012) .

L'olivier oléastre et l'olivier cultivé savita relève de la même espèce *Olea europea*. L'oléastre se différencie par son bas buissonnant, ses rameaux épineux, des feuilles et des fruits petits. On peut en découvrir abandonnés ou retournés à l'état sauvage dans les îles de la Méditerranée .L'olivier cultivé se caractérise par ses feuilles opposées, d'une durée d'existence de 3 années, longue et étroites, à la couleur vert foncé luisant sur leur dessus couvert d'une cuticule imperméable, au gris argenté mat pour la face inférieur ou se produit l'évaporation (Patrick.L.2008).

L'olivier a su ainsi adapter aux régions présahariennes, même s'il supporte mal les chaleurs excessives qui brulent son feuillage Malgré ses apparences rustiques et ses besoins modestes, il reste fragile. S'il s'accommode de fiable apport d'eau (la plus basse pluviométrie acceptée par une espèce fruitière et de terre légèrement salées, il peut mourir des effets d'une humidité excessive entraînant la pourriture de ses racines (Patrick.L.2008).

Les recherches réalisées "*in vitro*" par plusieurs auteurs ont démontré que les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis de nombreux microorganismes. (Djnane et *al.*, 2012).

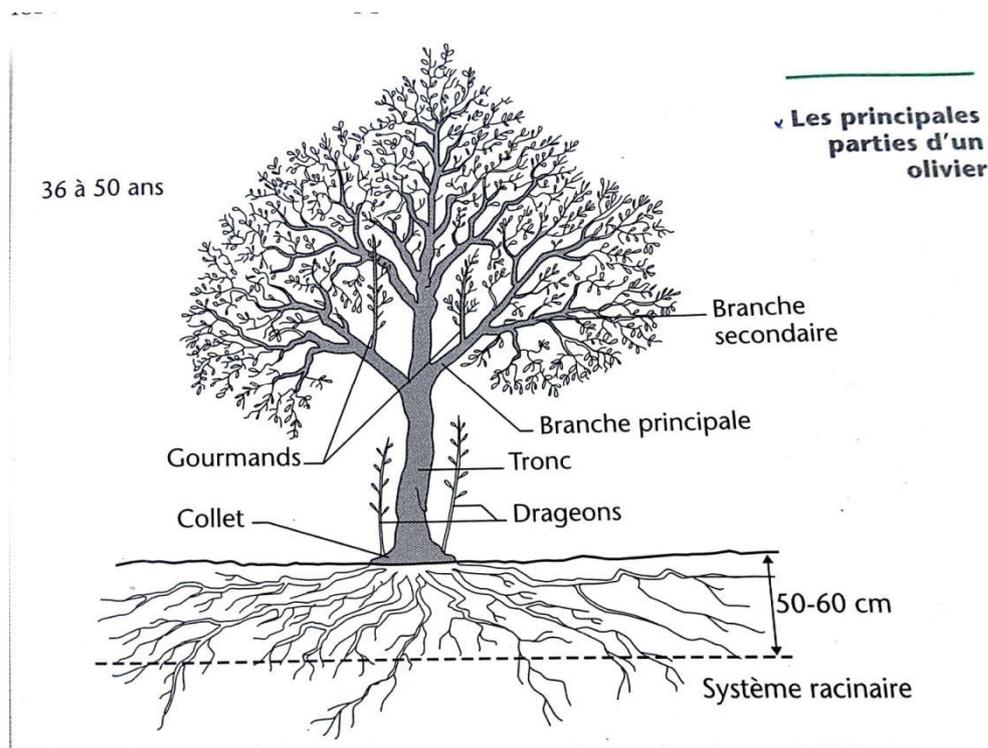


Figure.1. les principales parties d'un olivier (Argenson.1999)

1.2. Description botanique

- Petit arbre émettant de nombreux rejets, au tronc souvent court, trapus et irrégulier, se divisant en grosses branches tortueuses aux rameaux gris blanchâtre.
- Ecorce verdâtre et lisse d'abord, puis gris brun et profondément crevassée.
- Bourgeons petits, grisâtres et velus.
- Feuilles persistantes, de 2 à 8 cm, opposées, simples et entières, ovales lancéolées, à pétiole court, à bordure légèrement enroulée, vert foncé et luisantes dessus, blanchâtres dessous.
- Fleurs petites, blanches, en petites grappes odorantes à l'aisselle des feuilles.
- Fruits (olives) verts, virant au violacé, puis noirs à maturité, de tailles et de forme variables suivant les variétés (Jean-Marie.2010).

L'oléastre (olivier sauvage) est un arbrisseau buissonnant, mais l'arbre cultivé a un tronc typiquement noueux. Il préfère un climat chaud et tolère les sécheresses périodiques. Longévif, peut vivre jusqu'à 500ans. , il fut répandu dans toute la méditerranée. (Carol et al ., 2008).

1.3. Taxonomie

Olea europea arbre appartient à la famille des Oléacées dans l'ordre botanique des Ligustrales qui comprennent près de 30 genre et 500 espèces (Patrick.L.2008).

- Embranchement : Phanérogames
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Série : Terebinthales
- Ordre : Ligustrales
- Famille : Oleacées
- Genre : *Olea*
- Espèce : *Olea europea*
- Sous espèce : *savita*
- Sous espèce : *Oleaster* (Argenson et al., 1999)

1.4. Composition

Il a été établi que les sécoiridoïdes (oleuropéine et ses dérivés), une des classes principales des contenues dans l'olive, l'huile d'olive et feuilles d'olivier, empêche ou retarde le taux de croissance d'une gamme de bactéries et de microchampignons (Bisignano.G et al., 1999) .

1.5. Utilisation

L'olivier est cultivé depuis au moins 3 500 ans avant notre ère, pour ses fruits et pour l'huile qu'on en tire. Le nom scientifique de l'arbre, *Olea*, vient d'un mot qui signifiait « huile » chez les Grecs de l'Antiquité. À cette époque, les feuilles sont employées pour désinfecter les blessures cutanées. Les Anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Ces usages sont tombés en désuétude pendant un certain temps en raison de l'omniprésence des antibiotiques. Cependant, depuis quelques années, des suppléments de feuille d'olivier se trouvent sur le marché. Les fabricants de ces produits en vantent les vertus pour le système immunitaire et contre les infections virales, bactériennes, fongiques et à levure (Micol.2005).

- Chapitre 2 -
Composés phénoliques
et leurs activités

2.1. Métabolites secondaires

Présents chez toutes les plantes vasculaires (Lebham, 2005), n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal (Guignard, 2001).

appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...) qui sont très inégalement repartis chez les végétaux mais dont le niveaux d'accumulation peut quelque fois atteindre des valeurs élevés (Macheix *et al.*, 2005)

2.2. Composés phénoliques

Tous les végétaux contiennent les composés phénoliques (Pascale et Véronique.2006).

Un groupe largement distribué de métabolites secondaires. On définit les polyphénols comme des composés aromatiques portant plus qu'une fonction hydroxyle sur un noyau benzénique (Perez *et al.*, 2008).

Mais, comme c'est le cas pour la plupart des substances naturelles qualifiées de métabolites secondaires,. Ils correspondent à une très large gamme de structure chimique et sont un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes, capacité qui permet à l'homme de les utiliser dans des domaines variés (Pascale et Véronique.2006).

L'oleuropéine, le composé phénolique majoritaire, constitue 24% des composés d'un extrait des feuilles d'olivier. (Altiok *et al.*, 2008).

2.3. Principales structure phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base, ensuite par le degré de modification de ce squelette, en fin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (Pascale et Véronique.2006).

2.3.1. Acide phénoliques

2.3.1.1. Acides hydrox benzoïques

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une forme de base de type C6-C1.il existent fréquemment sous forme d'ester ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structure complexes comme certains tanins. (Pascale et Véronique.2006).

