



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

Référence / 2021

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :

REZIGUE Ichraf Sabrina et LAOUAR Abdelghani

Le: [Click here to enter a date.](#)

Synthèse bibliographique : Effet d'extrait des feuilles d'olivier sur les bactéries pathogènes

Jury :

| | | | | |
|-------|--------------------|-------|----------------------|------------|
| Titre | 1er membre du jury | Grade | Université de Biskra | Président |
| M. | HALIMI chahrazed | MCA | Université de Biskra | Rapporteur |
| Titre | 3e membre du jury | Grade | Université de Biskra | Examineur |

Année universitaire : 2020 – 2021

Remerciement

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

Nous adressons d'abord nos sincères remerciements à l'anonyme pour l'honneur qu'il nous fait d'être président.

Nous exprimons nos vifs remerciements à l'anonyme d'avoir accepté d'examiner ce travail. Nous exprimons nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à Mme Halimi chahrazed pour nous avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ainsi qu'à ses qualités relationnelles et humain

Table des matières

| | |
|------------------------------------|------------|
| Liste des tableaux..... | I |
| Liste des figures..... | II |
| Liste des abréviations..... | III |
| Introduction générale..... | 1 |

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur l'olivier

| | |
|---|-----------|
| 1. L'olivier..... | 3 |
| 1.1. Historique..... | 4 |
| 1.2. Description botanique..... | 4 |
| 1.3. Classification et systématique..... | 6 |
| 1.4. L'olivier dans le monde..... | 7 |
| 1.5. L'olivier en Algérie..... | 7 |
| 2. Feuilles d'olivier..... | 9 |
| 2.1. Caractéristiques physiques et chimiques des feuilles d'olivier..... | 10 |
| 2.1.1. Métabolites primaires..... | 10 |
| 2.1.2. Métabolites secondaires..... | 11 |
| 2.2. Utilisations pharmacologiques..... | 12 |

Chapitre 2 : Les composés phénoliques des feuilles d'olivier

| | |
|--|-----------|
| 1. Composés phénoliques..... | 13 |
| 2. Classification des composés phénoliques..... | 14 |
| 2.1. Les acides phénoliques..... | 15 |
| 2.2. Les tannins..... | 15 |
| 2.3. Les flavonoids..... | 15 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Biosynthèse des composés phénoliques..... | 16 |
| 3.1. La voie de Shikimate..... | 16 |
| 3.2. La voie de l'acide malonique..... | 16 |
| 4. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques..... | 17 |
| 5. Profil bioactif des feuilles d'olivier..... | 18 |

Partie expérimentale

Chapitre 3 : matériel et méthodes

| | |
|--|-----------|
| 1. Méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques..... | 20 |
| 1.1. Techniques d'extraction conventionnelles..... | 20 |
| 1.1.1. L'extraction solide-liquide (SLE)..... | 20 |
| 1.1.2. L'extraction liquide-liquide (LLE) | 20 |
| 1.2. Techniques d'extraction avancées..... | 21 |
| 1.2.1. Extraction assistée par ultrasons..... | 21 |
| 1.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (MAE) | 21 |
| 1.2.3. Extraction liquide sous pression (PLE) | 22 |
| 1.2.4. Extraction de fluide supercritique (SFE) | 22 |
| 2. Méthodes d'identification et de quantification des composés phénoliques..... | 23 |
| 2.1. Méthode colorimétrique..... | 23 |
| 2.2. Méthodes chromatographiques..... | 23 |
| 2.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN) | 23 |
| 2.4. Méthodes couplées..... | 24 |

Chapitre 4 : Résultats et discussion

| | |
|--|-----------|
| 1. Activité antibactérienne..... | 25 |
| 2. Principales substances antimicrobiennes..... | 25 |

