



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de
la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Nihad KHAFALLAH et Nedjla BOUGUERBA

Le : mardi 6 juillet 2021

Thème

Activités antimicrobiennes des extraits des feuilles d'olivier

Jury :

M. Fouzi MERABTI	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. Wassila DENDOUGA	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Manel DJOUAMAA	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020 /2021

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Allah tout puissant, qui nous a donné le courage, la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

De sincères remerciements se doivent d'être adressés à notre honorable encadreur Mme. Wassila DENDOUGA pour ses orientations et ses aides offertes lors des différentes étapes de la réalisation de ce travail. Et pour la confiance qu'elle nous a accordée tout au long de cette étude.

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire.

Mes vifs remerciements vont à notre présidente de jury Fouzi MERABTI d'avoir bien voulu présider le jury de soutenance de ce mémoire.

Un merci particulier à l'examineur Manel DJOUAMAA pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Nous remercions toute l'équipe de Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Khider de Biskra, surtout monsieur BENMADDOURE qui nous à accueillis et mis à notre disposition les articles nécessaires pour mettre en œuvre de la partie expérimentale de ce mémoire.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents pour leur amour et leur support continu, Je vous dois tous mes succès, tous mes bonheurs et toutes mes joies. Je suis très heureuse et fière de votre présence à mes cotés.

Ma mère « LETAISSA Djemaa »

Ma père «Othmane»

A mes cheres sœurs : Razika , Amel et Nawel

Et mes chers frères : Amar et Omar

A la femme de mon frère Sabah.

A les enfants de ma famille Tadj elddin, Mouadh, Kinen et les petits Ghaith et Aness

A toutes les personnes de ma grande famille et un spéciale dédie à mes oncles Mohamed, Nabile et AbdArrahmane. qui m'a toujours conseillé et encouragé à faire le mieux.

A mes chères et meilleures amies : Dhaouia, Hanen, Nacira, Lamia, Imene et mon ami d'enfance Inasse ,et surtout à ma binôme Nihad. Je suis très heureuse et fière de ces années que j'ai passées avec vous, des liens créés et des nouvelles amitiés, ainsi que pour les moments que nous avons passés ensemble et ceux encore à venir.

Tous nos professeurs qui nous ont enseigné et tous ceux qui nous sont chers.

Dédicace

Je dédie ce travail a ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles , Et ceux à qui je dois tant

A la personne la plus chère de mon cœur, ma mère, « Louiza », qui m'a encouragé à aller de l'avant et mon père « Ahmed »

A mes chers frères « Mohamed » et « Oussama » et mes chère Sœurs « Ibtissame »,« Malak »,« Amel »,« Aicha »

Et ma cousine « Yasmine Guerbazi »

A mes tantes « Rachida Bakhouché et Zohra Nouffidj » et ma spécial grand-mère « Jamila »

A mes oncles « Sadek »,« Omar ».

A mes chères amies : « Bothaina , Aichouche ,Walid, karim et Amine » .

et une dédicace spéciale à « Nedjla » et « Lamia » , une source de courage tout au long des moments de travail et toujours à coté de moi, merci.

Table des matières**Liste de tableaux****Liste de figures****Liste de abréviation****Introduction**.....1**PARTIE BIOLOGIE****Chapitre 1. Olivier**

1.1. Historique.....3

1.2. Classification.....3

1.3. Répartition géographique.....4

1.3.1. International.....4

1.3.2. National (en Algérie).....4

1.4. Description botanique.....5

1.4.1. Système racinaire.....5

1.4.2. Système aérien.....5

1.5. Feuille d'olivier.....7

1.6. Utilisation traditionnelles et les activité biologique des feuilles d'olivier.....7

Chapitre 2. Les polyphénols des feuilles d'olivier

2.1. Métabolisme secondaire.....9

2.1.1. Définition et fonction de métabolisme secondaire.....9

2.1.2. Classification des métabolisme secondaire.....9

2.2. Polyphénol.....9

2.2.1. Définition et localisation des composés phénolique.....9

2.2.2. Structure chimique.....10

2.2.3. Classification de composé polyphénolique.....10

2.3. Les flavonoïde.....	11
2.4. Tanin.....	12
2.5. Activités antimicrobiennes des feuilles de l'olivier.....	13
2.5.1. Activité anti bactérienne.....	13
2.5.2. Activités anti virale.....	14
2.5.3. Activité antifongique et antiparasitaire.....	14

PARTIE EXPERIMENTAL

Chapitre 3. Matériels et Méthodes

3.1. Matériels végétales.....	15
3.2. Obtention de l'extrait brut à partir des feuilles d'olivier.....	15
3.2.1. Macération.....	15
3.2.2. Evaporation	15
3.2.3. Détermination du rendement.....	15
3.3. Dosage des composés phénolique.....	16
3.4. Le dosage des composés flavonoïdes.....	16
3.5. Test de l'activité antimicrobienne.....	17
3.5.1. Activité antibactérienne.....	17
3.5.2. Activité antifongique.....	17
3.5.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (MFC).....	18

Chapitre 4. Résultats et Discussion

4.1. Rendement de extraction.....	20
4.2. Dosage des polyphénols totaux.....	22
4.3. Dosage des flavonoïdes totaux.....	23
4.4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	24
4.5. Évaluation de l'activité antifongique.....	26
Conclusion.....	33

Références biobibliographie.....38

Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1. La classification de l'olivier.....	3
Tableau 2. Les principales classes des composés phénoliques.....	10
Tableau 3. Les espèces de champignons à utilisation fréquente pour les tests de l'activité antifongique des extraits végétaux.....	16
Tableau 4. Les rendements d'extraction d'olivier obtenu par Benahmed	20
Tableau 5. Le diamètre de la Zone d'inhibition des souches testées (en mm).....	27
Tableau 6. Zone d'inhibition (mm) ^a de l'extrait des feuilles d'olivier testé à l'égard des souches fongiques	30
Tableau 7. L'activité antilevurienne des extraits de feuilles d'olivier.....	31

Liste des figures

Figure 1. La carte oléicole Algérien	5
Figure 2. Fleur d'olivier	6
Figure 3. Fruit d'une olive.....	6
Figure 4. Feuilles de l'olivier.....	7
Figure 5. Structure chimique de base des polyphénols	10
Figure 6. Structure du squelette de base des flavonoïdes et leurs classe.....	12
Figure 7. Structure des deux types de tanins.....	13
Figure 8. Le rendement des différent extraits des feuilles d' <i>Olea europaea</i>	20
Figure 9. Rendement d'extraction des feuilles d'olivier par différents solvants organiques.....	21
Figure 10. Effet de différentes concentrations d'extrait des feuilles d'olivier sur la viabilité des cellules de <i>Candida albicans</i> (concentrations fongicides minimales, MFC) après 24h.....	26
Figure 11. Micrographie électronique à balayage de <i>Candida albicans</i> (témoin : cellules non traitées).....	27
Figure 12. Micrographie électronique à balayage de <i>Candida albicans</i> traité par 20% d'extrait de feuille d'olivier après 24 h.....	27
Figure 13. a): Viabilité de <i>C. albicans</i> sous traitement par l'extrait de feuilles d'olivier à différentes concentrations. b): Viabilité de <i>C. dubliniensis</i> sous traitement par l'extrait de feuilles d'olivier à différentes concentrations.....	28

Liste des abréviations

CMI : Concentration minimale inhibitrice

OLE : Olivier

CMB : Concentration minimale bactéricide

R% : Rendement

FC : Folin-Ciocateu

DMSO : Diméthylsulfoxyde

MHA : Muller Hinton Agar

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

DCM : Dichloromethane

GAE : Acide gallique

PDA : Potato Dextrose Agar

mm : millimètre

mg : milligramme

ml : millilitre

CFU : Unite formant colonies

Introduction

Les plantes médicinales renferment un ou plusieurs molécules capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Cette diversité de composés chimiques pourrait justifier leurs utilisations traditionnelles. Selon les estimations de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 80 % de la population des pays en voie de développement ont recourt à la médecine traditionnelle pour leur besoins de santé, le plus souvent en raison du coût élevé des médicaments d'importation et de l'inaccessibilité géographique des médicaments (Haddouchi *et al.*, 2014).

Ces plantes ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité. Elles sont une source potentielle de molécules bioactives à savoir les polyphénols, les alcaloïdes, les terpènes, les flavonoïdes, les tanins, les stéroïdes, qui sont à l'origine de plusieurs activités biologiques tels que l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, antiseptique, diurétique et antioxydant (Haddouchi *et al.*, 2014).

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Olea europaea L.* ce dernier est largement distribué surtout dans le centre de l'Algérie (Aouidi, 2012).

L'olivier *Olea europaea L.* est une espèce largement cultivée dans le bassin méditerranéen depuis la plus haute antiquité. L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production d'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Par ailleurs, les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles qui font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches scientifiques. L'olivier est considéré donc comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques (Djenane *et al.*, 2012).

Les feuilles d'olivier sont connues par leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine, due à leurs richesses en composés phénoliques, notamment l'oleuropéine. Ces composés possèdent, entre autres, des pouvoirs antioxydant, anticancéreux, antimicrobien qui les rendent très importants pour les domaines de la santé et l'industrie agroalimentaire (Aouidi, 2012).

Les travaux réalisées "*in vitro*" par plusieurs chercheurs ont démontré que les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action divers, des activités inhibitrices et létales vis-à-vis de nombreux microorganismes. Les polyphénols des feuilles d'olivier sont les principaux composés antimicrobiens. Ils

présentent une activité antimicrobienne supérieure par rapport à d'autres substances testées (Djenane *et al.*, 2012).

L'objectif de cette étude, qui représente une synthèse d'article, est d'évaluer l'activité antimicrobienne d'extrait des feuilles d'olivier. Le présent document est réparti en deux parties principales:

La partie I: comprend deux chapitres, le premier chapitre est consacré à l'étude botanique de l'espèce *Olea europea L* bien que dans le deuxième chapitre nous avons abordée les métabolites secondaires de l'espèce *Olea europaea L*.

La partie II: elle-même est divisée en deux chapitres ; chapitre matériel et méthodes, où dans lequel nous avons essayé de présenter les différentes méthodes suivies pour l'extraction et l'évaluation de l'activité antimicrobienne. Dans le chapitre IV, on a essayé de présenter et de discuter les différents résultats des travaux publiés sur les extraits bioactifs d'*Olea europea* et leur activité antimicrobienne.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1.

L'olivier

1. Olivier

1.1. Historique

L'olivier, arbre de la famille des oléacées, cultivé surtout dans le bassin méditerranéen depuis au moins 3500 ans avant notre ère. Il était dans l'antiquité grecque et romaine, un emblème de fécondité et un symbole de paix et de gloire. Le nom scientifique de l'arbre *Olea* vient d'un mot qui signifiait "huile" chez les grecques de l'antiquité (Loussert et Brousse, 1978).

En Algérie, l'oléastre véritable aurait existé depuis des millénaires avant notre ère, mais aucune indication ne permet d'en comprendre son évolution (Mendil et Sebai, 2006). Son importance dans l'alimentation des anciens habitants de Djerba, en Tunisie, qui, en pressant ses fruits, obtenaient de l'huile, a été déjà citée . Le type sauvage, un complexe de formes non cultivées et chétif, classé conventionnellement comme *Olea europaea* var, *oleaster* ou *sylvestris*, est un composant de la végétation méditerranéenne (Mirad et Badis, 2019).

1.2. Classification

L'espèce *Olea europaea* L a été nommée par Linné en raison de son aire géographique. C'est l'unique espèce du bassin méditerranéen représentative du genre *Olea*. On distingue deux sous-espèces, l'olivier cultivé ou l'olivier commun (*Olea europaea sativa*) et l'olivier sauvage ou oléastre (*Olea europaea sylvestris*) (Tourte et Bordonean, 2005). La classification de l'olivier est représentée comme suit selon Conquist (1981) (Tab.1).

Tableau 1. La classification de l'olivier.

Région	Plante
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous –classe	Astéridées
Ordre	Scrophulariales
Famille	Oleacées
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europea</i>

1.3. Répartition géographique

1.3.1. Internationale

La culture d'olivier a une grande importance économique et sociale dans le secteur méditerranéen. En fait, elle est l'une des activités agricoles importantes dans les pays méditerranéens (Espagne, Portugal, Italie, Grèce, Turquie, Tunisie, Maroc, Jordanie, Syrie et Algérie), elle couvre 8 millions d'hectares, presque 98% de la récolte mondiale (Boudhrioua *et al.*, 2008).

1.3.2. Nationale (en Algérie)

L'olivier occupe une place de choix dans le processus de relance économique de notre pays, l'olivier, de par ses fonctions multiples de lutte contre l'érosion, de valorisation des terrains agricoles et de fixation des populations dans les zones de montagne, constitue une des principales espèces fruitières cultivées en Algérie.

Le patrimoine oléicole Algérien est estimé par 32 millions d'oliviers, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. Cette filière se concentre dans certaines wilayas comme Bejaia, Tizi-Ouzou et Brouira qui ont produit à elle seules en 2008, 179180 hectolitres d'huile sur une superficie de 108893 ha , soit 51% de la production nationale et environ 44% du verger national oléicole. L'oléiculture à base de l'olivier (*Olea europea L*), est l'une des cultures caractéristiques du Bassin méditerranéen. En effet, l'olivier occupe à l'échelle nationale environ 45 % de la surface arboricole avec plus de 245.500 ha répartis sur tout le territoire national en particulier au Nord de l'Algérie (Saad, 2009) (Figure 1).