2.3.1.2. Acides hydroxycinnamique

Ils représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont l'acide p-coumarique. L'ensemble est souvent rapporté sous le vocable commun de phénylpropanoïdes. Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters ou de glycoside. (Pascale et Véronique.2006).

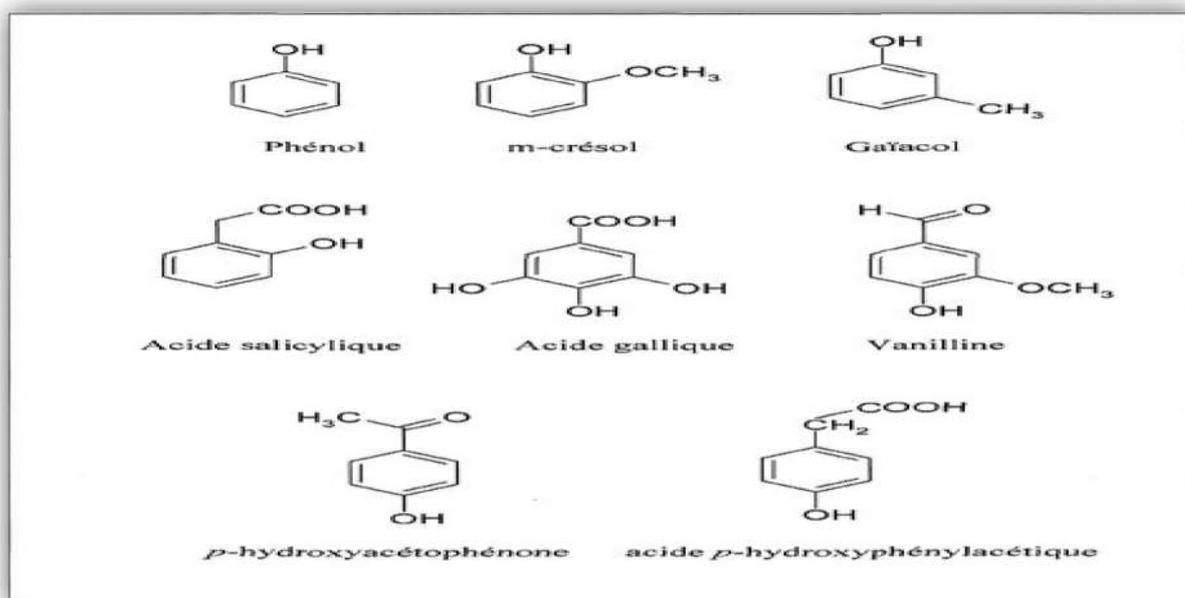


Figure .2. Exemples de phénols simples et leurs dérivés (Perez et *al.*, 2008)

2.3.2. Flavonoïdes

Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles.

Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C15, caractérisée par un enchaînement de deux noyaux aromatiques A et B liés une unité de trois carbones Ar (A)-C3-Ar (B), les différentes classes sont déterminées par le degré d'oxydation de l'unité de liaison (C3), tandis que, les composés de la même classe sont déterminés par le point d'hydroxylation, ou d'autre substitution, du noyau A ou B (Riberau .P, 1968)

2.3.3. Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau. En plus de présenter les réactions caractéristiques des phénols en général, ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines. Cette réactivité avec les

protéines est à l'origine des propriétés tannantes qu'ils exercent sur le collagène de la peau au cours de la transformation de la peau en cuir, la rendant imputrescible et moins perméable à l'eau (Stevanovic.2005).

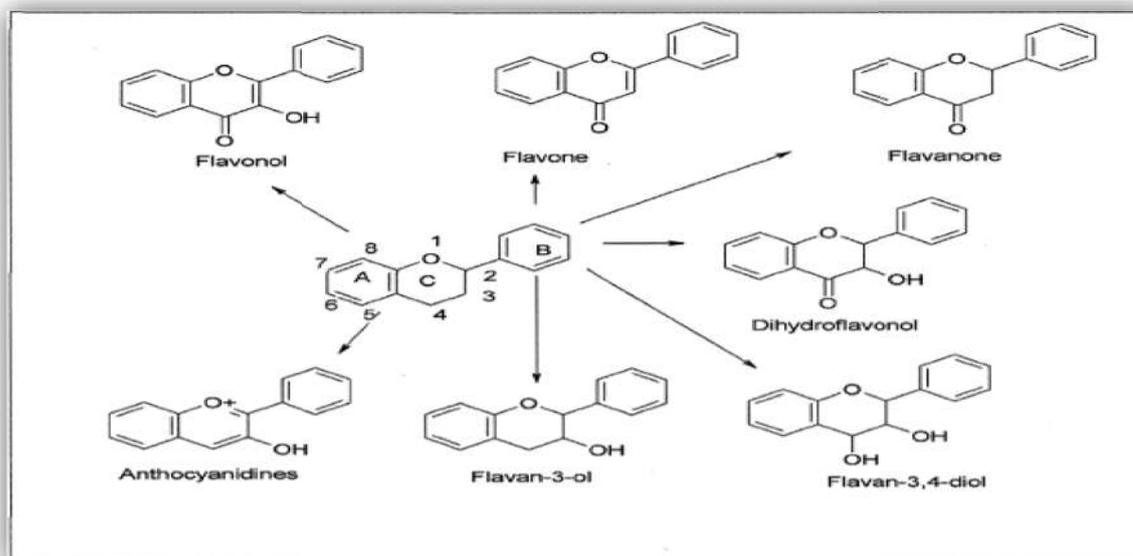


Figure.3. Familles des flavonoïdes (Perez et al., 2008).

2.4. Effets biologique

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* de tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les flavonoïdes et les tannins.

Elles ont été utilisées dans de nombreux domaines incluant par exemple la médecine, la nutrition, l'assaisonnement, les boissons, les teintures et les cosmétiques.

L'effet Conservateur de plusieurs plantes aromatiques (épices, condiments) suggère la présence de constituants antioxydants et antimicrobiens. (Boizot.2006)

2.4.1. Effets antimicrobien

Les mécanismes d'action des composés naturels sont liés à la désintégration de la membrane cytoplasmique, la déstabilisation de la force motrice des protons, le flux d'électrons, le transport actif et la coagulation du contenu des cellules (Figure 4).

Les polyphénols agissent par privation de substrat, rupture de la membrane et complexe la paroi cellulaire (Silva NCC et *al.*, 2010).