| | |
|---|----|
| 2.1. Antibiotiques..... | 25 |
| 2.2. Composés phénoliques..... | 25 |
| 3. Détermination de l'activité antibactérienne..... | 25 |
| 3.1. Méthode de contact direct (Bourgeois et Leveau, 1980) | 25 |
| 3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice..... | 27 |
| 3.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) | 27 |
| 4. Mécanisme d'action antimicrobien..... | 28 |
| 5. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'olive..... | 29 |
| 5.1. Effet antibactérien des extraits aqueux de feuilles d'olive..... | 29 |
| 5.2. Spectre d'activité antibactérienne des extraits phénoliques..... | 30 |
| 5.3. Efficacité antimicrobienne des extraits phénoliques..... | 31 |
| 5.4. Effets synergiques des composés phénoliques individuels et combinés de l'extrait de feuilles d'olivier..... | 34 |
| 5.5. Effet de la méthode d'extraction sur l'activité antibactérienne des extraits phénoliques..... | 35 |
| Conclusion Générale..... | 38 |
| Bibliographie..... | 39 |
| Résumé | |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----------|
| Tableau 1 : Composition chimique global des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g) selon plusieurs auteurs..... | 11 |
| Tableau 2 : Classification des composés phénoliques..... | 14 |
| Tableau 3 : Activité antibactérienne des extraits aqueux de feuilles d'olive à différentes concentrations..... | 29 |
| Tableau 4 : Taux de croissance microbienne en présence de différentes concentrations d'extraits de feuilles d'olivier et valeurs IC ₂₅ | 31 |
| Tableau 5 : Activité Antibactérienne de l'extrait brut aqueux et des polyphénols des feuilles d'olivier (Méthode de diffusion sur gélose), exprimée en diamètre d'inhibition (mm) (Moyenne écart type)..... | 32 |
| Tableau 6: Les Concentrations minimales inhibitrices exprimées en pourcentage (v/v)..... | 33 |
| Tableau 7: Activités antimicrobiennes de l'oleuropéine, de rutine, de la vanilline, de l'acide caféique et de leur mélange en extrait de feuille d'olive..... | 34 |
| Tableau 8: Activité antibactérienne des feuilles d'olives extraits à différentes concentrations (Diamètre de la zone d'inhibition en mm)..... | 36 |

Liste des figures

| | |
|--|-----------|
| Figure 1 : L'arbre de l'olivier..... | 3 |
| Figure 2 : Les principales parties d'un Olivier..... | 6 |
| Figure 3 : Aires de répartition des oliviers au monde..... | 7 |
| Figure 4 : Carte oléicole d'Algérie..... | 9 |
| Figure 5 : Formules brute et chimique d'une fonction phenol..... | 14 |
| Figure 6 : Structure générale des flavonoides..... | 16 |
| Figure 7 : Biosynthèse des composés phénoliques les plus largement distribués par la voie de shikimate. PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnmate 4-hydroxylase | 17 |
| Figure 8 : Exemples de polyphénols dans l'olivier. Glc-Glucose ; Rut-Rutinose..... | 18 |
| Figure 9 : Détermination de l'activité antibactérienne par méthode de contact direct..... | 26 |
| Figure 10 : Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérés comme sites d'action pour les composés naturels..... | 28 |
| Figure 11 : Effet inhibiteur des extraits d'olivier vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Enteritidis</i> et <i>S. aureus</i> | 32 |
| Figure 12 : Activité antibactérienne du meilleur extrait obtenu par macération en deux étapes avec de l'éthanol suivie de l'eau des feuilles séchées contre la bactérie <i>Escherichia coli</i> | 35 |

Liste des abréviations

MS : Matière sèche

MAT : Matière azoté totale

MG : Matière grasse

CP : Composé phénolique

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

UV-VIS : Ultraviolet visible

SLE : Extraction solide -liquide

LLE : Extraction liquide-liquide

EAU : Extraction assistée par ultrason

MAU : Extraction assistée par micro -ondes

PLE : Extraction liquide sous pression

SFE : Extraction des fluides supercritique

EL : Extraction liquide

CO₂ : Dioxyde de carbone

UV : Ultraviolet

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

CG : Chromatographie en phase gazeuse

MS : Spectroscopie de masse

LC : Chromatographie en phase liquide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

OLE : Extrait de feuille d'olive

IC₂₅ : Concentration inhibitrice

MCF : Concentration minimale de champignons

Introduction générale

Introduction générale

L'olivier est considéré comme une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques. Certains composés identifiés dans les extraits de feuilles, tels que les composés phénoliques présentent des activités biologiques importantes (**Özcan Matthäus et al., 2017**).

L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques (DJENANE *et al.*, 2012). Par ailleurs, les feuilles d'olivier sont connues par leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine, due à leurs richesses en composés phénoliques, notamment l'oleuropéine (**Özcan Matthäus et al., 2017**). Ces composés possèdent entre autres un large éventail d'activités biologiques : antioxydante (DEKANSKI *et al.*, 2011), antivirale (MICOL *et al.*, 2005), antimicrobienne (LEE et LEE, 2010 ; SUSALIT *et al.*, 2011) qui les rendent très importants pour les domaines de la santé publique et l'industrie agroalimentaire.

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

Les feuilles d'olive sont généralement brûlées ou broyées avec le reste des produits d'élagage d'oliviers, c'est-à-dire des branches (**Romero-García Niño et al., 2014**) et sont ensuite jetées directement comme sous-produits, causant potentiellement des dommages environnementaux et gaspillant une ressource (**Xie Huang et al., 2015**).