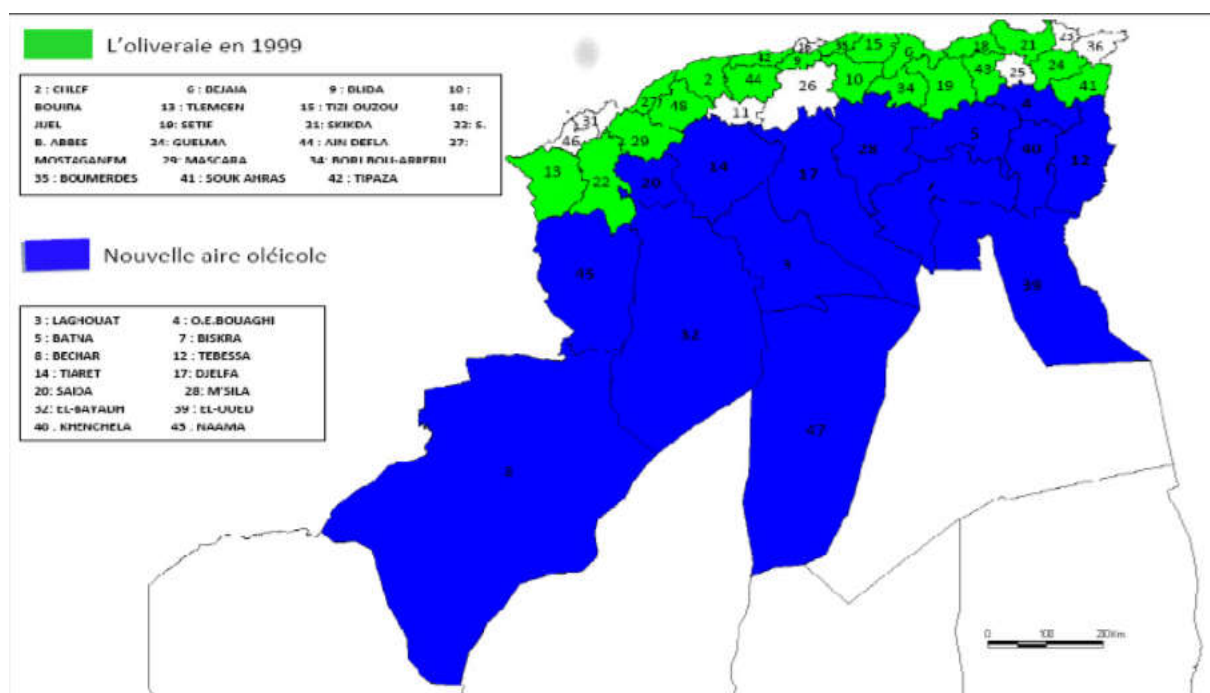


Figure 1. La carte oléicole Algérien (Itafv, 2008).

1.4. Description botanique

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen, originaire d'un climat subtropical sec, il s'adapte dans des conditions d'environnements extrêmes comme la chaleur et la sécheresse. C'est un arbre qui pousse bien dans un sol aéré, néanmoins, il est capable de s'adapter à plusieurs types de sols. La distribution du système racinaire est en fonction du type de sol. Dans les sols aérés, les racines peuvent atteindre 6 à 7 mètres ou plus. Pour des sols moins aérés, l'olivier adapte le système racinaire latéral est plus développé. Dans un sol lourd et non aéré, en développant un réseau de racines superficielles (Boulkroune, 2017).

1.4.1. Système racinaire

Le développement du système racinaire de l'arbre dépend des caractéristiques physicochimiques du sol, sa profondeur, sa texture et sa structure dans le sol profonds très imperméable aérés et légers le système racinaire est a tendance pivotant les racines peuvent atteindre 6 à 7 m en profondeur en revanche dans les sols lourds peu ou non aérés et peu profonds (Saad, 2009).

1.4.2. Système aérien

Tronc : le tronc est jaunâtre puis passe au brune très claire. Il est très dur, compacte, court, trapu et porte des branches assez grosses, tortueuses et lisse (Haddou, 2017).

Fruit : est un drupe de forme ovoïde, de couleur verte puis rougeâtre et noire (pourpre noirâtre). A maturité, son noyau est fusiforme épais, très dur et résistant (Ait Youssef, 2006) (Figure 2).

Fleurs : elles sont regroupées en petite grappes dresse de 10 à 40 en moyenne suivant la variété, elles sont petites et ovales. Les pétales sont de couleur blanche jaunâtre, très largement odorant, très sensible du froid et le vent seulement 5% des fleurs parfaites assureront après pollinisation et fécondation la production de l'arbre (Saad, 2009) (Figure 3).

Feuilles : sont opposées, simples et de 3 à 8 cm de longueur. Elles ont une forme oblongue à ovale lancéolée et une extrémité pointue. Leur limbe est entier, légèrement enroulé, raide, coriace et vert cendré à la face supérieure. La face inférieure a un aspect argenté et soyeux par l'abondance de poils tecteurs et présente d'une nervure médiane saillante (Eberhard *et al.*, 2005) (Figure 4).



Figure 2. Fruit d'un olivier (Selaimai *et al.*, 2019).



Figure 3. Fleur d'olivier (Selaimai *et al.*, 2019)



Figure 4. Feuilles de l'olivier (Selaimai *et al.*, 2019).

1.5. Feuilles de l'olivier

La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs : la variété, les conditions climatiques, l'époque de prélèvement et l'âge de plantation (Nefzaoui, 1995).

Les feuilles sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée de protéines, de lipides, des monomères et polymères phénoliques (tel que les tannins) et principalement des polysaccharides (tel que la cellulose et les hémicelluloses) (Selaimai *et al.*, 2019).

1.6. Utilisations traditionnelles et les activités biologiques des feuilles l'olivier

Au fil, des siècles les extraits des feuilles de l'olivier ont été utilisés pour promouvoir la sante et la préserve par exemple les égyptiens utilises les feuilles pour momifier les pharaons de même il ont été valorises comme un remède populaire célèbre pour traiter la fièvre et certaine maladie tropical (Azri, 2017).

La feuille d'olivier possède plusieurs propriétés médicales intéressants : hypotensives ; diurétiques légères; hypoglycémiantes et hypocholestérolémiantes. Récemment plusieurs études ont mis le point sur le contenu des feuilles d'olivier et l'extraction de ces composés à haute valeur ajoutée, d'où leur utilisation dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques, Ces activités biologiques sont dues à la présence de composés photochimiques possédant des cibles moléculaires précises pouvant atteindre différents processus physiologiques. De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales suggèrent que les

composés photochimiques, principalement les polyphénols pourraient prévenir un grand nombre de pathologies tel que les maladies cardiovasculaires et les maladies inflammatoires (Otmani et Slimani, 2018).

En effet les composés triterpénoïques. abondants dans les feuilles d'olivier, possèdent des propriétés pharmacologiques ils ont des effets anti-inflammatoires, hépato protecteurs, anti tumoral, antiviral, antimicrobien, antifongique, antidiabétique, gastro protecteur et anti hyperlipidémique (Mirad et Badis, 2019).

Chapitre 2.
Les polyphénols des
feuilles d'olivier

2.1. Métabolismes secondaire

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acide nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits "secondaires" dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme (Madani, 2017).

2.1.1. Définition et fonction de métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires sont des molécules nécessaires à la défense de la plante contre les agressions extérieures (Himour, 2018) et présentent une grande variété structurale (plus de 200 000 structures définies) (Benlagha et Khelil, 2019).

Il sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes (Azir, 2017) et ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal (Rezgui et Chentouf, 2020).

2.1.2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires dépassant d'un manière générale actuellement 200000 les substances identifiées, qui les appartiennent à trois grandes classes: les composés phénoliques, composés terpéniques et stéroïdes ainsi que les composés azotés. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques (Madani, 2017).

2.2. Polyphénol

2.2.1. Définition et localisation des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolismes secondaires de la plante qui sont des déterminants importants de la qualité sensorielle et nutritionnelle des fruits, légumes et autres plants (Azir,2017). Les polyphénols forment le groupe des composés organiques phytochimiques le plus important dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présentes dans tous les organes de la plante (Seliamia *et al.*, 2019).

Les polyphénols sont des produits résultant de la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A et l'acide amine de phénylalanine. Cette biosynthèse permet la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques pour chaque d'une espèce végétale, d'un organe et d'un tissu particulier (Laouini, 2014).

Dans la cellule, les composés phénoliques sont essentiellement localisés dans les vacuoles sous forme soluble. 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 (Robards *et al.*, 1999).

2.2.2. Structure chimique

La structure chimique des polyphénols est identique (Manallah, 2012).elle se caractérise par la présence d'un noyau benzénique, portant un ou des groupement(s) hydroxyle (s) libre (s) ou engagé(s) dans une fonction ester, éther ou hétéroside (Figure 5).

Les composés phénoliques se distinguent par leur squelette carboné , puis leur degré de modification (oxydation, hydratation, méthylation.....) et des liaisons pouvant exister avec d'autres molécules comme des sucres ou d'autres composés phénoliques. On distingue ainsi une dizaine de grandes classes de composés regroupant des formes simples et des phénols condensés issus de la polymérisation des lignanes (lignines) ou de certains tanins (Madani, 2017).

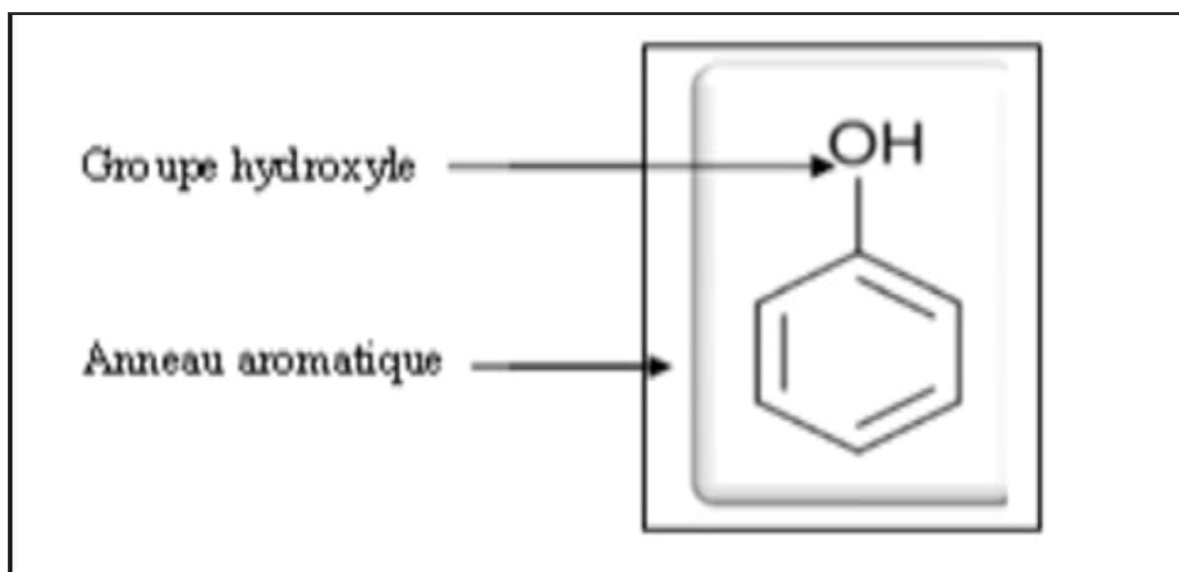


Figure 5. Structure chimique de base des polyphénols (Madani, 2017).

2.2.3. Classification des composés poly phénoliques

Les composés phénoliques d'origine végétale des plantes sont répartis en différentes classes selon la structure de leur squelette de base. Macheix, (1996) ont classifié les composés phénoliques en groupes en se basant sur le nombre du carbone dans la molécule (Tab.2).

Tableaux 2. Les principales classes des composés phénoliques (Macheix, 1996).

Nombre de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple	Plant alimentaire
6	C6	Phénols simples	Catechol	Epices, fraise
7	C6-C1	A. Hydroxybenzolques	P-Hydroxybenzolque	Pomme, P. de terre
9	C6-C3	A. Hydroxycinnamiques Coumarines	acide Caféique	Citrus
10	C6-C4	Naphthoquinones	Scopoline	Noix
13	C6-C1-C6	Xanthones	Juglone	Mangue
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Iso flavonoïdes	Mangiferine	Fruits, Soja, pois, légumes
N	(C6-C3) _n	Lignines	Quercetol, cyanidol	Fruits A noyau
N	(C15) _n	Tannins	Daidzeine	Raisin rouge, Kaki

On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base. Deux principales classes sont largement répandues: Les flavonoïdes, Les tanins (Laouini, 2014).

2.3. Les flavonoïde

Actuellement, il existe environ 6000 flavonoïdes qui contribuent aux pigments colorés des fruits, des herbes, des légumes et des plantes médicinales. Ils appartiennent à une classe de composés phénoliques de bas poids moléculaire largement répandus dans le règne végétal (Panche *et al.*, 2016).