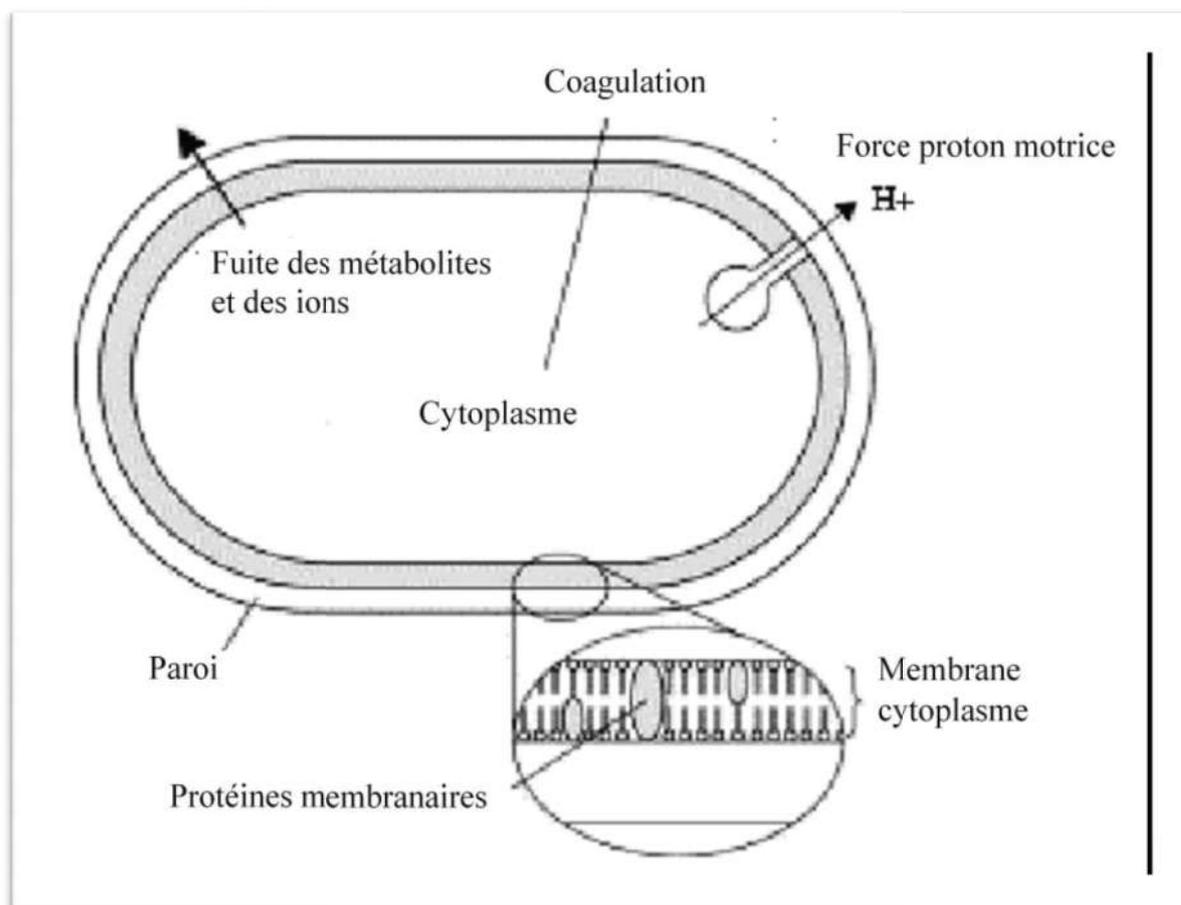


Figure.4. Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérés comme sites d'action pour les composés naturels (Silva NCC et *al.*, 2010).

Partie Expérimentale

- Chapitre 3 -

Matériels et méthodes

3.1. Le matériel végétal

Dans cette étude, l'échantillon du matériel végétal utilisé a été récolté dans la wilaya de Biskra pendant la saison de floraison. Après la récupération de la plante, les feuilles sont lavées puis laissées sécher à l'ombre et à la température ambiante dans un endroit aéré, pendant 20 jours. Les feuilles sèches ont été broyées à l'aide d'un moulin à café et le broyat obtenu a été conservé dans un flacon à température ambiante, dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité et de la lumière jusqu'à son utilisation.

3.2. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux de cette plante a été préparé par trois méthodes d'extraction ; macération, décoction et infusion.

3.2.1. Extraction par macération

L'extrait aqueux par cette méthode de la partie aériennes (feuilles) on été préparé selon la méthode décrite par (Boubakeur et *al.*, 2017) Avec une légère modification : 50 g du matériel végétal broyé est mis à macérer dans 500 ml d'eau distillée sous agitation magnétique et à une température ambiante. Cette macération est répétée trois fois successivement avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Les macérats aqueux obtenus sont soumis à la double filtration sur coton hydrophile et sur papier-filtre Whatman n° 3. Après séchage à l'étuve (37 °C) pendant 48 heures, l'extrait obtenu on été nommés EAM puis conservés à 4 °C pour les travaux ultérieurs.

3.2.2. Extraction par décoction

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par (Boubakeur et *al.*, 2017). Une quantité de 50 g du matériel végétal broyé est mise à bouillir pendant 15 minutes dans 500 ml d'eau distillée. Après filtration sur papier-filtre Whatman n° 3, les filtrats ont été ensuite concentrés et séchés dans l'étuve et nommés EAD puis conservés à 4 °C pour les travaux ultérieurs.

3.2.3. Extraction par Infusion

L'extrait aqueux de poudre des feuilles que nous faisons infuser 150g dans 3 litres d'eau distillée chauffée à 100 °C. Ce mélange est agité pendant 24 heures par un agitateur magnétique. Ensuite la solution est filtrée sur papier Wattman (3 mm),

l'extrait obtenus à été nommés EAI et conservés à 4 °C pour les travaux ultérieurs (Soro et *al.*, 2009).

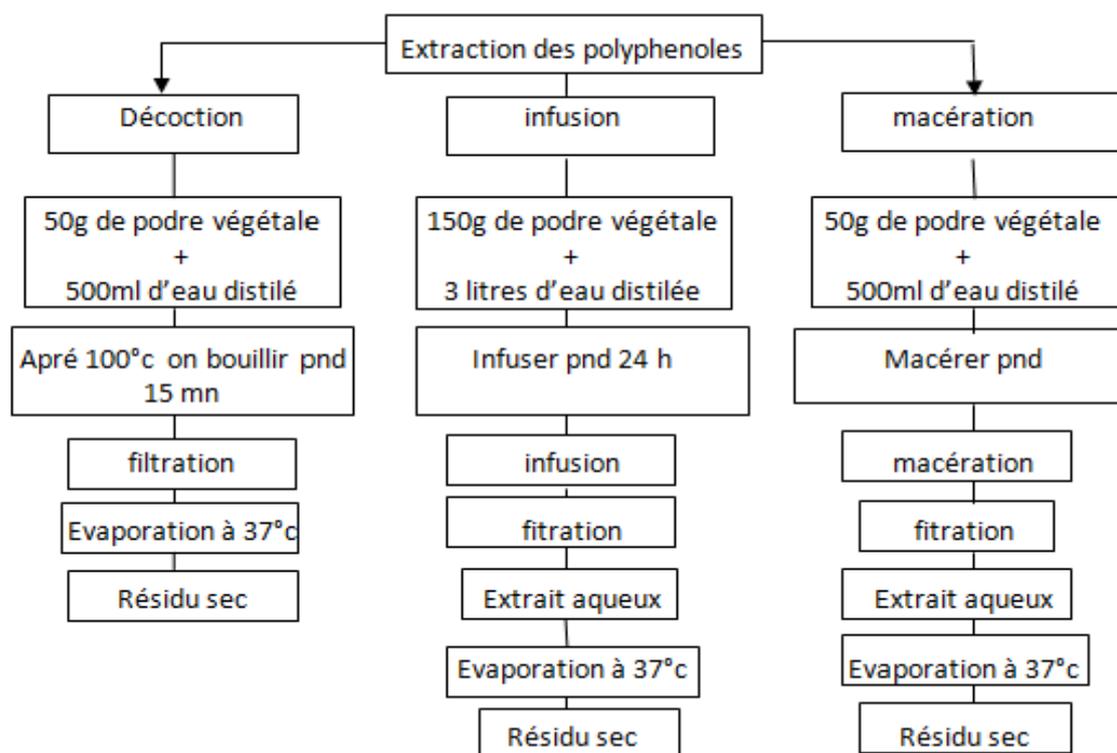


Figure.5. protocole de préparation des extraits aqueux

3.3. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

La teneur en polyphénols totaux sont estimées selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et *al.*, 1999) qui est considérée parmi les meilleurs méthodes de quantification des polyphénols totaux des extraits de plantes (Robards, 2003).