Par conséquent, la valorisation de ce sous-produit est nécessaire puisque, dans de nombreux cas, les sous-produits gaspillés peuvent produire un contenu similaire, voire plus élevé, de composés bioactifs que le produit final (**Ayala-Zavala Vega-Vega et al., 2011**). Par conséquent, ces composés bioactifs peuvent être utilisés comme une source importante pour produire des nutraceutiques ou être inclus dans les aliments fonctionnels grâce à leurs avantages potentiels pour la santé.

Des extraits de feuilles d'olive ont été récemment commercialisés comme produits diététiques. Des produits commerciaux sous forme de tisanes ou de compléments alimentaires sont disponibles dans le monde entier, sous forme de feuilles séchées complètes, de poudre, d'extraits ou de comprimés (**Tsimidou et Papoti, 2010**).

Dans ce contexte général, l'objectif de notre travail est de montrer l'effet des extraits des feuilles d'olivier sur les bactéries pathogènes en réalisant une synthèse bibliographique.

Pour ce faire, notre mémoire est composé de trois chapitres, le premier chapitre présente l'olivier, le deuxième traite les composés phénoliques des feuilles d'olivier et le troisième chapitre se focalise principalement sur l'effet d'extrait des feuilles d'olivier sur les bactéries pathogène.

Partie bibliographique

Chapitre 1

Généralités sur l'olivier

1. L'olivier

Olive (*Olea europaea* L.) est la principale espèce cultivée appartenant à la famille monophylétique d'oléaceae, qui contient 30 genres et 600 espèces (Figure1). Les régions tempérées et tropicales de Malaisie et d'Asie sont les meilleures zones de croissance des olives. Le nom de genre *Olea* vient du mot grec « élasia », mais il est connu par 80 noms différents. Le genre *Olea* contient environ 30 à 35 espèces et est distribué en Asie, en Afrique, en Europe et en Océanie. *O. europaea* L. est la seule espèce comestible du genre *Olea*.

Le bassin méditerranéen est une région traditionnelle pour la culture de l'olivier, contenant 95% du total des vergers d'oliviers présents dans le monde. Les feuilles d'olivier (*O. europaea* L.) ont été largement utilisées dans les médicaments traditionnels comme extraits, tisanes et poudre dans les pays méditerranéens et européens.

Différents cultivars peuvent être distingués les uns des autres par la couleur et la forme drupe, la composition d'huile, la morphologie des feuilles et la phénologie. Les principaux points descriptifs correspondent à 42 caractéristiques de la morphologie des fruits, des feuilles et des pierres pour leur identification. Les cultivars d'olive peuvent être utilisés à des fins alimentaires ou pour la production d'huile. L'olive est une espèce à croissance lente et extrêmement longue, avec une espérance de vie allant jusqu'à 1000 ans (Mushtaq *et al.*, 2020).



Figure 1 : L'arbre de l'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. La culture de l'olivier prend son origine de la frontière Irano-Syrienne (Nora *et al.*, 2012).

Dans la culture arabo-musulmane, l'olivier est un arbre particulier. Il fait partie des arbres cités dans le coran et à ce titre, il est l'objet d'un respect d'autant plus que ses vertus déjà signalées dans le coran sont approuvées par des études scientifiques (Bardoulat, 2004).

L'origine de l'olivier se perd dans la nuit des temps, son histoire se confond avec des civilisations qui ont vu le jour autour de bassin méditerranéen, et ont pendant longtemps régi les destinées de l'humanité et marqué de leur empreintes la culture occidentale (De Coi, 2000).

1.2. Description botanique

L'olivier est une espèce à une croissance lente, tolérante au stress de la sécheresse et à une durée de vie extrêmement longue d'environ 500 ans, persistantes dans la région méditerranéenne, où sa croissance est rythmée dans les régions tempérées qui permettent le développement dans différentes conditions environnementales caractérisées par son tronc, par son pouvoir de développer la croissance latérale et par le fait que ses racines sont difficiles à détruire (Benguendouz, 2019).

C'est un arbre polymorphe c'est à dire qu'a une déférence entre les feuilles du stade juvénile celles du stade adulte, de taille moyenne. Au tronc noueux, très rameux, à l'écorce brune crevassée, au bois dur et dense, a une grandeur moyenne peut éteindre à une hauteur de 15 jusqu'à 20 mètres, et vivre très longtemps. Il s'adapte aux conditions parfaitement : d'un climat subtropical sec, hivers doux, automnes au printemps pluvieux, étés chauds et secs, une grande luminosité et la température comprise entre 13 et 22 °C (Selaimia, 2018).