Les flavonoïdes sont composés à faible poids moléculaire, sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Les flavonoïdes montrent une grande diversité et une complexité qui dépendent de la nature et de la position des hydroxylations, méthylation et glycosylation du squelette carbone de base en C15.

Flavonoïde peut alors être subdivisé selon des modifications de ce squelette de base dans des classes : flavones, flavonols, flavanones, isoflavones, flavan-3-ols, et anthocyanines. Les différentes classes de flavonoïdes sont représentées dans la figure 6 (Azri, 2017).

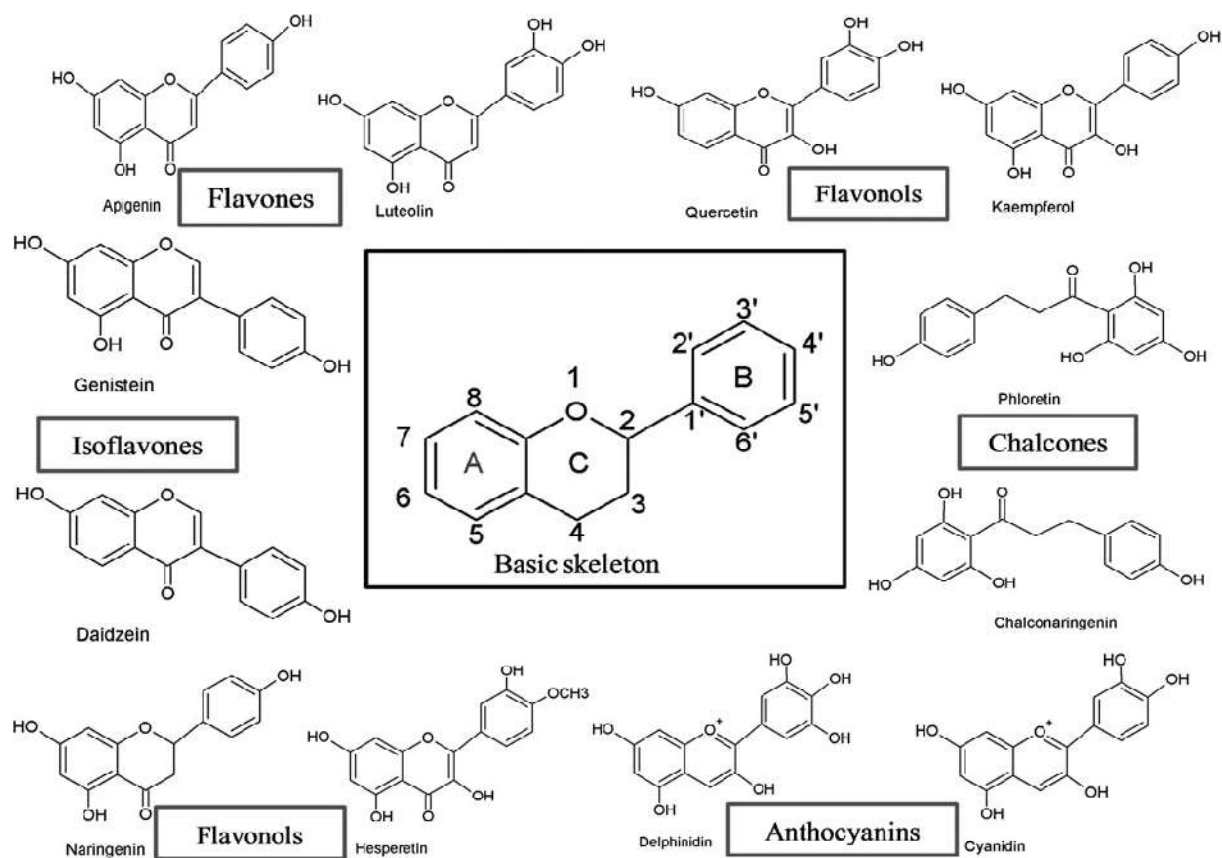


Figure 6. Structure du squelette de base des flavonoïdes et leurs classes (Panche *et al.*, 2016).

2.4. Tanin

Les tanins sont composés de molécules relativement élevées qui constituent le troisième groupe important de composés phénoliques (Azri, 2017). Ils sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères,

les fagacées, les rosacées. Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines (Boudouref, 2011). Les tanins peuvent former des complexes avec de multiples molécules (protéine, polysaccharides, alcaloïdes...) et le processus peut être réversible ou irréversible (Azri, 2017).

Selon leur nature chimique ces composés sont divisés en deux classes: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Figure 7).

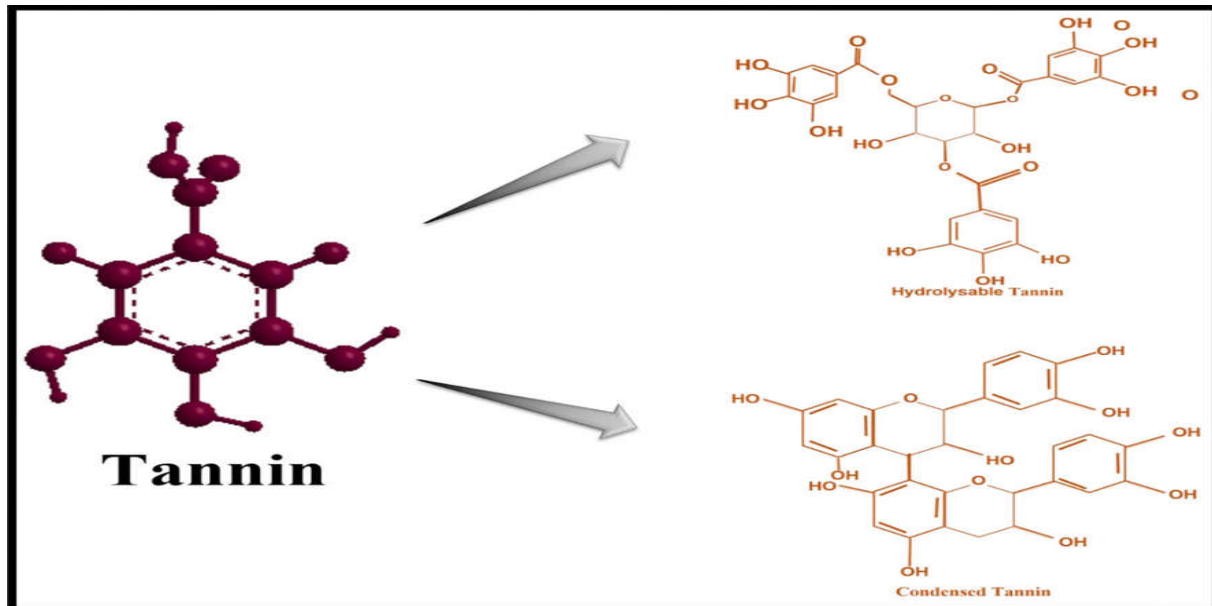


Figure 7. Structure des deux types de tanins (Kavitha et Kandasubramanian, 2020).

2.5. Activités antimicrobiennes des feuilles de l'olivier

2.5.1. Activité anti bactérienne

Les anciens égyptiens momifiaient les pharaons avec des feuilles d'oliviers pressées pour lutter contre l'attaque des bactéries, des champignons et des parasites (Vladimir, 2008). De nombreuses études *in vitro* ont été effectuées pour démontrer que les extraits de feuilles d'olivier empêchent ou au moins retardent le taux de croissance de certaines bactéries (Selaimia *et al.*, 2019). A titre d'exemple *Salmonella typhim*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Escherichia coli*, (agents causaux d'infections du système gastro-intestinal ou des voies respiratoires chez l'homme (Caturla *et al.*, 2005), les effets antimicrobiens des polyphénols issus de la feuille d'Olivier ont été le sujet de différentes recherches qui confirment ces activités biologiques (Farhi, 2009). L'action antibactérienne des phénols est liée à leurs capacités à dénaturer les protéines et sont généralement classés comme agents agissant en surface. Leur action conduirait à la fuite des

constituants cellulaires des bactéries tels que les protéines, le potassium et le phosphate. Ces effets pourraient être dus à la destruction du peptidoglycane ou aux dommages de la membrane cellulaire (Mirad et Badis, 2019).

2.5.2. Activités antivirale

Plusieurs études ont permis de valider l'usage traditionnel de l'olivier en temps qu'anti-infectieux. *In vitro*, des chercheurs ont démontré l'action inhibitrice d'extraits de feuilles d'Olivier sur de nombreux virus, en particulier virus grippe, herpès, virus pseudorabies (Selaimia *et al.*, 2019) et autre études *in vitro* ont montré que l'oleuropéine inhibait infectivité du virus de la septicémie hémorragique virale (VHSV), un rhabdovirus de salmonidés (Vicente *et al.*, 2005).

2.5.3. Activité antifongique et antiparasitaire

De nombreuses études montrent que les feuilles d'olivier sont efficaces contre les champignons, tels que *C. albicans*, *C. krusei*, (Selaimia *et al.*, 2019). Les polyphénols ont une activité antifongique très puissante, dont les flavanones glycosides et des polyméthoxy flavones de *Citrus parasidi* et de *Citrus sinensis* sur *Penicillium digitatum* a été démontré Aussi, les flavonoïdes de *Conyza aegyptica L.* Ont une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses: *Microsporum canis M.gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida zeylanoïdes* (Djabali, 2012).

les feuilles olivier est également efficace contre les cryptosporidies, les giardies, les oxyures, les ténias, la teigne, les protozoaires causant le paludisme (Selaimia *et al.*, 2019).

PARTIE
EXPERIMENTALE

Chapitre. 3

Matériel et Méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes (feuilles) d'olivier, après la confirmation de l'espèce, les feuilles récoltées et triées sont nettoyées pour l'élimination de la poussière et les autres particules indésirables, puis séchées à température ambiante dans un endroit aéré à l'ombre une fois séchées, les feuilles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La poudre est ensuite tamisée (tamis < 2mm), est ensuite conservée dans un endroit sec et à température ambiante jusqu'à son utilisation (Lakache *et al.*, 2019).

3.2. Obtention de l'extrait brut à partir des feuilles d'olivier

3.2.1. Macération

Principe

La macération est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans un solvant pendant une période donnée, pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes).

Protocole

Une quantité de poudre fine des feuilles d'*Olea europaea* est macérée dans une quantité suffisante du méthanol (le volume du solvant doit couvrir la poudre), l'opération de macération doit être répétée trois fois avec renouvellement à chaque fois du solvant pour extraire le maximum du produit bioactif l'extrait obtenu est filtré par papier Whatman (Lakache *et al.*, 2019).

3.2.2. Evaporation

Après filtration, le solvant d'extraction est éliminé par l'évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur (température d'évaporation de méthanol). Les résidus obtenus représentent l'extrait brut qui doit être conservé à 4°C jusqu'à son utilisation (Benalia et Naili, 2020).

3.2.3. Détermination du rendement

Le rendement d'extraction se calcule selon la formule présentée ci-dessous, décrite par Lakache *et al.*, (2019) :

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

R (%) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

3.3. Dosage des composés phénolique

La méthode colorimétrique est suivie pour le dosage des composés phénoliques dans les extraits des feuilles d'olivier, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Rejeb, 2008). Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique la réaction est basée sur la réduction du mélange d'acide phosphotungstique et de l'acide phosphomolybdique du réactif de FC, Lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène dans une solution alcaline. La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques qui sont dosés au spectrophotomètre UV.

Une courbe d'étalonnage d'acide gallique réalisée préalablement permet de convertir les valeurs spectrophométrique en concentration totale des polyphénols.

Les résultats s'expriment en mg d'équivalents d'acide gallique (EAG) par gramme de poids sec d'extrait (mg EAG / g extraits) (Lakache *et al.*, 2019).

3.4. Le dosage des composés flavonoïdes

La quantité de flavonoïdes contenue dans les extraits d'*Olea europaea* est déterminée selon la méthode colorimétrique, la méthode se base sur l'utilisation de trichlorure d'aluminium pour quantifier la teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait des feuilles.

Le principe de cette méthode repose sur la formation d'un complexe très stable, suite à la formation d'une liaison covalente entre le trichlorure d'aluminium et les groupements hydroxyles (OH) de flavonoïdes, ce qui conduit à la production d'un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430 nm (Lakache *et al.*, 2019).

Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie préalablement avec la quercétine (0–40 µg/ml) et elle est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) (Lakache *et al.*, 2019).

3.5. Test de l'activité antimicrobienne

La méthode à utilisation fréquente pour tester l'activité antimicrobienne des extraits végétaux, il s'agit de la méthode de la diffusion sur disque. L'agent antimicrobien se diffuse dans la gélose et inhibe la germination et la croissance du microorganisme test, puis des mesures de diamètre de la zone d'inhibition doivent être effectuées.

3.5.1. Activité antibactérienne

Selon le protocole de Morteza *et al.*, (2012), l'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la technique de diffusion en milieu solide .