L'oxydation des composés phénoliques par le réactif de Folin-Ciocalteu résulte de la réaction entre l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PM₁₂O₄₀) en milieu alcalin. Cette réduction se traduit par l'apparition d'une coloration bleue formée d'un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (M₈O₂₃) qui sont proportionnels à la concentration en polyphénols dans le mélange (Blouin et *al.*, 1972).

- **Mode opératoire**

0.5ml de chaque extrait de *Olea europea* (1mg/ml) sont ajoutés à 5 ml d'eau distillée puis en ajout 0.5ml du réactif de Folin- Ciocalteu dilué 10 fois .Après 3min,

0.8 ml de carbonate de sodium (7.5%) sont ajoutés. Les tubes sont agités et incubés à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après 1h d'incubation, les absorbances des mélanges sont mesurées à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS, contre un blanc qui comporte les mêmes composants à l'exception de l'extrait testé. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Le taux de polyphénols dans nos extraits, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique (20 – 200 $\mu\text{g/ml}$).

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait de feuilles ($\mu\text{g EAG/mg}$).

3.4. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La formation d'une liaison covalente entre le trichlorure groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes produit un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430 (Rezzaghi, 2012).

- **Mode opératoire**

La teneur en flavonoïdes des extraits aqueux a été déterminée spectrophotométriquement selon la méthode de trichlorure d'aluminium AlCl_3 décrite par (Ayoola *et al.*, 2008 ; Mbaebie, 2012) avec des modifications : Le chlorure d'aluminium forme des complexes janoïdes avec les atomes, d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

Brièvement, 1 ml de l'échantillon (1mg/ml) est ajouté à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) établie par la quercétine, réalisée dans les mêmes Conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de Quercétine par un milligramme d'extrait de feuilles ($\mu\text{g EQ/mg}$).

3.5. Activité Antibactérienne

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des différents extraits des feuilles d'*Olea europea*, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application de disques imprégnés de principes actifs sur des milieux de culture ensemencés de microorganismes. L'activité antimicrobienne, quand elle était présente, se manifestait alors par des zones d'inhibition autour des disques.

3.5.1. Souches testées

Sept souches bactériennes ont été utilisées dans ce travail, parmi elles deux souches de référence.

Tableau.1. Microorganisme testées

Les souches bactériennes testées	Grams	Les antibiotiques utilisés
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique	Positif	AML
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	Positif	AML
<i>Escherichia coli</i> clinique	Négatif	GEN
<i>Escherichia coli</i> ATCC	Négatif	GEN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinique	Négatif	TE
<i>Klebsiella pneumoniae</i> clinique	Négatif	AUG
<i>Streptococcus enteridis</i> clinique	Positif	AML

3.5.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation du test antibactérien sont les suivants (annexe. 3) :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries à l'extrait de la plante.

3.5.3. Préparation des dilutions des extraits

L'extrait de la plante a été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec dilutions successives au demi (1/2,1/4,1/8). Sachant que la concentration de la solution mère de l'extrait est 1 mg/ml.

3.5.4. Préparation de pré-culture

Nos bactéries sontensemencées à partir du bouillon nutritif (BN) sur des boîtes de pétri contenant une gélose (GN) puis incubées pendant 24 heures à 37 °C pour obtenir des colonies jeunes.

3.5.5. Préparation de la suspension bactérienne

Chaque souche a étéensemencée en stries sur les milieux gélosés pour obtenir des colonies isolées. Après incubation de 24h à 37°C, on a choisi 4 à 5 colonies bien isolées qu'on a transféré à l'aide d'une anse de platine dans un tube de solution d'eau physiologique afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de 0,5 Mc Farland (10^6 UFC/ml), ce qui correspond à une D.O = 0.08 à 0.1 / $\lambda = 625\text{nm}$) (Pfaller et *al.*, 1998) .

3.5.6. Ensemencement

Dans les 15min suivant l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière de la gélose Mueller Hinton à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60°après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

3.5.7. Application des disques

Des disques stériles de papier Wattman N°1 ont été déposés à l'aide d'une pince. Puis on dépose sur chaque disque 10 μ l des concentrations croissantes d'extraits.

Toutes les boîtes préparées ont été incubé pendant 24h à 37°C. De même des boîtes réalisées avec des disques contenant de l'antibiotique de référence (Témoin positif) appropriés prêtes à la comparaison avec les résultats de l'extrait testé et des disques imprégnés de DMSO (Témoin négatif).

3.5.8. Expression des résultats

L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure à l'aide d'un pied à coulisse des diamètres des zones d'inhibition (mm) formées autour des disques. La sensibilité des bactéries cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition .

Chaque essai est répété trois fois.

Selon Konan *et al* (2014), les diamètres des zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne sont rangés en 4 classes à savoir :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre <8 mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 8 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 20 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20 mm.

**-Chapitre 4 -
Résultats et
Discussions**

4.1. Calcule du rendement

Dans cette étude, nous avons procédé à la préparation de trois extraits aqueux par macération, infusion et décoction à partir de la partie aérienne (feuilles) de l'espèce *Olea europea*, et cela afin d'évaluer leur activité antibactérienne.

Les trois extraits aqueux obtenus ont permis de déterminer les rendements suivant (figure.6).



Figure. 6. Histogramme représente le rendement d'extraction à partir des feuilles d'*O.europea*.

A fin de ces résultats, on a noté que l'extrait de l'infusion a permis d'obtenir le meilleur rendement 21.9 % suivi par la macération avec un rendement de 20.84% et enfin la décoction avec 18.6 % qui représente un faible rendement.

D'après le travail qui a été réalisé par Reffas (2016), ils ont trouvé que le rendement d'extraction par infusion est de 10 %.

Le rendement d'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir les facteurs environnementaux tels que la géographie, la température, la longueur du jour, les éléments nutritifs, etc., devraient être examinés pour leur rôle clé dans la composition chimique des extraits obtenus à partir des feuilles d'oliviers. Ainsi que la variation de l'espèce végétale elle-même, l'organe végétale, le stade de la croissance, la période de juillet, la conservation du matériel végétale et la méthode d'extraction (Abdlouahid et al.,2004).

4.2. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques obtenus à partir des extraits aqueux a été estimées grâce à une courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $Y=0.0023x$, sachant que le coefficient de corrélation est : $r^2 = 0.9831$.

Tableau.2. Teneur en polyphénols totaux des extraits aqueux

Extraits	Teneur en $\mu\text{g EAG/mg Extrait}$ (Moyenne \pm écart type)
Infusion	287.39 \pm 0.050
Décoction	244.78 \pm 0.007
Macération	123.91 \pm 0.001

D'après les résultats obtenus dans (tab.2), on note que la forte teneur en polyphénols est trouvé avec l'extrait préparé par infusion (287.39 \pm 0.050 EAG/mg) suivi par l'extrait préparé par la décoction (244.78 \pm 0.007 EAG/mg), alors que la fraction la plus faible est celle de la macération (123.91 \pm 0.001 EAG/mg).

Ces résultats sont supérieurs a ceux rapporté par Reffas (2015), par l'infusion sur la quantification des composés phénoliques dans les feuilles d'olive a trouvé (197. mg EAG/g d'extrait).

Une étude fait par Manallah (2012), sur les pulpes d'olive avec deux variétés sur la quantification des polyphénoles totaux trouver les valeurs suivant (3.93 et 91) respectivement par la méthode d'infusion.

Dans une autre étude réalisée par Arab (2013), on utilise la méthode de macération, avec un rendement 35,72%.

4.3. Teneur en Flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits aqueux d'*O.europea* est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine qui suit une équation de type : $Y=0.002x$. Sachant que le coefficient de corrélation est : $r^2 = 0.999$.