L'olivier se caractérise par le système aérien suivant (Figure 2) :

- **Feuilles:** sont simples, entières, à pétiole court et à limbe lancéolé qui se termine par un mucron, elles sont petite taille (3 à 8 cm de long et de 1 à 2,5 cm de large). Les feuilles sont opposées et persistantes, leur durée de vie est de l'ordre de 3 ans (Benguendouz, 2019). Elles possèdent des caractères nettement xérophytiques (épiderme supérieur fortement cuisiné et

épiderme inférieur recouverts de poils) (Gharabi, 2018). La structure des feuilles rend l'olivier plus résistant au manque de pluie et à l'évaporation, offrant ainsi un potentiel de plantation réussie et économique dans les zones où les précipitations annuelles moyennes ne dépassent pas 200 à 400 mm (Wiesman, 2009).

- **Tronc** : le tronc est jaunâtre puis passe à la brune très claire. Il présente un diamètre irrégulier (jusqu'à 2 m de diamètre) avec une forme qui évolue d'une manière dynamique selon le degré de développement. Il est très dur, compacte, court, et port des branches, assez grosses, tortueuses, et lisse. Sa structure se varie selon les variétés et les conditions de milieu (Chafaa, 2013).

- **Les fleurs** : les fleurs sont regroupées en petites grappes dressées (3 à 5 mm) à l'aisselle des feuilles. La fleur est constituée de 4 sépales, 4 pétales, 2 étamines et 2 carpelles (Gharabi, 2018). Elles sont hermaphrodites c'est-à-dire constitué des organes masculins et féminins (deux étamines + un pistil) (Labdaoui, 2017). Les fleurs d'olivier sont groupées en inflorescence en grappes (de 10 à 40 fleurs). La longueur du stade de floraison de l'olivier se situe entre avril et juin, selon les conditions climatiques dominantes. La floraison se produit lorsque la température météorologique est établie à une température supérieure à 20 °C (Wiesman, 2009).

- **Fruits** : le fruit de l'olivier est une drupe sphérique qui change généralement de couleur du vert au violet ou presque noir, lorsqu'elle est complètement mûre, à mésocarpe charnu, indéhiscente, à noyau (Chafaa, 2013). La pulpe dense (représente 80% du poids total du fruit), la forme est allongée, ovale et évolue selon les variétés (1 à 4 cm de longueur et de 0.60 à 2 cm de diamètre), dont l'huile est un composant essentiel de plante. Riche en acides gras insaturés, en vitamine E et en polyphénols. Alors, un arbre produit en moyenne 15 à 50 kg d'olives, il peut donner 3 à 10 l d'huile d'olive selon les variétés (Boulkroune, 2018).