Les souches pathogènes utilisés (*Staphylococcus aureus* PTCC 1431, *Salmonella typhimurium* PTCC 1639, et *Escherichia coli* PTCC 1399, *Klebsiella pneumonia* PTCC 1053, *Bacillus cereus* PTCC1274) ont été ajustées à une densité de 10⁹ CFU/ml en ajoutant de l'eau stérile et étalées sur la surface de Mueller Hinton Agar remplie dans des plaques (20 ml de MHA dans chaque plaques).

Des puits de 7 mm de diamètre, Ont été découpés dans ces plaques d'agar et des extraits secs ont été dissous dans du DMSO à la concentration de 10, 15, 25, 30, 50 mg/ml, placés dans chaque puits. Les plaques de culture ont été incubées à 37°C pendant 24 h.

3.5.2. Activité antifongique

Les champignons testés généralement sont résumés dans le tableau suivant

Tableau 3: Les espèces des champignons à utilisation fréquente pour les tests de l'activité antifongique des extrais végétaux.

Les souches des champignons	Références
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	(Pimienta <i>et al.</i> , 2020)
<i>Saccharomyces uvarum</i>	
<i>Candida oleophila</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Candida albicans</i>	(Nasrollahi et Abolhasannezhad, 2015)
<i>Candida tropicalis</i>	(Keskin <i>et al.</i> (2012)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	(Masoko et Makgapeetja, 2015); Paula <i>et al.</i> , 2007)

<i>C. dubliniensis</i>	(Zoric <i>et al.</i> , 2016)
<i>Candida glabrata</i>	(Brahmi <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. kreusei</i>	(Brahmi <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. parapsilosis</i>	(Brahmi <i>et al.</i> , 2012)

Pour les souches testées ont été inoculées sur un bouillon d'extrait de levure et incubées pendant 48 h, en suite l'extrait de levure ont été distribués dans des plaques stériles et laissés se solidifier dans des conditions aseptiques, dénombrements de souches de levure ont été ajustés pour donner respectivement environ 1×10^7 , 1×10^8 / ml et 1×10^5 , 1×10^6 / ml en utilisant la méthode de comptage standard Mc Farland. Les organismes d'essai, en utilise 0,1 ml a été inoculé avec un écouvillon stérile sur la surface du milieu solide approprié dans des plaques incubées à 25 ° C a 1 h.

- Des disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre ont été imprégnés avec 30 ul d'extrait .

- Les plaques d'agar inoculées avec les organismes d'essai ont été incubées pendant 1 h avant de placer les disques de papier imprégnés d'extrait sur les plaques.

- les disques stériles imprégnés extraits ont été placés sur les plaques de gélose ont été incubées à 25°C pendant 72 h.

- Des disques d'érythromycine (10 µg / disque), des disques de pénicilline 10U / disque) et des disques de nystatine (30 µg / disque) ont été utilisés comme étalons de référence positifs et de l'eau a été utilisée comme contrôle négatif pour déterminer la sensibilité du souches testées (Keskin *et al.*, 2012).

3.5.3.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (MFC)

Le CMI correspondait à la concentration minimale du composé qui a provoqué une inhibition cellulaire de 99%, était considérée comme le concentration la plus faible pour laquelle il n'y avait pas de visuel croissance.

Le CMI des extraits de test était la plus faible concentration d'extraits qui ne permettait aucune turbidité des tubes à essai.

Le MFC a été défini comme la concentration la plus faible inhibant complètement la croissance de la levure (Nasrollahi et Abolhasannezhad, 2015).

Chapitre 4.

Résultats et Discussion

4.1. Rendement d'extraction

Dans toutes les études, après l'extraction le rendement est calculée. Selon l'étude de Lakache *et al.*, (2019), les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* représente un rendement de 26,96 % par rapport à la matière végétale sèche. Dans une autre étude le rendement d'extraction des feuilles d'*Olea europaea* par l'utilisant des différents solvants (Hexane, chloroforme, Acétate éthyle, Méthanol) était avec le méthanol (19,98%), puis l'extrait du chloroforme (2,30 %), puis l'extrait d' acétate éthyle (1,95%) et à la fin l'extrait d'hexane (0,71 %). Ces résultats sont présentés dans la figure ci-dessous (Azir, 2017) (Figure 8).

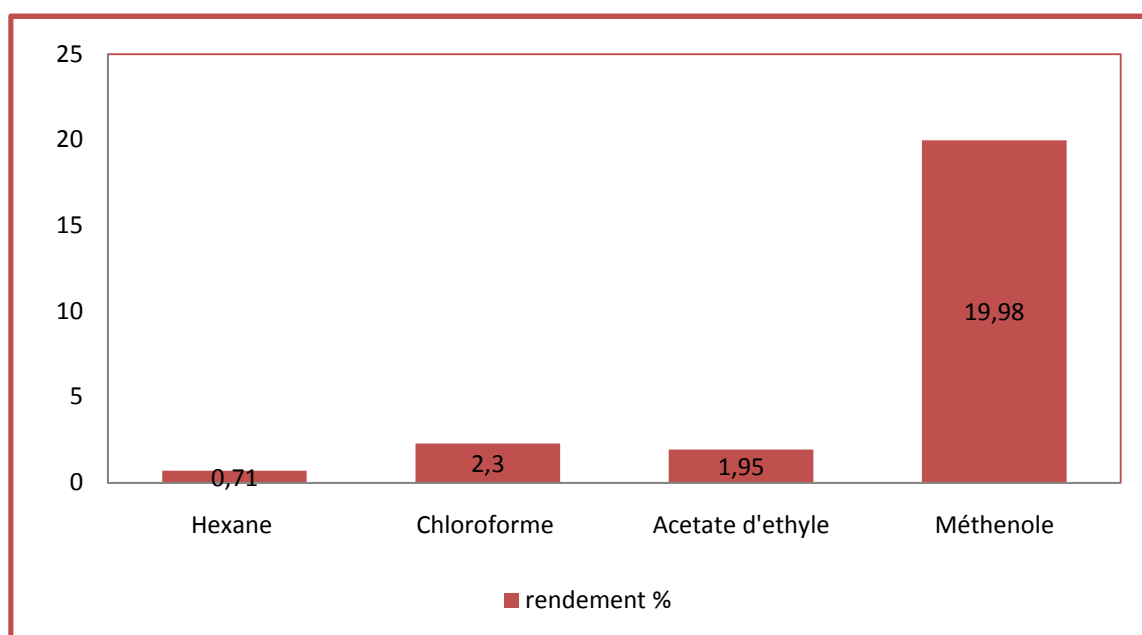


Figure 8. Le rendement des différent extraits des feuilles d'*Olea europaea* (Azir, 2017).

Masoko et Makgapeetjaa,(2015), ont testé l'extraction de feuilles olivier par l'utilisation des divers solvants de polarité variable (hexane, chloroforme, dichlorométhane (DCM), acétate d'éthyle, acétone, éthanol, méthanol, butanol et eau). Parmi les neuf solvants utilisés, le méthanol a donné le meilleur rendement, car il extrait une plus grande quantité de matière végétale.

Benalia et Naili, (2020) ont également confirmé que le rendement d'extraction varie en fonction du solvant. Les résultats obtenus révèlent que le rendement de méthanol (36,93%) est très proche à celui obtenu par l'acétone (36,67%). Bien que, le rendement de ces deux solvant sestnettement supérieur à celui d'éthanol (21,63%) et de éthyle-acétate (16,46%), qui est le plus faible (Figure 9).

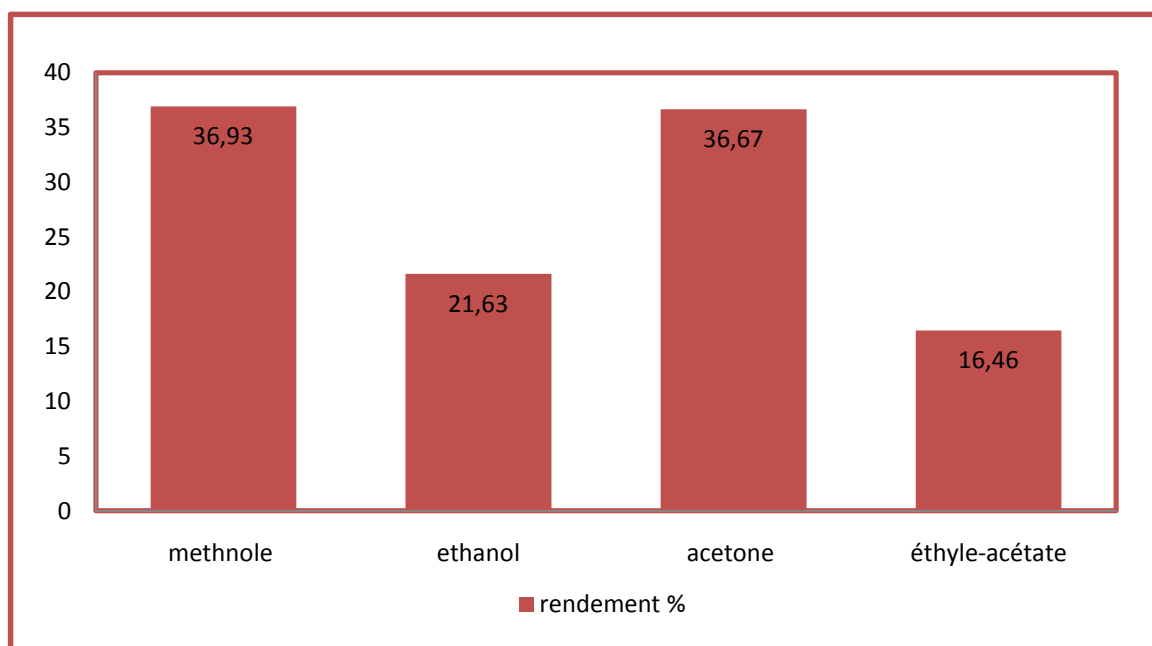


Figure 9. Rendement d'extraction des feuilles d'olivier par différents solvants organiques (Benalia et Naili, 2020).

Par contre, l'étude réalisée par Benahmed *et al.*, (2016) a montré que le rendement le plus élevé était avec l'extraction aqueuse (22,93%), ensuite l'extrait méthanol avec un pourcentage de (18,81%), puis l'extrait d'acétate d'éthyle avec (6,47%), puis le l'extrait de chloroforme avec (4,06%) et à la fin l'hexane a donné un rendement de l'ordre de (2,52%) (Tab.4).

Tableau 4. Les rendements d'extraction d'olivier obtenu par Benahmed *et al.*, 2016.

Extraits	Aqueux	Méthanol	Hexane	Chloroforme	Acétate d'éthyle
Rendements (%)	22,93	18,81	2,52	4,06	6,47

D'une manière générale, le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, le stade de croissance, l'organe utilisé dans l'extraction, les condition de séchage, la richesse de chaque espèce en métabolite (Daoudi *et al.*, 2015), aussi la région, la période et la méthode de conservation de la récolte sont des facteurs déterminant du rendement (Keskes *et al.*, 2014). En outre, la récupération des composés phénoliques dépende du type de solvant utilisé, de sa polarité et de la solubilité des composés phénoliques dans les solvant d'extraction (Iloki-Assanga *et al.* , 2015) .

4.2. Dosage des polyphénols totaux

En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur du jaune au bleu, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à la longueur d'onde 765 nm (Huang *et al.*, 2005). Dans l'étude de Lakache *et al.*, (2019), l'estimation quantitative des polyphénols totaux selon la méthode FC montre que l'extrait méthanolique d'*Olea europaea* est riche en composés phénoliques ($115,35 \pm 2,24$ mg EAG/g d'extrait) (Lakache *et al.*, 2019).

Azir, (2017) a rapporté que l'extrait méthanolique des feuilles olivier a teneur en polyphénols totaux la plus élevée (171.40 ± 6.79 mg EAG/g d'extrait), alors que le taux de l'extrait acétate d'éthyle est estimé par 68.96 ± 8.76 mg EAG/g d'extrait, et celui du chloroforme est de 27.85 ± 2.04 mg EAG/g d'extrait. Bien que l'extrait d'hexane présente une faible teneur avec 4.29 ± 0.33 mg EAG/g.

L'étude réalisée par Khilf *et al.*, (2015) sur la quantification des composés phénoliques dans les feuilles d'olive a donné 15.87 ± 0.56 mg EAG/g pour l'extrait hexane, et une teneur de 86.64 ± 1.42 mg EAG/g pour l'extrait d'acétate d'éthyle, et une teneur de 105.21 ± 1.83 mg EAG/g pour l'extrait méthanolique.

Dans l'étude de Boudjouref, (2011) l'auteur a rapporté que l'extrait du chloroforme des feuilles olivier le plus riche en polyphénols totaux avec: 178 mg EAC d'extrait, suivi par l'extrait éthanolique avec une teneur de 102 mg EAC, La teneur des polyphénols totaux dans l'extrait d'acétate d'éthyle est de 91 mg EAC d'extrait représente la fraction qui contient la plus faible teneur en polyphénols.

Cette différence dans les teneurs des polyphénols peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques (température, exposition au soleil, la sécheresse et la salinité...), le degré de maturation, la période de collecte, et le facteur génétique lié à la plante, ainsi que les conditions expérimentales (Boudjouref, 2011). Le profil phénolique des feuilles d'olivier est connu qu'il est affecté par plusieurs facteurs tels que l'âge des feuilles, l'origine géographique et les processus industriels employés pour l'extraction (Bilgin et Sahin, 2013).