Tableau.3. Teneur en flavonoïdes totaux des extraits aqueux

Extraits	Teneur en $\mu\text{g EAG/mg}$ (Moyenne \pm écart type)
Infusion	88 \pm 0.050
Décoction	98.5 \pm 0.002
Macération	59 \pm 0.005

D'après les résultats obtenus dans (tab.3) on note que la forte teneur en flavonoïde est avec l'extrait préparé par décoction (98.5 \pm 0.002EAG/mg) suivi par l'extrait préparé par l'infusion (88 \pm 0.050EAG/mg) et la plus faible fraction par la macération (59 \pm 0.005EAG/mg).

Ces résultats sont inférieurs à ceux rapporté par Reffas (2015), qui ont trouvé avec la méthode d'infusion une teneur de 198.73 $\mu\text{g EAG/mg}$.

D'après Dekanski et *al.* (2009), ils ont mentionnés que la teneur des flavonoïdes des extraits des feuilles d'olive préparés par infusion est de 27 $\mu\text{g EAG/mg}$.

La différence de la quantité des polyphénols entre les extraits, dépend de la variété de l'olivier, des conditions climatiques, de l'époque de prélèvement des échantillons des feuilles, de l'âge des plantations et des échantillons des feuilles. (Aouidi.2012).

En plus de ces facteurs de variabilité, il s'ajoute l'effet de la méthode de préparation des feuilles d'olivier (déshydratation et broyage), du procédé et des techniques d'analyses qualitative et quantitative des composés phénoliques (Aouidi.2012).

4.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux de feuilles d'olivier est déterminée par la technique de diffusion sur gélose (antibiogramme) par la mesure du diamètre de la zone inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis –à-vis des sept souches.

Après 24 h d'incubation à 37 °C. Les résultats obtenus (diamètre d'inhibition en mm) pour les différentes dilutions (1/2, 1/4, 1/8) qui ont été préparé à partir de la

concentration initial (SM) de l'extrait dans le DMSO (1mg/ml), sont regroupés dans le tableau ci dessous.

Tableau.4. Diamètres des zones d'inhibition bactériennes en (mm)

Les bactéries		<i>E.Coli</i>	<i>E.Coli</i> ATCC 25922	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i> ATCC 25923	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	<i>S.</i> <i>enteritidis</i>
Décoction	SM	00±00	7±0,041	8.5±0,132	00±00	00±00	7.5±0,707	7±0,041
	1/2	00±00	7±0,041	8.5±0,933	00±00	00±000	7.5±0,707	9±1
	1/4	00±00	8±0,619	9.5±0,508	00±00	00±00	8.5±0,707	8±0,578
	1/8	00±00	8±0,726	7.5±0,359	00±00	00±00	8.5±0,707	8±1
Macération	SM	00±00	00±00	8.5±0,933	00±00	00±00	00±00	8.33±0,578
	1/2	00±00	8±0,619	8±0,619	00±00	00±000	9±1,414	7.5±0,359
	1/4	00±00	8±0,619	8.5±0,132	00±00	00±00	7.5±0,707	10±0,774
	1/8	00±00	00±00	10±0,132	00±00	00±00	00±00	8±1
Infusion	SM	9±0,196	00±00	00±00	9±0,196	00±00	8±0,657	00±00
	1/2	00±00	00±00	9±0,196	00±000	00±00	7±0,949	8.5±0,933
	1/4	8±0,619	00±00	00±00	8±0,619	00±00	8±0,657	9±1
	1/8	10±0,619	00±00	8±0,619	10±0,619	00±00	8±0,657	7.66±0,577
Témoin	0	0	0	0	0	0	0	
Négatif	0	0	0	0	0	0	0	
Témoin positif	29.33± 2,082	27±0,141	11±1,414	9.5± 0,707	19±1,414	11±1,414	15± 0,243	

La mesure de diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les extraits aqueux, à révelée :

- Absence d'une activité pour les disques témoins négatifs, ce qui indique que le DMSO n'a aucun effet sur les souches bactériennes testées.
- Une forte activité pour les disques témoins positif. Dont la Gentamycine donne une zone inhibition est de 29.33mm et 27mm contre les 2 souches testées *E. coli* et *E.Coli* ATCC 25922, respectivement. Tandis que avec l'amoxicilline, les diamètres d'inhibition enregistrés pour *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 et *S. enteritidis* sont ; (11±0,414) mm (9.5±0,707) mm et (15±0,243) mm, respectivement. L'antibiotique tétracycline et AUG contre les

souches *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* donnent une zone inhibition de 19 mm et 11 mm, respectivement (Voir tableau 05 et annexe n°5).

- Concernant les trois extraits testés, on a remarqué qu'il existe une résistance des bactéries ; *E. coli*, *S. aureus* ATCC 25923 et *P. aeruginosa* pour les extraits qui sont préparés par décoction et macération, Alor que par l'extrait de l'infusion, on a trouvé une activité pour toutes les bactéries sauf *E.Coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa*.
- D'après Konan *et al.* (2014), la sensibilité des bactéries vis-à-vis de trois extraits aqueux peut être déterminée en fonction du diamètre de la zone d'inhibition obtenu. Selon les valeurs critiquent figurant dans le tableau (Tab 4), On peut constater que la sensibilité des souches testées est de type limitée (8-14 mm).

4.5 Résultats selon la dilution et les extraits aqueux

L'activité antibactérienne varie d'une bactérie à une autre selon la concentration et la qualité des extraites selon la méthode d'extraction.

4.5.1. Extrait préparé par décoction

Pour cet extrait, l'activité est reste faible et très proche pour les quatre concentrations, dont la zone d'inhibition est varie de 7 à 9,5 mm.

- **SM** : la bonne zone d'inhibition est remarquée avec *s.aureus* (8.5 mm)
- **Dilution 1/2** : la bonne zone d'inhibition est remarquée avec *S.enteritidis* (9 mm).
- **Dilution 1/4** : la bonne zone d'inhibition est remarquée avec *s.aureus* (9.5 mm)
- **Dilution 1/8** : la bonne zone d'inhibition est remarquée avec *K. pneumoniae* (8.5 mm)

4.5.2. Extrait préparé par macération

Pour cet extrait, la zone d'inhibition est varie de 7.5 à 10 mm.

SM : toutes les bactéries sont résistantes sauf *S .aureus* et *S.enteritidis*, dont la zone d'inhibition est presque similaire.

- **Dilution 1/2** : a cette dilution la meilleure zone est pour *K. pneumoniae* (9 mm).
- **Dilution 1/4** : une zone d'inhibition de 10 mm est remarquée par *S. enteritidis*
- **Dilution 1/8** : toutes les bactéries sont résistantes sauf *S. aureus* et *S. enteritidis*, avec une zone de 8 et 10 mm, respectivement.

4.5.3. Extrait préparé par infusion

Pour cet extrait, la zone d'inhibition est variée de 7 à 10 mm. Dont la résistance des bactéries est observée seulement pour *P. aeruginosa* et *E. coli* ATCC 25922

- **SM** : la bonne zone d'inhibition est pour *E. coli* (9 mm).
- **Dilution 1/2** : la bonne zone d'inhibition est pour *S. aureus* (9 mm).
- **Dilution 1/4** : on note une activité de 9 mm d'inhibition sur *S. enteritidis*

Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Gökmen et al. (2014), qui ont montré que l'extrait des feuilles d'Oliver a une forte activité inhibitrice contre les souches *S. aureus* et *P. aeruginosa* avec des diamètres d'inhibition respectivement (18.7 et 18.00 mm).

Des résultats similaires ont été présentés par DJENANE et al. (2012), vis-à-vis les bactéries *S. aureus* et *P. aeruginosa* avec un diamètre de (16,33 et 15,29 mm), respectivement.