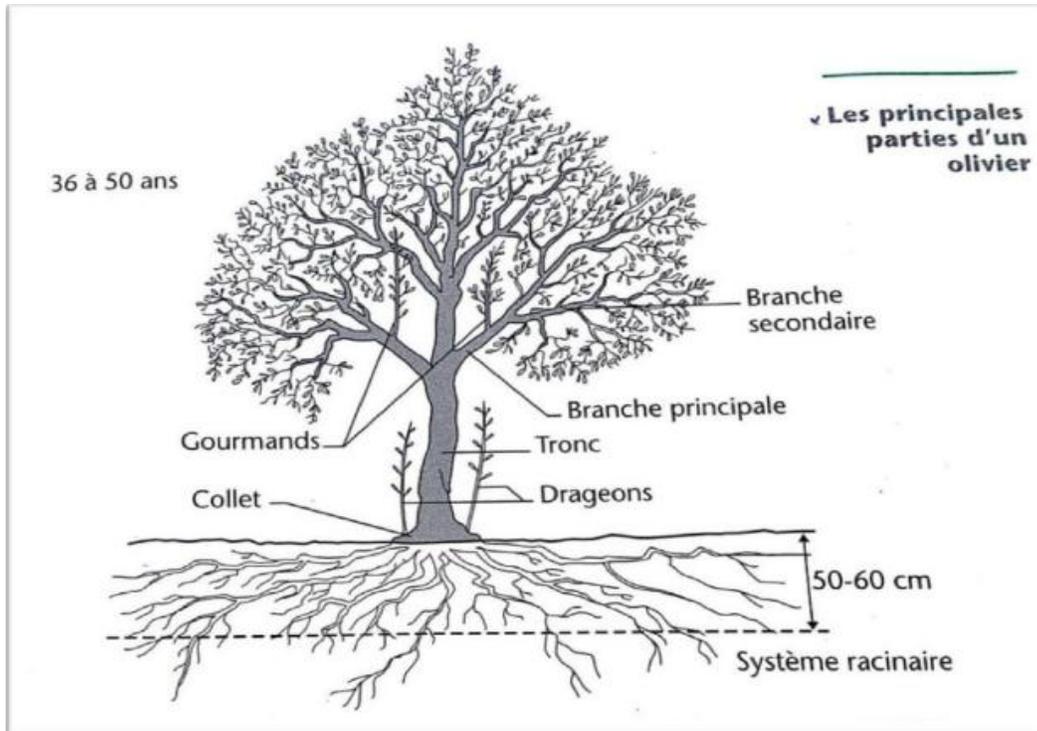


Figure 2 : Les principales parties d'un olivier (Argenson, 1999).

1.3. Classification et systématique

Selon le système de classification de l'origine botanique, l'olivier appartient à la famille des Oléacées qui est constitué de 29 genres et environ 600 espèces. On distingue deux sous-espèces, l'olivier cultivé ou olivier commun (*Olea europaea sativa.*) et l'olivier sauvage Ou oléastre (*Olea europaea sylvestris.*) (Bayram *et al.*, 2020). La classification botanique de l'olivier selon Gharabi (2018) est la suivante :

| | |
|-----------------------------|-------------------------|
| Embranchement : | Spermaphytes |
| Sous embranchement : | Angiospermes |
| Classe : | Dicotylédones |
| Sous classe : | Gamopétales |
| Ordre : | Ligustrales |
| Famille : | Oleacées |
| Sous famille : | Oleoidées |
| Genre : | Olea |
| Espèce : | <i>Olea europaea</i> L. |

1.4. L'olivier dans le monde

L'olivier est cultivé dans toutes les régions tropicales et tempérées ou chaudes du monde qui se situent entre les latitudes 30° et 45° des deux hémisphères (Breton *et al.*, 2006). En Amériques (Californie, Mexique, Brésil, Argentine, Chili), en Australie et jusqu'en Chine, en passant par le Japon et l'Afrique du Sud (Figure 3). La superficie oléicole mondiale est environ 11,2 millions d'hectares avec environ 1,5 milliards d'oliviers (Bouras, 2015).

Sur les 830 millions d'oliviers cultivés à travers le monde, 90% se distribuent dans les régions côtières du bassin méditerranéen et concernent essentiellement des pays de l'Union européenne. En Afrique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Tunisie, Maroc, Algérie, Libye, Egypte, Afrique du Sud et Angola (Aouidi, 2012). L'implantation actuelle est située dans les pays autour de la Méditerranée (Sawadogo-Lingani, 2010).