D'une manière générale, les hauts rendements en polyphénols sont habituellement obtenus avec l'éthanol ou avec l'eau, En effet, l'eau joue un rôle important dans le processus d'extraction des polyphénols en augmentant leur diffusion dans les tissus végétaux (Ahtiok *et al.*, 2008).

Comme la polarité des solvants est différente, le choix du solvant utilisé pour l'extraction affecte d'une manière significative le rendement en polyphénols totaux, ce qui pourrait influencer la solubilité de divers constituants présents dans les feuilles d'olivier (Lafka *et al.*, 2013). La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires fournit une forte concentration de ces composés dans les extraits obtenus (Stanković, 2011). En plus de ces aspects quantitatifs, quelle que soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité de l'extrait, autrement dit, de la bioactivité de ces principes actifs. Pour cela, l'extraction des composés phénoliques se fait à froid (Boizot et Charpentier, 2006).

4.3. Dosage des flavonoïdes totaux

Dans la référence de Djeridane *et al.*, (2006), le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium, la quercétine a été utilisée comme étalon. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats du dosage des flavonoïdes sont exprimés en mg EQ/g d'extrait ces résultats montrent que l'extrait de méthanol d'*Olea europaea* ($7,19 \pm 0,19$ mg EQ/g d'extrait) est riche en flavonoïdes.

Les résultats obtenus par Azri, (2017) montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche en flavonoïdes totaux, dont sa teneur en flavonoïdes est estimée par $15,47 \pm 1,11$ mg EQ/g d'extrait, comparée à l'extrait du chloroforme avec une teneur de $11,75 \pm 1,36$ mg EQ/g, puis l'extrait méthanolique avec $9,84 \pm 0,54$ mg EQ/g d'extrait, et enfin l'extrait hexane qui possède la plus faible teneur en flavonoïdes avec seulement $1,69 \pm 0,31$ mg EQ/g d'extrait.

Dans l'étude effectuée par Khalif *et al.*, (2015) les teneurs en flavonoïdes totaux extraits à partir des feuilles d'*Olea europaea* obtenues par l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol sont $1,62 \pm 2,56$, $43,29 \pm 1,51$, $22,70 \pm 0,41$ mg EQ/g d'extrait respectivement. Alors que, Saoudi *et al.*, (2010) ont rapporté que la teneur la plus élevée en flavonoïdes ($131,89$ mg EQ/g d'extrait de feuilles) est liée à l'extrait aqueux.

Benahmed *et al.*, (2016) ont trouvé que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche en flavonoïdes avec $14,86$ µg EQ/mg d'extrait, suivi par l'extrait hexanique avec $9,32$ µg EQ/mg, l'extrait chloroformique renferme $8,75$ µg EQ/mg, l'extrait méthanolique contient $7,35$ µg EQ/mg d'extrait, alors que l'extrait aqueux ne contient que $0,1$ µg EQ/mg d'extrait.

La variation trouvée dans la teneur en flavonoïdes extraits à partir des feuilles d'olivier pourrait être expliquée par la méthode utilisée pour l'extraction (technique d'extraction, nature du solvant et le moment de l'extraction), et la technique de séchage, ainsi que l'influence de

l'origine de l'échantillon (Ben Salah *et al.*,2012). Sheikh et Gabr,(2016) a signalé que la concentration de solvant peut influencer la teneur des flavonoïdes.

La concentration de flavonoïde dans les extraits végétaux dépende de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits (Stanković, 2011).

4.4. Évaluation de l'activité antibactérienne

Morteza *et al.*, (2012) a testé l'activité antibactérienne des extraits aqueux de feuilles d'olivier, déterminée par la méthode de diffusion en gélose contre des bactéries pathogènes. Les résultats obtenus par Morteza *et al.*, (2012) sont résumé dans le tableau 5. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition des souches vis -à-vis de l'extrait selon l'échelle suivante décrite par Konan *et al.*,(2014) :

-Résistante : diamètre inférieur à 8mm.

-Sensible : diamètre compris entre 9 et 14 mm.

-Très sensible : diamètre compris entre 15 et 19 mm.

-Extrêmement sensible : diamètre supérieur à 20 mm.

Tableau 5 : Le diamètre de la Zone d'inhibition des souches testées (en mm)

Bactérie Extrait (mg/ml)	<i>Staphylococcus.</i> <i>aureus</i> PTCC 1431	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> PTCC 1639	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> PTCC 1399	<i>Klebsiella</i> <i>pneumonia</i> PTCC 1053	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> PTCC1274
10	-	1	-	-	-
15	1	2	2	2	1
25	3,5	4	2	4,5	2,1
30	7,2	8,5	6	7,2	7
50	9	11,5	8,2	10	9,5

(-) : pas d'inhibition.

D'après le tableau 5, l'extrait avec ses différentes concentrations exercent une activité antibactérienne sur la majorité des bactéries testées.

Cette activité est prononcé forte dans le cas de *S. typhimurium* PTCC 1639 et *K. pneumonia* PTCC 1053 a une concentration de 50 mg/ml avec un diamètre de 11.5 mm et 10 mm successivement.

Une sensibilité modérée est notée chez *S. aureus* PTCC 1431, *E. coli* PTCC 1399 et *B. cereus* PTCC1274 avec des zones de 9mm, 8.5 mm et 9.5 mm successivement a concentration de 50 mg/ml d'extrait.

Une résistance est notée chez toutes les souches testées avec les autre concentrations d'extrait des feuilles d'olivier (10, 15, 25et 35 mg/ml).

De nombreuses études confirment le rôle positif des feuilles d'olivier dans l'inhibition des bactéries pathogènes. Bruna *et al.*, (2020) ont étudié l'activité antibactérienne de l'extrait de feuilles d'olivier sur *S. aureus*, *E. coli* Les résultats obtenus dans la référence déjà citée ont indiqué que l' d'extrait des feuilles d'olivier présentait une activité antibactérienne avec des halos de 0,35 à 0,78 cm respectivement à une concentration de 50mg/ml d'extrait.

Pereira *et al.*,(2007) ont testé l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de feuilles d'olivier contre *S. aureus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *B. cereus*. Ils ont révélé que les taux de croissance de *S. aureus* et d'*E. coli* diminuaient lorsque la concentration en OLE augmentait et que l'OLE présentait une valeur IC25 (concentration inhibitrice de 25 %) de 2,68 et 1,81 mg/mL pour *S. aureus* et *E. coli*, respectivement.

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.

Dans une autre étude, Bakdi *et al.*, (2021) montre que les extraits aqueux et alcooliques se sont révélés très actifs sur *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition de $24,5 \pm 0,1$ mm pour l'extrait aqueux et de $20 \pm 0,8$ mm pour l'extrait éthanolique, ainsi que sur *B. subtilis* ($23,2 \pm 0,1$ mm et $15,2 \pm 0,3$ mm respectivement).

Jiao-jiao *et al.*, (2021) ont évalué l'activité antibactérienne par la méthode de la coupelle d'Oxford, dont des halos d'inhibition de diamètres variables ont été observés les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration minimale bactéricide (CMB), cette étude montrent que la bactérie *K. pneumoniae* est plus sensibles à CMI: 32 µg/mL, MBC: 64 µg/mL).

Markin *et al.*, (2003) ont également rapporté qu'un extrait aqueux de feuilles d'olivier à une concentration de 0,6% (p/v) a un effet létal vis-vis *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *K. pneumoniae* en 3h d'exposition. Par contre, *B. subtilis* n'a été inhibé que lorsque la concentration a été augmentée à 20 % (p/v), probablement en raison de la capacité de cette espèce à former des spores.

Selon les résultats obtenus dans cette référence, on peut dire que l'extraits des feuilles d'olivier a une activité antibactérienne qui varie d'une souche à une autre. Cette activité peut être importante, faible ou nulle selon la concentration de l'échantillon, et selon le degré de sensibilité des souches.

4.5. Evaluation de l'activité antifongique

La majorité des études publiées suivent la méthode de diffusion sur puit pour tester *in vitro* le pouvoir *in vitro* antimicrobien des extraits d'*Olea europaea*, en utilisant un milieu gélosé solide. L'activité antimicrobienne des extraits s'estime en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis des germes tests, (Benahmed *et al.*, 2016).

Keskin *et al.*, (2012) ont suivi la méthode de diffusion sur disque pour la détermination de l'activité antimicrobienne de l'extrait des feuilles d'olivier en utilisant *Candida albicans* comme souche test. Un effet bactéricide est enregistré après 24 h d'incubation en présence de 15% de l'extrait.

Le même résultat est trouvé par Markin *et al.*,(2003) en testant *C. albicans* avec l'extrait des feuilles d'olivier à 15 % (Figure 10).

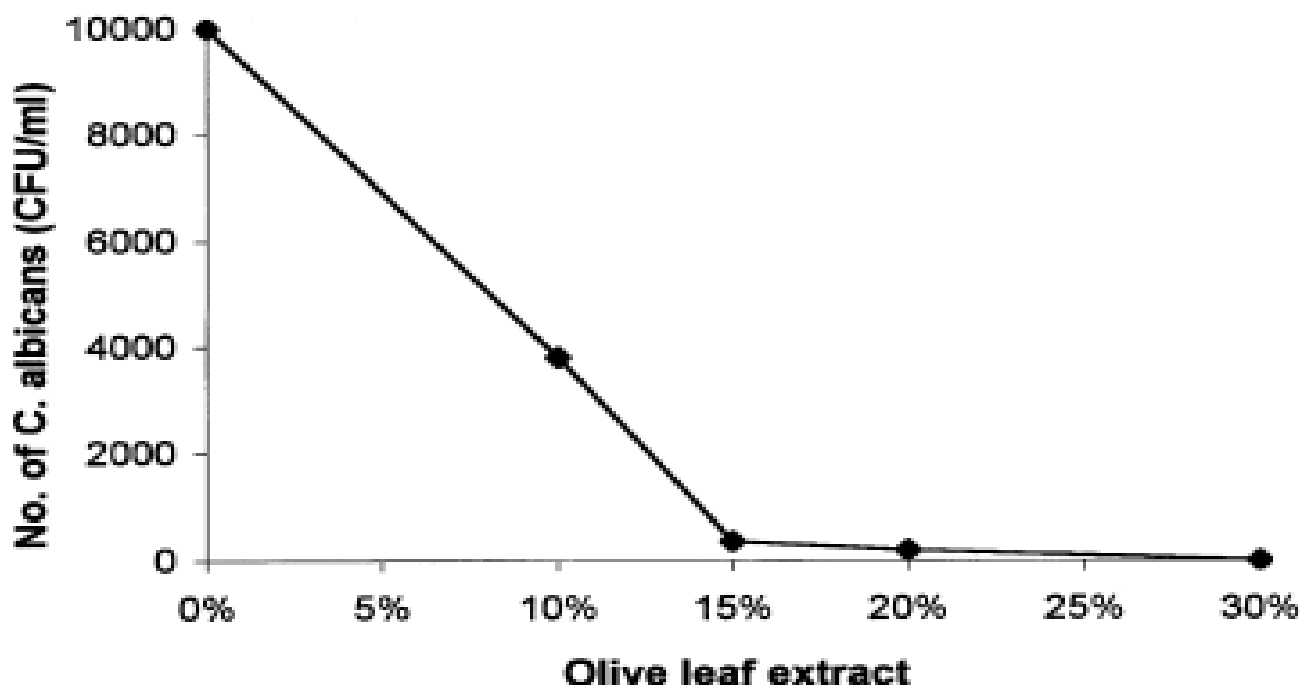


Figure 10. Effet de différentes concentrations d'extrait des feuilles d'olivier sur la viabilité des cellules de *Candida albicans* (concentrations fongicides minimales, MFC) après 24h (Markin *et al.*, 2003).

Selon la même référence, il a été rapporté que des changements morphologiques notables sont enregistrés chez les cellules de *C. albicans* traitées par 20% d'extrait des feuilles d'olivier par rapport aux cellules témoins (non traitées) (Figure 11). Les cellules traitées présentaient des modifications après 24 heures d'incubation. Les cellules deviennent amorphes et des déformations dans la paroi cellulaire se manifestent (Figure 12).