Une autre étude a été réalisée par REFFAS et al. (2016), dont les zones d'inhibition varient entre (6 – 8 mm) et (5 – 9 mm), pour les bactéries : *Escherichia coli*, *Streptococcus enteritidis*, respectivement. Sachant que l'extraction de ces produits est méthanolique.

D'après les résultats obtenus, on peut dire que ces extraits ont une activité antibactérienne qui varie d'une souche à une autre. Cette activité peut être importante, faible ou nulle suivant la concentration de l'échantillon, et selon le degré de sensibilité des souches. On remarque également que l'activité antibactérienne des différentes concentrations a été pour certaines souches, plus importante que l'extrait non dilué, ce qui s'explique par le fait qu'une concentration plus élevée en principe active sature le milieu et donc par ce fait limite les échanges entre la bactérie et son environnement ce qui ne permettrait pas à l'extrait d'exercer son action (Rees et al., 1985).

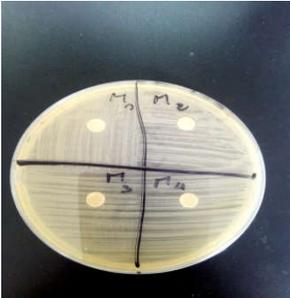
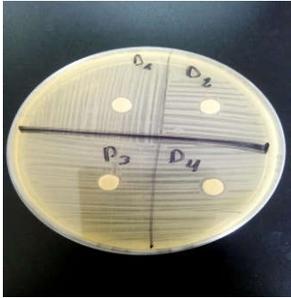
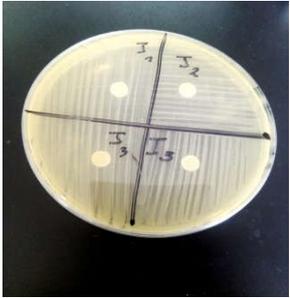
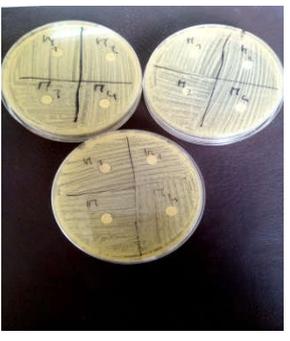
Les principales composantes de ces extraits végétaux sont le reflet de leur activité antibactérienne. Ainsi, les fonctions synergiques des différentes molécules contenues dans les extraits par rapport à l'action d'un ou deux composants principaux de l'extrait semblent discutables. Toutefois, il est possible que l'activité des composants majeurs soit modulée par d'autres molécules mineures. En fait, les effets synergiques des divers constituants majeurs et mineurs présents dans les extraits végétaux bruts doivent être pris en considération pour rendre compte de leur activité biologique. Selon des études concernant les mécanismes d'action antimicrobienne de ces molécules, il semblerait que suite à une désintégration de la membrane cellulaire bactérienne provoquée par ces substances, la fuite des métabolites intracellulaires provoque la mort de la cellule (Cristani *et al.*, 2007).

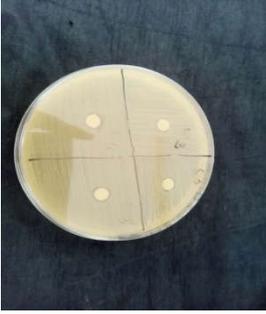
La résistance de la souche peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar (Hayouni *et al.*, 2007). Il peut aussi lier à la méthode de diffusion en milieu gélosés (Fazeli *et al.*, 2007).

L'activité antibactérienne des polyphénols peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al.*, 2005)

Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les huiles essentielles, flavonoïdes, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort (Rhayour, 2002).

Tableau.5. Les zones d'inhibitions vis-à-vis les sept souches.

Les bactéries	Macération	Décoction	Infusion
<p><i>E.Coli</i> ATCC 25922</p>			
<p><i>E.Coli</i> clinique</p>			
<p><i>S. aureus</i> ATCC 25923</p>			
<p><i>S. aureus</i> clinique</p>			

<p><i>P.</i> <i>aeruginosa</i> clinique</p>			
<p><i>K.</i> <i>pneumoniae</i> clinique</p>			
<p><i>S.</i> <i>Enteritidis</i> clinique</p>			

4.6. Résultat selon les souches (type de Gram)

Pour les trois extraits qui sont préparés par trois méthodes d'extraction (macération, décoction, et infusion), on a remarqué qu'il existe une résistance pour deux bactéries de type Gram négatif (G⁻) ; *E. coli*, *P. aeruginosa*, et une bactérie de type Gram positif (G⁺) ; *S. aureus* ATCC 25923.

Les résultats montrent donc la résistance des bactéries Gram négatif à nos extraits par rapport des bactéries Gram positif ciblées aux effets de ces extraits aqueux. Cette résistance générale plus élevée chez les bactéries à Gram négatif est attribuée à la présence d'une membrane externe imperméable aux composés

lipophiles. L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne, entraînant une augmentation de la perméabilité aux ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux ou l'altération des systèmes enzymatiques bactériens (Djanane et *al.*, 2012).

Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane. (Turkmen et *al.*, 2007).

La résistance de la souche peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar (Hayouni et *al.*, 2007). Il peut aussi lier à la méthode de diffusion en milieu gélosés (Fazeli et *al.*, 2007).

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

Selon Lee and Lee (2010), l'effet antimicrobien des feuilles d'olivier est dû à sa composition phénolique, comme il a été reporté.

Considérant le grand nombre de différents groupes chimiques des composés présents dans l'extrait des feuilles d'olivier, il est plus probable que leur activité antibactérienne n'est pas attribuée à un seul mécanisme spécifique mais il y a plusieurs cibles dans la cellule (Carson et *al.*, 2002).

L'activité antimicrobienne est justifiée par plusieurs phénomènes et par plusieurs chercheurs. Parmi les mécanismes, nous pouvons citer :

- Dégradation de la paroi cellulaire (Helander et *al.*, 1998);
 - Altération de la membrane cytoplasmique (Sikkema et *al.*, 1994 ; Oosterhaven et *al.*, 1995 ; Ultee et *al.*, 2002) ;
 - Fuite du contenu de la cellule (Oosterhaven et *al.*, 1995 ; Helander et *al.*, 1998 ; Lambert et *al.*, 2001) ;
 - Coagulation du cytoplasme (Gustafson et *al.*, 1998) ;
 - Epuisement de la force proton motrice (Ultee et *al.*, 1999).
- Détérioration des protéines membranaires (Juven et *al.*, 1994 ; Ultee et *al.*, 1999) .

Conclusion

Les pays méditerranéens, et en particulier l'Algérie, possèdent un patrimoine oléicole très important. Les feuilles d'olivier sont commercialisées en tant que matériel phytothérapeutique et source naturelle de substances nutraceutiques (tel que : les composés phénoliques, les flavonoïdes...). Différentes formes de ce matériel (feuilles sèches complètes, feuilles en poudre, extrait, gélules, tisane...) sont mises sur le marché. Les producteurs en vendent leurs propriétés fonctionnelles et leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine. Ces propriétés sont généralement attribuées à leurs compositions.

La tisane des feuilles d'olivier est la forme la plus répandue pour l'usage humain de ce matériel phytothérapeutique.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux de feuilles de *Olea europea* qui sont préparés par trois méthodes différentes nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.

Le meilleur rendement d'extraction est obtenu par l'extrait de l'infusion (21.9%). La quantification des composés phénoliques a donné des résultats qui confirment la richesse de l'extrait préparé par l'infusion en polyphénols totaux. Alors que, les flavonoïdes totaux sont riches dans l'extrait préparé par décoction. Les résultats obtenus sont très encourageants pour l'utilisation des feuilles d'olivier comme un traitement traditionnel à base d'une tisane préparée par infusion.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des trois extraits a été déterminée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé vis-à-vis sept souches bactériennes. Les résultats obtenus montrent que les trois extraits testés exercent une activité vis-à-vis six bactéries, et qu'il existe une résistance des bactéries ; *E. coli*, *S. aureus* ATCC 25923 et *P. aeruginosa* pour les extraits qui sont préparés par décoction et macération. Cependant, l'extrait de l'infusion, la résistance c'était pour *E.Coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* seulement.