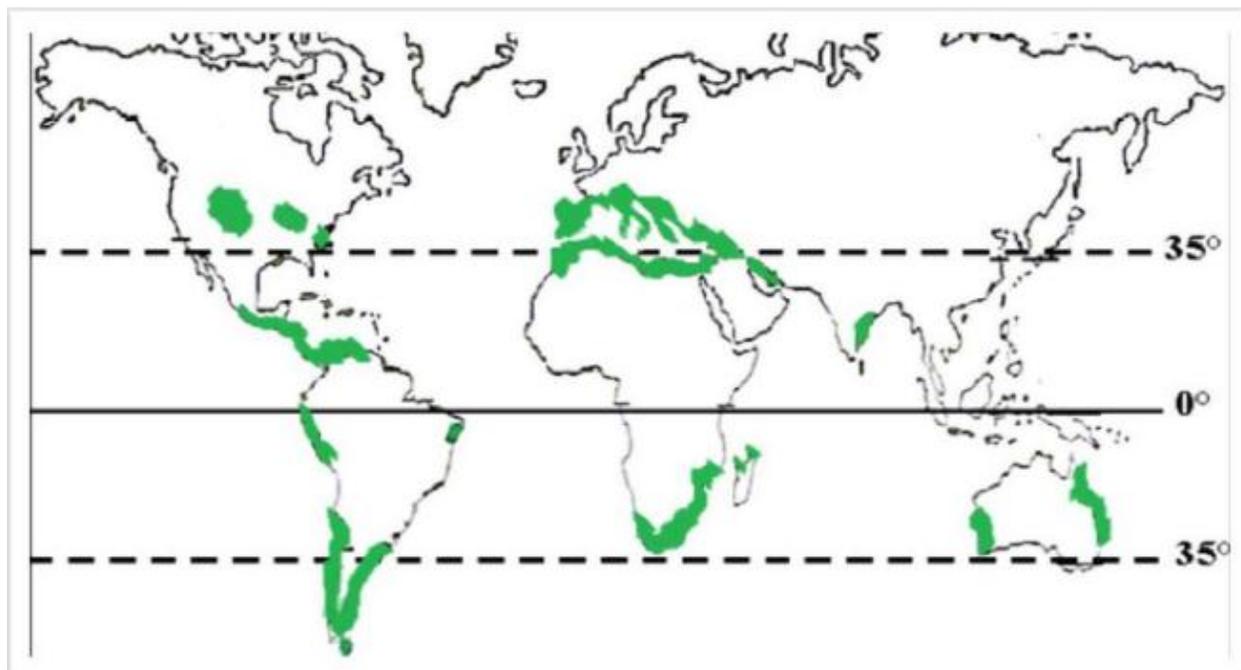


Figure 3 : Aires de répartition des oliviers au monde (Bouras, 2015).

1.5. L'olivier en Algérie

Comme dans la plupart des autres pays méditerranéens, l'olivier constitue l'une des principales espèces fruitières plantées en Algérie. Elle couvre une superficie de 350 000 ha avec 23 millions d'arbres, soit plus de 50 % du patrimoine arboricole national (Missat, 2015).

L'olivier est principalement cultivé sur les zones côtières du pays à une distance de 8 à 100 km de la mer où il trouve les conditions favorables pour son développement. Il occupait, en 2009,

une superficie de 310 000 hectares qui se répartie sur tout le territoire comme le montre la figure 4. La majorité des surfaces oléicoles se localisent dans des régions de montagne et les collines recouvrant une surface de 195 000 hectares, ainsi que dans les plaines occidentales du pays et dans les vallées comme la Soummam (ITAF, 2008).

Cette superficie a bien nettement augmenté par la mise en place d'un programme national pour le développement de l'oléiculture intensive dans les zones steppiques, présahariennes et sahariennes en vue d'augmenter les productions et de minimiser les importations.

L'Algérie dispose d'importantes ressources d'olives qui ne sont pas valorisées. Les espèces d'*Olea europea* occupent jusqu'à 2,3 % de la surface totale cultivée de l'Algérie. L'oléiculture algérienne est divisée en 3 zones : Ouest, centre de vastes zones non cultivées sont occupées par l'oleaster à Béjaïa (centre-est) (Bouarroudj *et al.*, 2016). La densité moyenne en région de Nord-Est est de 50 à 70 arbres par hectare (Labdaoui, 2017).

D'après (Boukhari, 2014), les principales variétés d'olive cultivées en Algérie sont :

-Chemlal : C'est la variété la plus dominante en Algérie, elle représente près de 45% du patrimoine oléicole nationale.

-Sigoise : C'est une variété auto-fertile, elle représente 20% du verger oléicole national.

Généralement, elle se localise à l'Ouest du pays allant de Oued Rhiou jusqu'à Tlemcen.

-Azeradj et Bouchouk : Elles accompagnent généralement les peuplements de Chemlal dont Azeradj améliore la pollinisation. Elles présentent un gros fruit destiné à la conserverie et même à la production d'huile.

-Limli: représente 8% du verger oléicole national, elle se rencontre dans la région d'Oued Soummam.

-Rougette de Mitidja : C'est une variété à huile installée dans la plaine de Mitidja et sur le piémont de l'Atlas, à faible altitude.

-Rougette de Guelma et blanquette de Guelma : Elles se trouvent en association dans la région Est du pays.