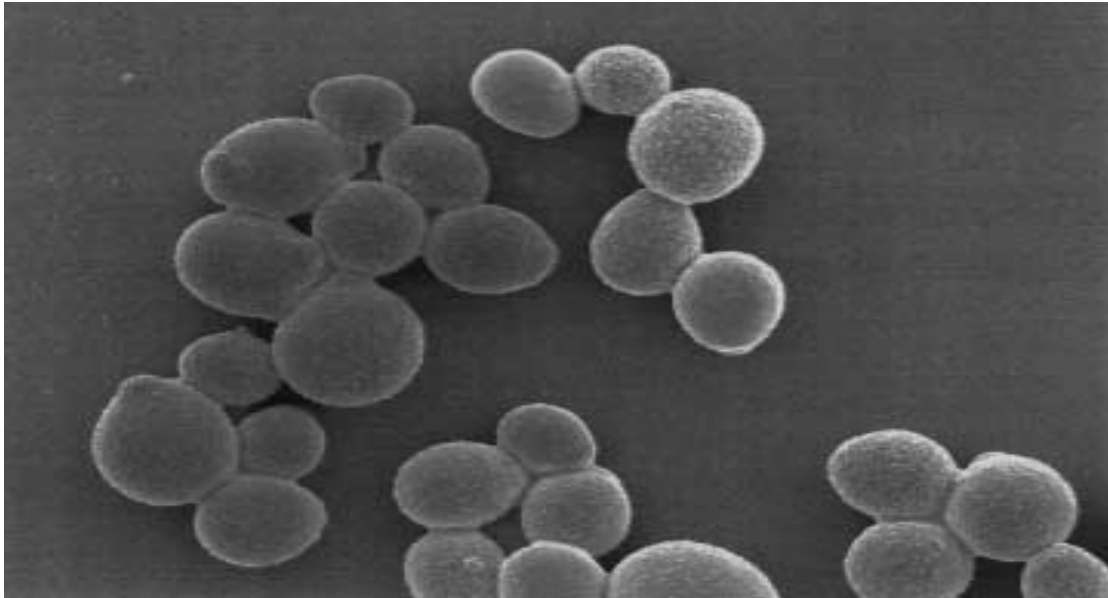


Figure 11. Micrographie électronique à balayage de *Candida albicans* (témoin: cellules non traitées) (Markin *et al.*, 2003).

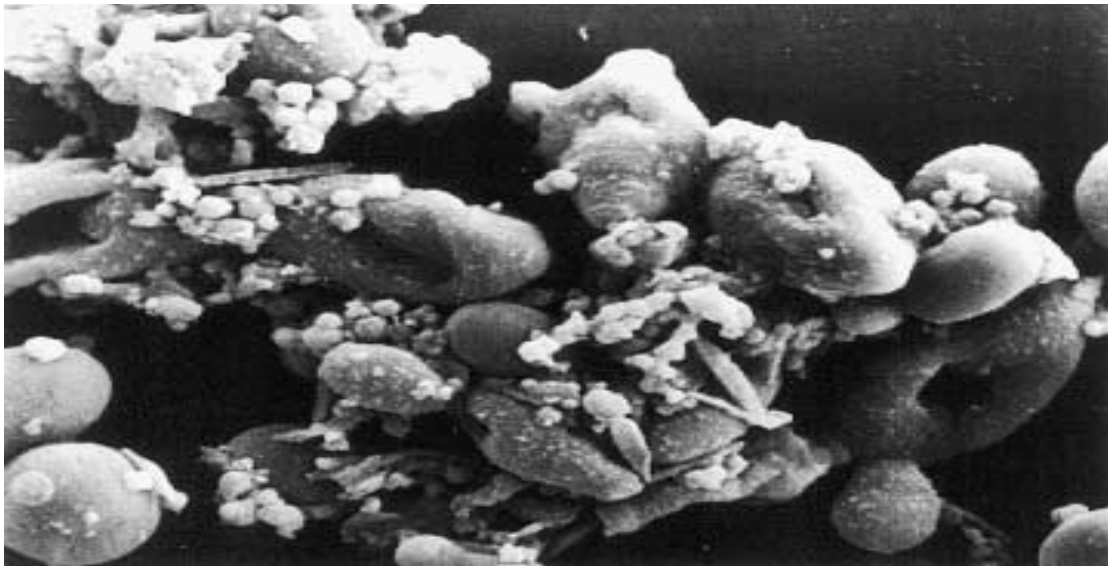


Figure 12. Micrographie électronique à balayage de *Candida albicans* traité par 20% d'extrait de feuille d'olivier après 24 h (Markin *et al.*, 2003).

Selon Khalif *et al.*,(2015) les extraits des feuilles d'olivier ont montré de bons effets inhibiteurs sur *C. albicans*, par l'action antimicrobienne des composés phénoliques. Cela est expliqué par la capacité de ces composés phénoliques à dénaturer les protéines. Ils agissent en provoquant la fuite de constituants cytoplasmiques tels que les protéines et les ions minéraux. Les polyphénols sont également connus pour se lier au peptidoglycane conduisant à la rupture de l'intégrité de la paroi cellulaire. Selon Brahmi *et al.*,(2012) une activité antifongique puissante a été manifestée par l'extrait des feuilles olivier à l'égard de *C. albicans* et *C. glabrata*.

D'autres résultats obtenus par Pereira *et al.*, (2007) confirment les résultats précédents. Ils ont trouvé des effets inhibiteurs des extraits aqueux des feuilles d'olivier sur les champignons *C.albicans* et *C.neoformans*. L'extrait testé a inhibé toutes les souches fongiques. La souche de l'espèce *C. albicans* était la plus sensible, présentant des valeurs IC25 inférieures à 1 mg/ml.

L'étude de Zori *et al.*, (2016) montre la viabilité de *C.albicans* et *C. dubliniensis* traitées par l'extrait des feuilles d'olivier en utilisant la méthode d'exclusion au bleu trypan (Figure 13).

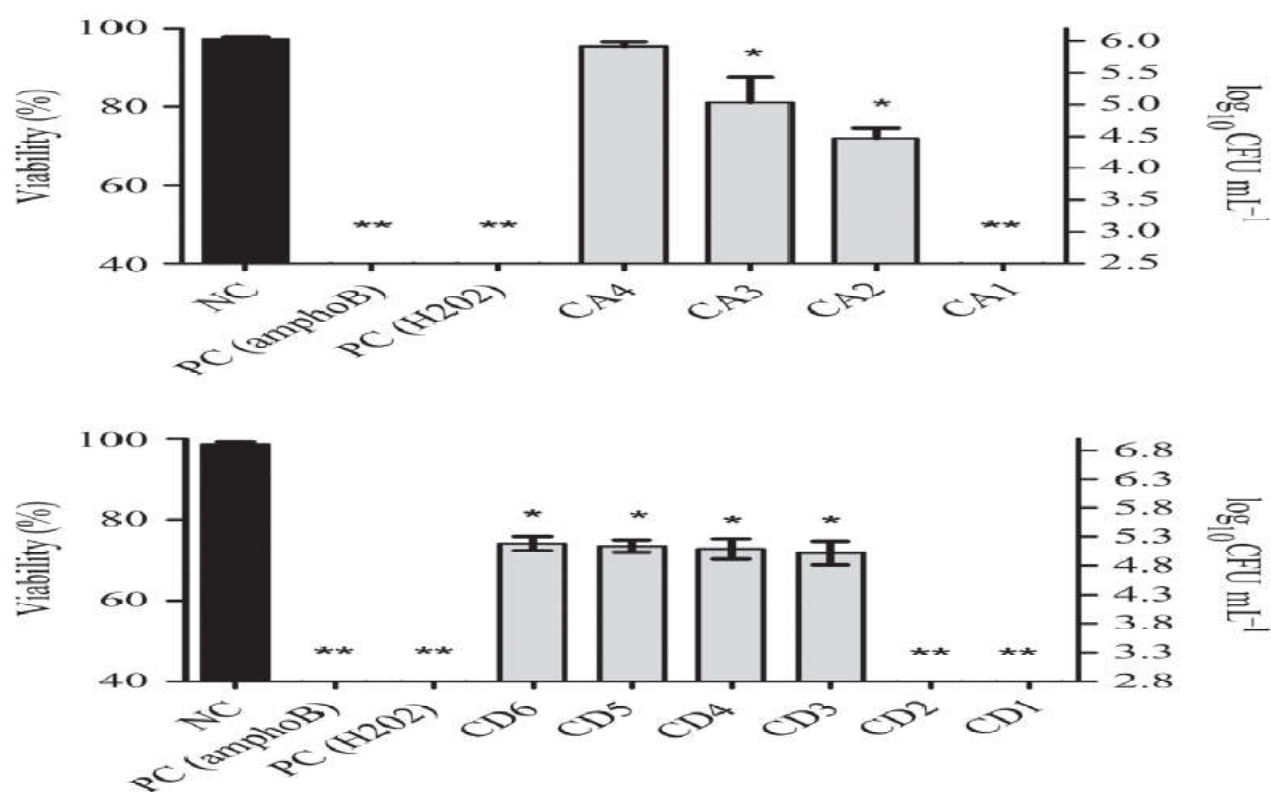


Figure 13. a) : Viabilité de *C. albicans* sous traitement par l'extrait de feuilles d'olivier à différentes concentrations. b) : Viabilité de *C. dubliniensis* sous traitement par l'extrait de feuilles d'olivier à différentes concentrations.

Par contre l'étude réalisée par Pereira *et al.*,(2006) a montré que la souche *C. albicans* était la plus résistante à l'extrait des feuilles d'olivier. Ce résultat est confirmé également par Sousa *et al.*,(2006) qui ont rapporté que *C. albicans* était le microorganisme le plus résistant à l'extrait de feuilles d'olivier.

L'activité antifongique d'*Olea europaea* était l'objectif d'une autre étude réalisée par Shialy *et al.*,(2015) suivant la méthode de diffusion sur disque. Les auteurs ont décrit que l'extrait testé a un effet inhibiteur vis-à-vis d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus*. Cependant, le même extrait était inefficace (plage de CMI: 12,5-25 mg/ml). Les résultats de ce travail est résumé dans le tableau 6.

Tableau 6. Zone d'inhibition (mm)^a de l'extrait des feuilles d'olivier testé à l'égard des souches fongiques (Shialy *et al.*,2015)

Extraits	<i>C. Albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. Krusei</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. Fumigatus</i>
Feuilles olivier	N.I	N.I	N.I	N.I	13	N.I	11
^b Mélange du trois extraits	12	14	13	16	12	13	12
Control positive							
Fluconazole	26	27	17	27	-	-	-
Amphotericin B	-	-	-	-	27	16	21

^a Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions; NI: pas d'inhibition

L'amphotricine B (30 még / disque) et le clotrimazole (10 µg / disque) ont été utilisés comme témoins positifs.

^b extrait de feuille d'olivier

Muzzalupo *et al.*,(2020) ont prouvé l'activité antifongique de l'extrait des feuilles d'olivier testé *in vitro* à l'égard de *Fusarium proliferatum*.

Une autre étude réalisée par Korukluoglu *et al.*,(2007) sur une collection importante de 30 souches de champignons filamenteux dans le but d'identifier l'activité inhibitrice des extraits des feuilles d'olivier par la méthode de diffusion sur disque. Il s'agit des souches appartenant à l'espèce *Alternaria alternata*, *Aspergillus chevoileri*, *A. chrysogenum*, *A. elegans*, *A. flavus* (quatre souches), *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger* (deux souches), *A. oryzae*, *A. parasiticus* (trois souches), *A. tamari*, *A. verrucosum*, *A. versicolor*, *A. goneii*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Mucor racemosus*, *Neurospora crassa*, *Penicillium*

citrinum, *P. echinulatum*, *P. griseofulvum*, *P. italicum*, *P. roqueforti* et *Rhizopus oligosporus*, été réalisés. Selon cette référence, toutes les souches fongiques testées ont montré divers degrés de sensibilité aux extraits (l'extrait aqueux, de l'acétone, du méthanol et de l'éther diéthylique). Les souches correspondant à *A. alternata*, *F. oxysporum*, *P. roqueforti* et *P. verrucosum* étaient complètement inhibées. Les souches de l'espèce *A. flavus* (2 souches), *A. niger*, *A. goneii*, *F. semitectum* et *P. echinulatum* étaient classées comme sensibles aux extraits testés. Cependant, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. parasiticus* (1–4 souches), *A. tamari*, *N. crassa*, *M. racemosus*, *P. griseofulvum* et *R. oligosporus* sont présentés une résistance à l'égard des extraits testés.

Plusieurs travaux ont démontré les propriétés antimicrobiennes des extraits de feuilles d'olivier, compte tenu de leur teneur élevée en phénols. Les recherches réalisées *in vitro* par plusieurs auteurs (Das *et al.*, 2010 ; Keskin *et al.*, 2012) ont démontré que les polyphénols de l'extrait de feuilles d'olivier ont des activités antimicrobiennes contre plusieurs microorganismes. Les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, ils ont des modes d'action divers, des activités inhibitrices et létales vis-à-vis de nombreux microorganismes. La puissante activité antimicrobienne des extraits phénoliques et bruts est confirmée par la méthode de micro dilution a pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une souche pathogène vis-à-vis des divers antibiotiques. La méthode de micro dilution est effectuée en milieu liquide sur microplaque.

En effet, 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 phénoliques et l'activité antimicrobienne (Djenane *et al.*, 2012).

La recherche réalisée *in vitro* par Khalil *et al.*, (2001) sur différentes souches de champignons a montré leur divers degrés de sensibilité à l'égard des extraits testés. Les souches testées appartiennent à des espèces identifiées et d'autres non identifiées ; *Verticillium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus* sp., *Penicillium italicum*, *Rhizoctonia solani*, *Stemphylium solani*, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., *Colletotrichum* sp., *Pythium* sp. L'activité inhibitrice la plus élevée a été signalée contre *Fusarium oxysporum* et *Verticillium* sp. Aucun effet n'a été observé contre *Alternaria* sp.