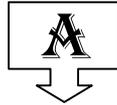
L'ensemble de ces résultats a permis d'évaluer la richesse des feuilles d'*Olea europea* en substances chimiques et qui pourraient représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives en thérapeutique.

Il est souhaitable de compléter et d'approfondir ce travail par :

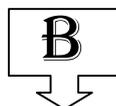
→ Isolement et identification des principes actifs responsables à l'activité antioxydante par des techniques chromatographiques et spectrales.

- L'étude *in vivo* de l'activité anti-oxydante.
- Elargir le panel des activités anti-oxydantes, dont l'activité antidiabétique, anti tumorale, anticancéreuse et anti-inflammatoire.

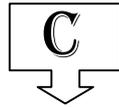
Bibliographie



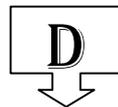
- Altıok, E., Baycin, D., Bayraktar, O., & Ulku, S. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 342–348.
- Arab Karim et al. 2013. Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologique. *Afrique SCIENCE 09(3)*.p 159 – 166.
- Argenson.C et al .1999.L'olivier.edition centre technique interprofessionel des fruits et légumes.Pari
- Ayoola.G.A., Ipay S.S., Solidiya M.O., Adepojou-Bello A.A., Coker H.A.B., Odugbemi T.O.2008.Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv.(Guttiferae). *International journal of health research*, 1(2):pp.81-93.
- Aytul, K.K., Korel, F., Arserim-Uçar, D.K., Uysal İ. & Bayraktar O, Efficacy of olive leaf extract for enhancing quality of beef cubes. In *Proceedings of the 54th International Congress of Meat Science and Technology 2004*, 51 10-15.



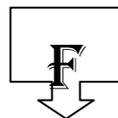
- Blouin J., Lorca L., Montreau F.R., Dufour J.H.1972.Etude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de Folin Ciocalteu .In *connaissance de la vigne et du vin 6* :pp.405-413.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafulli G., Uccella N., Saija A, Activité antimicrobienne in vitro de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol, *J Pharm Pharmacol* 1999, 51(8):971-4.
- Boubakeur H.,Rebbas., K.,Belhattab R.2017.Activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas*(L.)Moench. *Phytothérapie* :pp.1-11.
- Bruneton, J. 1999. *Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales*. 2eme édition.Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 915 p.



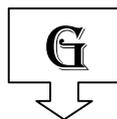
- Carol, Uet *al.* 2005. les arbres .pour l'édition française adaptation française. p 330.
- Covas M., K. Nyssönen, HE. Poulsen, J. K aikkonen, HJ. Zunft, and H. Kieseletter, The effect of polyphenols in olive on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.*, 145(2006) 333-341.
- Chebaibi, F. Rhazi, I. Lahlou amine, A. Chahlaoui et H. L' kassmi, Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles de l'olivier (*Olea europaea*L.). Journée Scientifique « Ressources Naturelles et Antibiothérapie», 22 Juin 2007, Faculté des Sciences –Kenitra (2007).



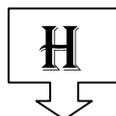
- DJENANE, Djamel, YANGÜELA, Javier, DERRICHE, Fariza, *et al.* Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature & Technology*, 2012, n°7. 53.
- Decoussera JW, Lamyb B, Pinac P, Allouchd PY, the Collège de bactériologie virologie hygiène study Group (ColBVH). Trends in antibiotic susceptibility of blood stream pathogens in hospitalized patients in France, 1996 to 2007. *Diag Microbiol Infect Dis* 2010;66:292–300.
- Dekanski D., Janictjevic-Hudomai S., Tadic V., MAarkovic G., Ariic I., Mtrovic D.2009. Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract, *J. Serb. Chem. Soc* 74 (4):p.367–377.



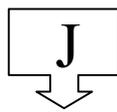
- Fazeli M, Amin G, Ahmadin-Attari M, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N, Antimicrobial activities of Iranian sumuc and avishane shirazi (*Zotaria multiflora*) against some food-borne bacteria, *Food Control Ethnopharmacol*, 18, 2007, 123-126.
- Fathia AOUIDI.2012.ETUDE DE VALORISATION DES FEUILLES D'OLIVIERS *olea europea* dans l'industrie agro-alimentaire. Université du Carthage.



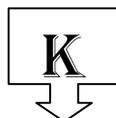
- Guignard J. 2001. Botanique systématique moléculaire. 2ème édition, Lavoisier, Paris, p.122.
- GÖKME M., KARA R., AKKAYA L., TORLAK E., ÖMEN A. 2014. Evaluation of antimicrobial activity in olive (*Olea europaea*) LEAF extract. American Journal of Microbiology 5 (2): 37-40.
- Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J.L., Bell, H.C., Wyllie, S.G., Warmington, J.R., (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology, 26, 194-198.



- Hayouni E, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M, 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 Chemistry, 105, 2007, 1126-1134.
- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., et al., (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 3590-3595.



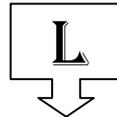
- Jean-Marie. 2010. Arbre et arbuste de Méditerranée : dictionnaire 3ème édition .France. p 112.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Journal of Applied Bacteriology, 76, 626- 631.



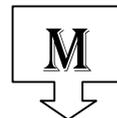
- Konan F.K., Guessennd N.K., Oussou K.R., Coulibaly B.A., Djaman A.J., Dosso M. 2014. Effet antibactérien de l'extrait aqueux de l'écorce de *Terminalia glaucescens* Planch ex Benth (Combretaceae) sur la croissance in vitro des

entérobactéries productrices de bêta lactamases à spectre élargi (EBLSE).
International Journal of Biological and Chemical Sciences 8(3) : 1192-1201.

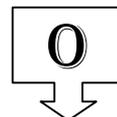
- Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Traoré A. S. 2005. Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. 8-11. Ouagadougou.



- Lamiae Bachiri et al.,2016. Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc :«Lavandula stoechas L. et Lavandula dentata L.». Maroc .v12n30p313
- Lebham. 2005. Mémoire du Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - Université de Bretagne Occidentale (UBO).
- Lee, O.H., Lee, B.Y., (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. Bioresource Technology, 101(10), 3751-3754.

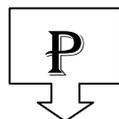


- Macheix J. J.,Annie F.,Jay-Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux.Ed. press polytechniques et universitairesrommande, Laussane, 185p.
- Manallah A.2012. Activités antioxydant et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L.Mémoire magistère, Université Ferhat Abbas, sétif.86p

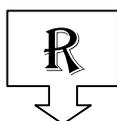


- Owen N., E. Leslie, J. Salmon and MJ. Fotheringham, Environmental determinants of physical activity and sedentary behavior. Exercise and sport Sciences Review, 28 (2000) 153-158.

- Oosterhaven, K., Poolman, B., Smid, E.J., (1995). S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products*, 4, 23-31.

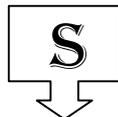


- PEREZ M .E.G; Caractirisation de composésn phynoliques des extraits de ramilles du Bouleau Jaune : etude de leur capacité antioxydanate ; Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences du bois pour l'obtention du grade de maîtres sciences (M.Se.) , 2008
- Polèse, J.-M. (2009). Olivier, pas à pas (Aix-en-Provence: Édisud).
- Pascale S et Véronique C.2006. Les poly phénols en agroalimentaire. édition LA VOISIER 2006.Pais.1-3.