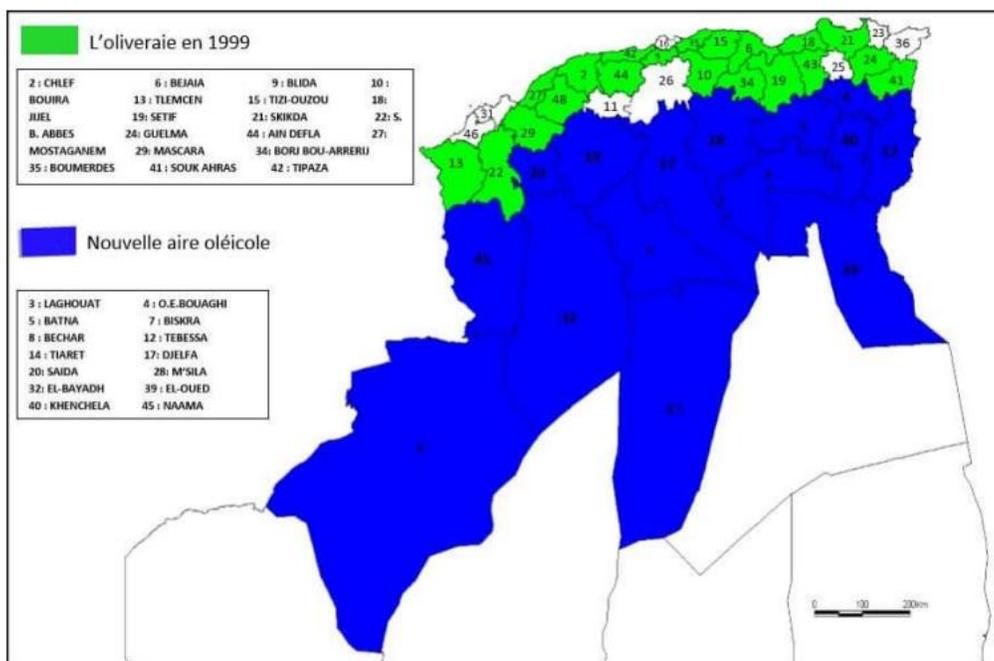


Figure 4 : Carte oléicole d'Algérie (ITAF, 2006).

2. Feuilles d'olivier

L'olivier (*Olea europaea* L.) est l'un des arbres fruitiers les plus importants des pays méditerranéens. Bien que les feuilles d'olivier soient toujours utilisées comme aliments pour animaux, leur utilisation comme matière précieuse dans divers champs suscite un intérêt croissant. Elles sont considérées comme une matière première bon marché qui peut être utilisée comme une bonne source de bioactifs et elles sont également l'un des sous-produits de la production d'huile d'olive, représentant 10% du poids des olives récoltés (Bouarroudj *et al.*, 2016).

Les feuilles d'olive, déchets agricoles obtenus lors de la récolte ou de la transformation des fruits d'olive, se trouvent en grande quantité dans les industries de l'huile d'olive et de la table d'olive, où elles sont séparées des olives à l'aide de systèmes de séparation pneumatique et créent un résidu sans intérêt industriel. Cependant, d'un point de vue économique, comme résidus industriels provenant de matériaux végétaux, les feuilles d'olive sont une excellente source de phytochimiques. Les feuilles d'olive contiennent des quantités importantes de composés précieux tels que les composés phénoliques et flavonoïdes, qui ont suscité un intérêt considérable en raison de leur utilisation potentielle comme additifs alimentaires et/ou nutraceutiques dans les industries alimentaire et pharmaceutique.

La quantité de feuilles d'olive qui s'accumulent annuellement de ces industries peut dépasser 1 million de tonnes. Par conséquent, ce résidu de l'industrie oléicole peut présenter de l'intérêt dans un contexte de bioraffinerie. En outre, il vaut la peine de récupérer des composés à haute valeur ajoutée de ce matériau, car ces composés peuvent présenter un grand intérêt pour les secteurs pharmaceutique, alimentaire et cosmétique, en raison de la tendance de l'utilisation de produits naturels au lieu de synthétiques (**Irakli et al., 2018**).

Les feuilles d'olive sont riches en une grande variété de composés phénoliques comme les secoiridoïdes (oléuropéine, ligstroside, diméthylloleuropeine) et les flavonoïdes (apigénine, luteoline, luolin-7-O-glucoside, etc.), avec autres composés phénoliques (hydroxytyrosol, tyrosol, acide caféique, ferulique, etc.) .qui sont responsables de plusieurs propriétés biologiques, y compris antioxydant et anti-inflammatoire, antimicrobien, antiviral, anti-cancérogène, ainsi que des effets cardiovasculaires bénéfiques.

Toutefois, le profil phénolique des feuilles d'olive varie en fonction de l'origine et de la variété du matériel végétal, de l'emplacement géographique et des conditions agro-écologiques, et en particulier des saisons (**Bouarroudj et al., 2016**).

2.1. Caractéristiques physiques et chimiques des feuilles d'olivier

La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs tels que la variété, les conditions climatiques, l'époque de prélèvement, la proportion de bois, l'âge des plantations, etc.). Généralement, la matière sèche (MS) des feuilles vertes se situe autour de 50 à 58%, celle des feuilles sèches autour de 90%. La teneur en matières azotées totales (MAT) des feuilles varie de 9 à 13%, alors que les rameaux ne dépassent pas 5 à 6%. La solubilité de l'azote est faible, elle se situe entre 8 et 14%, selon la proportion de bois. La teneur en matières grasses (MG) est supérieure à celle des fourrages et oscille autour de 5 à 7%, mais celle des constituants pariétaux et en particulier de la lignine est constamment élevée (18 à 20%) (Aouidi, 2012).