Korukluoglu *et al.*, (2006) ont testé l'activité antilevurienne des extraits de feuilles d'olivier dans l'eau et éthanol, l'acétate d'éthyle et acétone comme solvant d'extraction. Leur puissance est évaluée quantitativement par la présence ou l'absence de CMI µg/ml et de

MFC($\mu\text{g/ml}$) et les diamètres des zones d'inhibition (mm). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3. La plage de diamètres de CMI, de MFC et de la zone d'inhibition était de 10-28 g/ml, 20-48 g/ml et 1,5-9,3 mm, respectivement. Les résultats publiés dans cette référence indiquent que les souches levuriennes testées étaient sensibles aux extraits d'acétone et d'acétate d'éthyle. Bien que, la souche de *Saccharomyces cerevisiae* a démontré une résistance plus élevée que les autres levures testées *C.oleophila* et *S.pombe* étaient les microorganismes les plus sensibles.

Tableau 7. L'activité anti levurienne des extraits de feuilles d'olivier (Korukluoglu *et al.*, 2006).

Levure	Source	Solvant	MIC ($\mu\text{g/ml}$) *	MFC ($\mu\text{g/ml}$) *	Zone d'inhibition diamètre mm*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763	Acétate d'éthyle	24 \pm 2.94	48 \pm 1.81	3.0 \pm 2.17
		Acétone	Nd	Nd	Nd
		Alcool éthylique	Nd	Nd	Nd
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Vin	Acétate d'éthyle	23 \pm 1.41	46 \pm 1.72	2.3 \pm 0.23
		Acétone	12 \pm 0.81	24 \pm 1.06	9.3 \pm 0.18
		Alcool éthylique	13 \pm 2.16	26 \pm 1.47	8.8 \pm 0.36
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Cerises sucrées pourries	Acétate d'éthyle	15 \pm 4.08	30 \pm 2.36	7.0 \pm 0.75
		Acétone	16 \pm 2.44	32 \pm 2.75	5.8 \pm 1.61
		Alcool éthylique	15 \pm 2.16	30 \pm 2.01	7.5 \pm 1.53
<i>Kloeckera apiculata</i>	Pomme pourrie	Acétate d'éthyle	16 \pm 1.82	32 \pm 1.80	5.3 \pm 0.56
		Acétone	20 \pm 2.44	20 \pm 2.16	4.8 \pm 0.77
		Alcool éthylique	10 \pm 1.41	20 \pm 1.33	1.5 \pm 0.46
<i>Candida oleophila</i>	Cerises sucrées pourries	Acétate d'éthyle	23 \pm 1.82	23 \pm 1.70	2.3 \pm 1.33
		Acétone	12 \pm 2.44	24 \pm 2.11	9.0 \pm 2.29
		Alcool éthylique	28 \pm 1.82	28 \pm 1.63	0.8 \pm 0.39
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Vin	Acétate d'éthyle	23 \pm 1.41	23 \pm 1.55	2.3 \pm 1.42
		Acétone	16 \pm 0.81	32 \pm 1.01	5.3 \pm 0.67
		Alcool éthylique	23 \pm 2.58	23 \pm 2.37	2.0 \pm 0.87

* Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type des observations du quatrième temps de détection. Nd : non déterminé.

L'activité antifongique des extraits de feuilles d'olivier contre les levures testées a été évaluée quantitativement par la présence ou l'absence de CMI ($\mu\text{g/ml}$) et MFC ($\mu\text{g/ml}$) et les

diamètres de la zone d'inhibition (mm). à travers le tableaux 7, Les valeurs de CMI, de MFC et les diamètres de zone d'inhibition des extraits de feuilles d'olivier contre les levures était de 10-28 g/ml, 20-48 g/ml et 1,5-9,3 mm, respectivement.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la composition de l'extrait tels que ; l'emplacement géographique (les vents pendant les saisons, les brouillards et les fortes hygrométries, la grêle et les gelées printanières sont autant de facteurs défavorables à végétaux et exigeant en lumière, l'insolation est à considérer dans le choix de l'orientation des arbres, la densité de plantation), température (influencent la synthèse de composés tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes ; tandis la teneur en polyphénols totaux des feuilles d'olivier augmente lors du séchage).La nutrition des plantes on peut suggérer que le site de collecte affecte l'activité antimicrobienne en raison de la composition du sol (doit être profond, perméable, bien équilibré en éléments fins)(Keskin *et al.*, 2012).

La différence entre les activités antifongiques de l'extrait pourrait être attribué à l'origine de l'échantillon, à une procédure d'extraction différente et à un profil chimique différent de l'extrait (Pereira *et al.*, 2007). De plus, l'utilisation d'une combinaison de tests de sensibilité est souhaitable puisque les résultats obtenus pour l'activité antimicrobienne à partir de différents tests de sensibilité ne sont pas toujours en corrélation les uns avec les autres (Zori *et al.*, 2016).

Conclusion

Depuis des siècles, l'humanité a utilisé les plantes médicinales pour traiter les différentes maladies, grâce à leur bien faits thérapeutique à savoir; leur propriété antioxydante, antimicrobienne, antidiabétique... Dans le présent document, nous avons essayé de faire une synthèse des différents travaux évaluant l'activité antimicrobienne d'*Olea europaea*, une plante utilisée fréquemment par notre population locale.

L'activité antimicrobienne d'*Olea europaea*. a fait l'objet de plusieurs études approfondies au cours des quatre dernières décennies. Ces travaux scientifiques sont principalement concentrés sur l'activité antimicrobienne des extraits bruts contre une grande variété de bactéries et de champignons.

Le rendement d'extraction par macération des feuilles d'*Olea europaea* diffère en fonction des solvants utilisés. L'analyse des travaux effectués sur ce sujet nous permet de conclure que le rendement le plus élevé s'obtient avec le méthanol, puis l'extrait du chloroforme, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle, Tandis que, l'extrait d'hexane a présenté dans la majorité des études analysées le plus faible rendement. L'analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux montre que l'extrait méthanolique est le plus concentré en composés phénoliques, alors que la teneur des flavonoïdes la plus élevées s'observe dans l'extrait d'acétate d'éthyle.

Les travaux effectués sur l'extrait des feuilles d'olivier ont prouvé leur richesse en polyphénols qui sont connus par leurs propriétés antimicrobiennes. L'extrait brut des feuilles d'olivier inhibent plusieurs souches bactériennes et fongiques pathogènes testées, classées comme résistantes aux différents antibiotiques.

L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence les effets bénéfiques qui peuvent être mis à profit par l'utilisation des plantes sur les feuilles olivier, pour une meilleure valorisation de ces ressources naturelles, dont de nombreuses perspectives peuvent être envisagées:

- Elargir l'éventail des espèces microbiennes testées (virus, parasites), et faire des associations entre ces extraits pour voir d'éventuel effet synergique.
- Approfondir l'investigation phytochimique et biologique sur ces plantes afin d'isoler les molécules responsables des activités observées, ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base de ces plantes.

- Evaluer *in vitro* d'autres activités biologiques à savoir l'activité antiulcéreuse, anticancéreuse, antioxydante, antimitotique, et procéder à des tests *in vivo*.
- isolement et identification des composés actifs que contient cette plante.

Références

Bibliographiques

1. Ait Youcef M. 2006. Plantes médicinales de Kabylie. Edition Ibis press. PP : 260, 349
2. Altok E., Bayc D., Bayraktar O., Ulku S .2005. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin , Separation and Purification Technology 62 : 342–348
3. Aouidi F. 2012. Etude et valorisation des feuilles d'olivier *olea europaea* dans industrie, thèse de doctorat, université de Charchage , PP 11-13
4. Aouidi F. 2012. Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L) Leaves. Molécules, Etude de la valorisation des feuilles d'Olivier *Olea Europaea* dans L'industrie Agro-Alimentaire. Thèse doctorat, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, Tunisie ; PP. 1153-1162.
5. Azir H . 2017. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits des feuilles *d'olea europaea sativa* (olivier). thèse de magister, Université Mohammed khider, PP 5 -30
6. Bakdi H., Kebbouche-gan S., Djelali N., Louhab. K., Yahiaoui K. 2021.Valorization of olive tree leaves: phytochemical and pharmacological characterizations, selection of extracts and formulation of herbal cream Algerian Journal of Environmental Science and Technology June edition. Vol.7. No2 : 2437-1114
7. Benahmed A., Chergui M., Rebai K. 2016. Evaluation des effets biologiques (Activité antioxydante, antibactérienne et antifongique) de *Marrubium vulgare*,Thèses de magister, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy , B.B.A , PP 28-29
8. Benalia H., Naili D. 2020. Evaluation de l'activité antioxydant de l'extrait des feuilles d'olivier, Thèses de magister, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy, B.B.A, PP 26-27
9. Benlagha R., Khelil Y. 2019. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux obtenus par trois méthodes d'extractions à partir des feuilles d'*Olea europaea* , these de magister , Université Mohamed Khider , Biskra , P 19 .
10. Ben Salah M., Abdelmelek H., Abderraba M. 2012, Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia , Volume 2(5): 107-111 (2012) - 0107
11. Bilgin M., Sahin S. 2013. Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves , the Taiwan Institute of Chemical Engineers 44 : 8 – 12

12. Boizot N., Charpentier J.P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA , PP.79-82
13. Boudhrioua N., Bahloul N., Slimen I., Ben Kechaou N. 2008. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves(9) : 412–419
14. Boudouref M. 2011. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L, Université Ferhat Abbas, Sétif, PP 31-75.
15. Boulkoroune H. 2017. L'oléiculture en petite kabylie: améliorer la qualité du produit participe au développement durable de la filière. Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Université Ferhat Abbas Sétif 1, 186p.
16. Bousdjouref M. 2011. Etude les activite antioxydant et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L , Mémoire magister , université farhat abbes , stife , p53
17. Brahmi F., Flamini G., Issaoui M., Dhibi M., Dabbou S., Mastouri M., Hammami M. 2012 . Chemical composition and biological activities of volatile fractions from three Tunisian cultivars of olive leaves , Med Chem Res 21: 2863 –2872
18. Bruna F., Deborah M., Fernanda M., Andressa C., Eliezer A., Rui C. 2020 Antioxidant and antimicrobial activity of olive trees cultivated in the Campanha Gaúcha region Braz. J. of Develop. Curitiba, v. 6.N.4, P.21791-21805
19. Caturla N., Perez-Fons L., Estepa A., Micol V. 2005. Differential effects of oleuropein, abiophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. Chem Phys Lipids, Vol 137, P 2-17
20. Cronquist A. 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants, 2nd edition Bronx, N.Y USA : The New York Botanical Garden, P 145
21. Daoudi A., Sabiri M., Bammou M., Zair T., Ibijbijen J., Nassiri L. 2015 . Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica*: *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poiret et *Urtica pilulifera* L , Applied Biosciences 87: 8094 – 8104
22. Das K., Tiwari S., Shrivastava D.K. 2010. Techniques for évaluation of médicinal plant products as antimicrobial agent : Current methods and future trends, Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(2), PP 104-111
23. Djabali S, 2012 , Effet des polyphénols sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain d'haricot sec, thèse de magister, Université Mentouri, Constantine, P 31

24. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stoker P., Vidal N. 2006 . Antioxydant activity of some algerain medicinal plant extracts containing phenolic compounds , Food chemistry 97:654 - 660
25. Djenane D., Aïder A., Yangüela J., Idir L ., Gómez D., Roncalés P. 2012. Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with *E.coli* O157 : H7 and *S.aureus* during storage at abuse refrigeration temperature, Meat Science 92 : 667 – 674
26. Elodie G. 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action .Thèse de doctorat, Université de Corse-pasqualepaoli, 143 p.
27. Eberhard T., Robert A., Annelise L. 2005. Plantes aromatiques (épices, aromates, condiments et huiles essentielles). Edition Tec et Toc. PP : 355- 356.
28. Ferhi H, 2009, effet de l'irradiation gamme sur les feuilles d'olivier et application dans les produits carnés, thèse de magister, Université de 7 novembre, Carthage, P11
29. Jiao-jiao Y., Han-jun Y., Jing H., Yang-yang L.,2021.Antibacterial activities of polyphenols from olive leaves against *Klebsiella pneumoniae*. Earth and Environmental Science 680: 012060
30. Haddouchi F., Chaouche T.M., KSOURI R. 2014. Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of aqueous-extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*. Chin J Nat Med 12(6), 415–22.
31. Haddou D.F.2017. L'infestation de la Teigne de l'olivier dans quelques vergers, thèse de magister, Université Tlemcen, P 5
32. Harborne, J. B., Simmonds, N.W.1964. Biochemistry of Phenolic Compounds, Academic Press, London, PP101
33. Himour S. 2018. Comportements biologique, physiologique, biochimique et l'activité biologique de quatre variétés d'olivier (*Olea europae* L.) dans l'Est Algérien, thèse de magister, Université des Frères Mentouri , Constantine, P 18
34. Huang D., Boxin O., RONALD L., Prio R. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, J. Agric. Food Chem. 53: 1841-1856
35. Itafv. 2008. L'oléiculture en Algérie-Situation actuelle de L'oléiculture en Algérie.