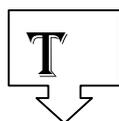


- Rees S., Harborne J. 1985. The role of sesquiterpene Lactones and phenolics in the Chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry*. 24: 2225-2231.
- REFFAS Lamiae et al .2016. Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc :«*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.» . vol.12, No.30 ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431.
- Rezzaghi A.2012. Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut et de l'activité antioxydantedes différents extraits des graines des peganumharmala L.Thèse demagistère, Biochimie et Physiologie Expérimentale. Université Farhat Abbas.Sétif.78p.
- Rhayour K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*,Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès. Maroc.158 p.
- Robards K.2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables.*Journal of Chromatography A*, 1000:pp.657-69

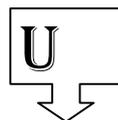
- RiberauGayon, P., —Les Composes Phénoliques des Végétauxl , Dunod, Paris, (1968), 254



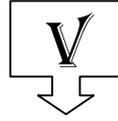
- Silva NCC, Fernandes Júnior A : Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases ISSN 1678-9199. 2010. volume 16. Issue 3 .pages 402-413
- Singleton V.L.,Orthofer R.Lamuella-Raventos RM.1990.Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxydants by means of folin-ciocalteu reagent.Methods.Enzymology 29:pp.152-178.
- Soro T.Y., Traore F.,Sakande J .2009.Activité analgésique de l'extrait aqueux de Ximenia amerricana (Linné) (Olacacecae).C.R. Biologies 223:pp.371-377.
- Stevanovic T. Automne 2005. Chimie du bois. CHM-22170. Université Laval. Québec. Canada, p 6.6-6.20.
- Turkmen N., Velioglu Y., Sari F., Polat G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*. 12: 484-496.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (11), 8022-8028.



- Turkmen N., Velioglu Y., Sari F., Polat G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of Black tea. *Molecules*. 12: 484-496.



- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10), 4606- 4610.



- Vossen, P. (2007).Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils. 42, 8.

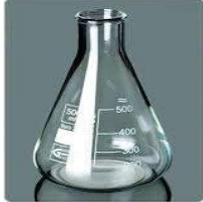
Annexe

Annexe n°1 .

✓ Appareillage

			
Balance analytique	Balance normale	Agitateur plaque chauffante	Spectrophotomètre
			
Réfrigérateur	Micropipettes	Broyeur	Etuve
			
Vortex	Haute	Autoclave	Bec benzène

✓ **Verreries et autre matériel**

			
Béchers	Boîtes de pétri	Eprouvette	Erlenmeyer
			
Tube à essai	Flacons	Papier film	Papier aluminium
			
Papier filtre	Spatules	Portoirs	Tamis

✓ **Réactif et solvant**

- Carbonate de sodium
- Acide gallique
- Folin ciocalteu
- Quercétine
- Na_2CO_3 à 7%
- NaNO_2 à 5%
- AlCl_3 à (10%)
- Eau physiologique
- DMSO
- Eau distillé

Annexe n°2

Préparation des Milieux de culture

- Mueller-Hinton(38g/l), préparé dans 1L d'eau distillée.
- Gélose nutritif (23g/l), préparé dans 1L d'eau distillée.
- bouillon nutritif (g/l), préparé dans 1L d'eau distillée.

Les milieux de culture préparés comme suit :

Dissoudre chaque milieu dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis autoclave pendant 20 min à 130°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de pétri.

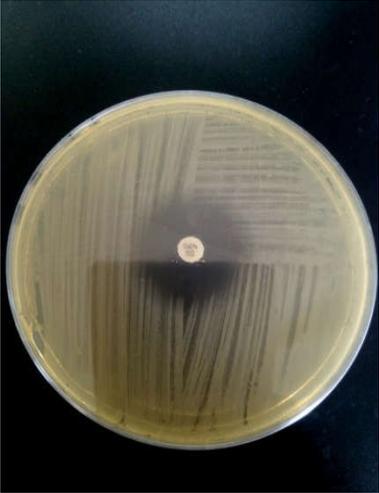
Annexe n°3. Préparation des solutions

- Folin-Ciocalteu à 10% :10 ml du réactif dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au trait de jauge avec l'eau distillée.
- Na₂CO₃ à 7.5% g dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution d'extrait à 1 mg/ml : 10 mg dans 10 ml de méthanol.
- AlCl₃ (10%) :10g dans 100 ml de l'eau distillée.
- L'eau physiologique : 0.9g de NaCl dans un 100 ml d'eau distillée, stérilisation à 121 °C pendant 15 min.

Annexe n°4. préparation de l'eau physiologique

0.9 g NaCl dans un 100 ml d'eau distillée , stérilisation a 120 °C pendant 15 mn .

Annexe n°5. les zones d'inhibition des témoins positif pour les sept souches

		
<i>E.Coli</i> ATCC 25922	<i>E.Coli</i> clinique	<i>S.aureus</i> ATCC 25923
		
<i>S.aureus</i> clinique	<i>P.aeruginosa</i> clinique	<i>K.pneumoniae</i> clinique
		
<i>S.Entiridis</i> clinique		

ملخص

تم تكرير العمل الذي قمنا به لدراسة النشاط لمضاد البكتيريا في ثلاث مستخلصات نباتية طبيعية من منطقة بسكرة , بطريقة الانتشار في وسط مغذي باستعمال سبع سلالات بكتيرية. بشكل عام تظهر المستخلصات المائية الثلاثة ل *Olea europea* باستخدام الغليان. النقاة في الماء الساخن و الماء البارد عائدا قدرعلى التوالي %20.84, 18.16% و 21.9% بالاضافة الى انها غنية بالبوليفينول و الفلافونويد . مع مناطق تثبيط حسب الخلاصة و الجرعة حيث افضل نشاط كان ضد (*S.entiridis* et *S.aureus*) و افضل مقاومة كانت ل *Pseudomonas aeruginosa* .

إن أشجار الزيتون الغنية بالمركبات الفينولية التي تمنح نشاطاً مثبطاً اتجاه بعض أنواع البكتيريا .

الكلمات المفتاحية : *Olea europea* , مضاد بكتيريا , فلافونويد , بوليفينول , تثبيط .

Résumé

Le travail que nous avons réalisé a été consacré à l'étude de l'activité antibactérienne des trois extraits aqueux de la plantes médicinales *Olea europea* de la région de Biskra..

On utilisema méthode de diffusion sur milieu gélosé vis-à-vis de sept souches bactérienne .on généralles trois extraits d'olea europea on utilisons la macération, décoction et l'infusion à un rendement respectivement :20.84%,18.16% et 21.9% . en plus il sont riche en polyphénols et flavonoïde .

Les zones inhibitrices selon l'extrait et la dose ,la milledure activité inibtrices c'est contre *s.entiridis* et *S.aureus* cliniqueet la meilleurrésistente c'est pour *P. aeruginosa*.

Mots clés : *Olea europea* , antibactérienne, flavonoïde , polyphénole ,inhibition.

Summary

The work we have done has been devoted to the study of the antibacterial activity of the three aqueous extracts of medicinal plants olive from the biskra region. By the agar diffusion method with respect to seven bacterial strains.

Overall, the three aqueous extracts of *Olea europea* show a yield of infusion maceration respectively decoction : 21.9%, 20.84% and 18.6% and a richness for the polyphenol and flavonoid compounds. with different zones of inhibition according to the extract and the dose. the best activities are against *S.entiridis* and *S.aureus* clinical and noted strong resistance of *Pseudomonas aeruginosa*.

Olive trees rich in phenolic compounds that confer an inhibitory activity vis-à-vis certain bacteria.

Keywords : *Olea europea*, antibacterial , flavonoïde, polyphenol , inhibition.,