36. Kavitha V.U., Kandasubramanian B. 2020. Tannins for wastewater treatment. Springer Nature Journal 1081 :1-21.
37. Khalil M., ABURJAI A.T., ANFOKA G.H., SHAHROUR W .2001 . Antifungal activity of olive cake extracts , *Phytopathol. Mediterr.*40, 240–244
38. Khelif I., Jellali K., Michel T., Halabalaki M., Skaltsounis A.L., Allouche N. 2015, Characteristics, Phytochemical Analysis and Biological Activities of Extracts from Tunisian Chetoui *Olea europaea* Variety , Chemistry Volume 2015, Article ID 418731, P 11
39. Keskin D., Ceyhan N., Uğur A., Dbeys A.D. 2012. Antimicrobial activity and chemical constitutions of West Anatolian olive (*Olea europaea* L.) leaves, Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.10 (2) : 99-102
40. Keskes H., Mnafigui K., Hamden K ., Damak M , Feki A.E, Allouche N .2014. In vitro anti-diabetic, anti-obesity and antioxidant proprieties of *Juniperus phoenicea* L. leaves from Tunisia , Asian Pac J Trop Biomed 4: S649-S655
41. Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit A. 2007. Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compound, Journal of Food Safety (28) : 76–87
42. Korukluoglu M., Sahan Y, Yigit A., Karakas R. 2006. Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye Region of Turkey, Annals of Microbiology, 56 (4) : 359-362
43. 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.
44. 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.
45. Lafka T.I ., Lazou A. E., Sinanoglou V. J ., Lazos ES. 2013 . Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential as Edible Oils Antioxidants , *Foods*, 2: 18-31

46. Lakache Z., Tigrine C., Aliboudhar H., Kameli .2019. Composition chimique, activités anti-inflammatoire, antalgique et cytotoxique *in vivo* de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* , Phytothérapie 2019-0195
47. Laouini Salah Eddine, 2014, Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de Phoenix dactylifera L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf) , thèse de magister , Université Mohamed Khider , Biskra, PP 36 -38
48. Loussert R., Brousse G. 1978. L'olivier, techniques agricoles et production méditerranéenne. G.p. Maisonneuve et Lotose, Paris.1-3, 58, 62-77,128-136.
49. Madani Y.M. 2017. Dosage des polyphénols et recherche d'activité antiradicalaire de feuilles d'olives, thèse de magister, Université de Tlemcen, Algérie, PP 22-31
50. Macheix J. 1996. Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle. Acta bot. Gallica, 143 (6) : 473-479.
51. Manallah A. 2012. Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. thèse de magister, Université Ferhat Abbas, Sétif, P 22
52. Markin D., Duek L., Berdicevsky I. 2003 . *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern *in vitro*, Mycoses, 46, 132–136
53. Masoko P., Makgapeetjaa D . 2015. Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of *Olea africana* against pathogenic yeast and nosocomial pathogens , BMC Complementary and Alternative Medicine 15: 409
54. Milan S.S. 2011. Total phenolique content ONTENT, flavonoid cocentretion and antioxydant activity of *Marrubium peregrinum* L. Extracts, Kragujevac J. Sci. (33) 63-72.
55. Mirad F., Badis., 2019. Activité antioxydant et antibactérienne des extraits des feuilles d'olivier sauvages et cultivés, thèse de magister, Université Akli Mohand Ohandoulhaj, Bouira, PP 22-23
56. Morteza A., Reza K., Mahdiyeh L., Nourbakhsh M., Golnaz R. 2012. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract ;Annals of Biological Research, 3 (8):4189-4191

57. Muzzalupo I., Badolati G., Chiappetta A., Picci N., Muzzalupo R. 2020. In vitro Antifungal Activity of Olive (*Olea europaea*) Leaf Extracts Loaded in Chitosan Nanoparticles, March, Volume 8, Article 151.
58. Nasrollahi Z., Abolhasannezhad M. 2015. Evaluation of the antifungal activity of olive leaf aqueous extracts against *Candida albicans* PTCC-5027, *Curr Med Mycol*, 1(4) : 37-39.
59. Nefzaoui A. 1995. Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course. Syria 12-23 March.
60. Otmani Y., Slimani M. 2018. Activité antibactérienne et anti-inflammatoire des extraits des feuilles d'olivier (*Olea europea L.*) et du lentisque (*Pistacia lentiscus L.*). Mémoire Master, université de Tizi ouzou, P69.
61. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* 47(5) :1-15.
62. Pereira AP., Ferreira I., Marcelino F., Valentão P., Andrade P.B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J.A. 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea L. Cv. Cobrançosa*) Leaves, *Molecules*, 12, 1153-1162
63. Pereira J.A., Pereira A.P., Ferreira G., Valentão F.R., Andrade P., Seabra P.B., Estevinho R., Bento A. 2006. Table olives from Portugal: Phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 54 : 8425–8431
64. Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P. Glover W. 1999. Phenolic compound and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
65. Rejeb I. 2008. Etude de l'effet de F irradiation sur les polyphénols du curcumin, thèse de magistère, Université du 7 novembre, Carthage, PP 34-35
66. Rezgui A., Chentouf Y. 2020. Screening phytochimique et caractérisation par chromatographie sur couche mince CCM des extraits des feuilles de *Moringa oleifera*, these de magister, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, PP 4-5

67. Saad D. 2009. Etude des endomycorhizes de la variété sigoise d'olivier (*Olea europea L.*) et essai de leur application a des boutures semi-ligneuses, Mémoire de magister, université d'Oran, P 98
68. Saoudi M., Allagui M.S., Abdelmouleh A., Jamoussi K., El Feki A. 2010. Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Exp.Tox.Pathol.* 62:601–605.
69. Selaimia H., Zerrouki S., Zarouri M.W. 2019. Etude des vertus thérapeutiques des feuilles d'olivier cultivé et sauvage *Olea europaea L.*, thèse de magister, université Saad Dahlab, Blida, PP 17-34
70. Sheikh B Y., Gabr S. 2016. Influence of Extraction Solvents and Phytochemical Analysis in the Evaluation of in-vitro Antioxidant Activity of Saudi Arabian Olive Leaves Extract, *American Journal of Chemistry and Application.* Vol. 3, No. 2, 2016, PP 6-12.
71. Shialy Z, Zarrin M, Nejad B S., Naanaie Y.2015. *In vitro* antifungal properties of *Pistacia atlantica* and olive extracts on different fungal species, *Curr Med Mycol*, Dec, 1(4): 40-45
72. Simon B., Assanga I, Lidianys M., Lujan1L., Claudia L., Espinoza L., Armida A., Salido G.,Fernandez D., Jose L., PinoR., Haines D.D.2015. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction, *BMC Res Notes* (8):396
73. Sousa A., Ferreira I., Calhelha R., Andrade P.B., Valentao P., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J. 2006. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*14 : 8533–8538
74. Stanković S, 2011.Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum L.* Extracts, *Kragujevac J. Sci.* 33 : 63-72.
75. Tourte Y., Bordonean M. 2005. Le monde des végétales : organisations, physiologie et génomique. Eds. Dunod. Paris. France. PP 25-26
76. Valadimir M. 2008.L'olivier et les vertus thérapeutiques de ses feuilles, thèse de doctorat, Université de Nontes, P 82

77. Vicente R., Caturla N., Perez-Fons L., Vicente M, Perez L., Estepa A. 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV) , *Antiviral Research* 66 : 129–136
78. Zoric N ., Kopjarn O., Kraljic K ., Orsolc N., Tomic S., Kosalec I., 2016. Olive leaf extract activity against *Candida albicans* and *C. dubliniensis* – the *in vitro* viability study , *Acta Pharm.* 66 : 411–421

Annexes

Annexe 1: Milieu des culture et réactif utilisé

Milieu Potato-Dextrose-Agar (P.D.A)

Agar-agar	20g.
Pomme de terre	200g.
Dextrose	20g.
Eau distillée	1000 ml.

Laver, couper en morceaux les pommes de terre, les faire cuire, filtrer, ajouter l'agar, dextrose le puis ajuster la quantité d'eau. Autoclaves 20 minutes à 120°C.

Milieu Mueller-Hinton (M.H)

La gélose de Mueller-Hinton a été utilisée pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux extraits naturels. Elle est solide et constitue également un excellent milieu de base pour la préparation d'une gélose au sang. La composition est la suivante :

Infusion de viande de boeuf	300 ml.l-1
Peptone de caséine	17,5 g.l-1
Amidon de maïs	1,5g.l-1
Agar	17 g.l-1

Préparation

38g de poudre MHA + 1 ml d'eau distillé, laissé agiter en chauffant légèrement (50°- 70°C), mettre à l'autoclave à 120 °C pendant 20min.

Réactif de Folin-Ciocalteu

Il peut être préparé de la façon suivant :

- 100 g de tungstate de sodium
- 25 g de molybdate de sodium

Sont dissous dans 700 mL d'eau distillée Ajouter :

- 50 mL d'acide phosphorique à 85% ($\rho_{20}=1.71$ g/mL)
- 100 mL d'acide chlorhydrique concentré ($\rho_{20}=1.19$ g/mL).

Porter à ébullition sous reflux pendant 10 heures, ajouter ensuite :

- 150 g de sulfate de lithium

- quelques gouttes de brome , et porter à nouveau à ébullition durant 15 minutes.

Refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillé

Chlorure d'aluminium

- Chlorure d'aluminium à 2% : 2g dans 100 ml de méthanol.

- Solution d'extrait : 10 mg dans 10 de méthanol.

Olea europea هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة Oleaceae ، منتشر في وسط الجزائر. إنه نبات يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي لما له من مزايا عديدة. وفقاً لنتائج العمل الذي تم تحليله ، لا يتم تقييم أوراق نبات *Olea europea* بالمراحل التالية: الاستخلاص بالنقع بمذيبات عضوية مختلفة (ميثانول ، كلوروفورم ، إلخ) ، تم الحصول على أعلى محصول باستخدام مستخلص الميثانول ، تم إجراء تحليل كمي لمجموع مستخلص البوليفينول والفلافونويد ، مما يدل على أن مستخلص الميثانول هو الأغنى في مادة البوليفينول بينما لوحظ أعلى نسبة فلافونويد في مستخلص الأسيتات إيثيل.

تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على السلالات البكتيرية والسلالات الفطرية وفقاً لطريقة انتشار وسط الآجار وفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها ، تبين أن مستخلص *Olea Europeain* يثبط نمو البكتيريا (مثل *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhimurium* و *Escherichia coli* و *Klebsiella* الالتهاب الرئوي ..) والفطريات (المبيضات البيضاء ، الرشاشيات ، الفيوزاريوم...) مع اختلاف حسب السلالات المختبرة. وتؤكد هذه النتائج أيضاً على الدور المهم للمستقلبات الثانوية (البوليفينول) في الدفاع البيولوجي لمضادات الميكروبات.

الكلمات المفتاحية: أوراق الزيتون *Olea europea* ، flavonoïde ، polyphénol ، نشاط مضاد للفطريات ، نشاط مضاد للجراثيم .

Résumé

Olea europea est une plante médicinale appartenant à la famille des Oléacées, est très répandue dans le centre algérien. C'est une plante très utilisée en médecine traditionnelle pour ses nombreuses vertus.

Selon les résultats des travaux analysés la valorisation des feuilles de la plante *Olea europea* passe par les étapes suivantes : une extraction par macération avec des différent solvants organiques (méthanol , chloroforme), le rendement le plus élève a été obtenu avec l'extrait méthnolique. Une analyse quantitative des polyphénol et flavonoïde totaux des extrait est réalisé, montrant que l'extrait methnolique est le plus riche en poly phénol tandis que le la teneur en flavonoïde la plus élevé a été observé dans l'extrait d'acétate d'éthyle.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur souches bactériennes et les souche fongique selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. D'après les résultats obtenus montrent que l'extrait d'*Olea Europeae* inhibe la croissance des bactéries (tel que *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, et *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*...) et des champignons (*Candida albicans*, *Aspergillus*, *Fusarium*...) avec une variation selon les souches testées. Ces résultats soulignent également le rôle important des métabolites secondaires (polyphénols) dans la défense biologique antimicrobienne.

Mots clés: Les feuilles d'olivier *Olea europea*, polyphénol, flavonoïde, activité antifongique , activité antibactérienne .

Abstract

Olea europea is a medicinal plant belonging to the family Oleaceae, is widespread in central Algeria. It is a plant widely used in traditional medicine for its many virtues. According to the results of the analyzed works the valorization of the leaves of the plant *Olea europea* not se by the following stages: an extraction by maceration with different organic solvents (methanol, chloroform), the most elevated output was obtained with the extract methnolique, a quantitative analysis of the total poly phenol and flavonoïde of the extracts is carried out, showing that the extract methnolique is the richest in poly phenol while the flavonoïde the most elevated was observed in the extract of acetate of ethyl.

The antimicrobial activity was determined on bacterial and fungal strains according to the agar diffusion method. From the results obtained show that the extract of *Olea Europeae* inhibits the growth of bacteria (such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*) and fungi (*Candida albicans*, *Aspergillus*, *Fusarium*...) with a variation according to the tested strains, These results also underline the important role of secondary metabolites (polyphenols) in the biological antimicrobial defense.

Key words: Olive leaves *Olea europea*, polyphenol, flavonoid, antifungal activity, antibacterial activity.