2.1.1. Métabolites primaires

Ce sont des composés issus du métabolisme primaire, par la voie du cycle de Calvin, qui est commun pour toutes les plantes. Ces métabolites tels que les acides aminés, les hydrates de carbone, les lipides, les protéines et les acides nucléiques qui sont nécessaires à la survie de la plante (**Moussi et al., 2015**).

Tableau 1 : Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g)
selon plusieurs auteurs

| Composition | Boudhrioua <i>et al.</i> , 2009 | Erbay et Icier, 2010 | Martin- Garcia <i>et al.</i> , 2006 | Garcia- Gomez <i>et</i> <i>al.</i> , 2003 | Fegeros <i>et</i> <i>al.</i> , 1995 |
|---------------------------|------------------------------------|-------------------------|---|---|--|
| Eau | 46.2-49.7 a | 49.8 a | 41.4 a | Nd | 44 a |
| Protéines | 5-7.6 a | 5.4 a | 7 b | Nd | Nd |
| Lipides | 1-1.3 a | 6.5 a | 3.2 b | 6.2 b | Nd |
| Minéraux | 2.8-4.4 a | 3.6 a | 16.2 b | 26.6 b | 9.2 b |
| Carbohydrates | 37.1-42.5 a | 27.5 a | Nd | Nd | Nd |
| Fibres brutes | Nd | 7 a | Nd | Nd | 18 b |
| Celluloses | Nd | Nd | Nd | 19.3 b | 11.4 b |
| Hémicellulose | Nd | Nd | Nd | 25.4 b | 13.3 b |
| Lignin | Nd | Nd | Nd | 30.4 b | 14.2 b |
| Polyphénols totaux | 1.3-2.3 b | Nd | 2.5 b | Nd | Nd |
| Tannins solubles | Nd | Nd | Nd | Nd | 0.3 b |
| Tannins condensés | Nd | Nd | 0.8 b | Nd | 1 b |

a : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse fraîche des feuilles d'olivier.

b : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier.

Nd : valeur non déterminée

2.1.2. Métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes (**Krief, 2003**). La feuille d'olivier contient surtout des pigments flavoniques, de

la choline et d'abondants composés phénoliques tels que : l'hydroxytyrosol, le verbascoside, apigenin-7-glucoside, lutéolin-7-glucoside et en particulier l'oleuropéine (**Hayes *et al.*, 2011**).

2.2. Utilisations pharmacologiques

Les feuilles d'olivier peuvent être trouvées en grandes quantités comme résidu dans les industries de l'huile d'olive. Ils étaient utilisés en médecine par les anciens pour désinfecter les blessures cutanées (Breton *et al.*, 2006).

Cependant, les suppléments de feuilles d'olivier sont sur le marché depuis quelques années en raison de leurs effets bénéfiques sur le métabolisme lorsqu'elles sont utilisées comme médicament traditionnel à base de plantes contre les infections virales et bactériennes, Champignon et levure (Farhi, 2009).

Les feuilles d'olivier sont utilisées pour les maladies de l'estomac et des intestins, la diarrhée et pour traiter les infections des voies urinaires (El Hafian *et al.*, 2014). Aussi pour traiter l'hypertension artérielle (hypertension), pour induire la miction (diurèse), l'asthme bronchique. Les feuilles d'olivier sont bien connues pour ces propriétés, elles sont attribuées aux composés phénoliques des feuilles d'olivier (Özcan et Matthäus, 2017).

Plusieurs rapports ont montré que l'extrait de feuille d'olivier a la capacité d'abaisser la tension artérielle des animaux et d'augmenter le flux sanguin dans les artères coronaires, de soulager l'arythmie et de prévenir les spasmes musculaires intestinaux (Özcan et Matthäus, 2017).

Chapitre 2

Composés phénoliques des feuilles d'olivier

1. Composés phénoliques

Les polyphénols constituent l'un des groupes de produits naturels les plus nombreux et largement distribués dans le royaume végétal. Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, dont plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Bien que les polyphénols soient caractérisés chimiquement comme composés avec des caractéristiques structurales phénoliques, ce groupe de produits naturels est très diversifié et contient plusieurs sous-groupes de composés phénoliques.

La diversité et la large distribution des polyphénols dans les plantes ont conduit à différentes façons de catégoriser ces composés naturels.

Les polyphénols ont été classés par leur source d'origine, leur fonction biologique et leur structure chimique. En outre, la majorité des polyphénols dans les plantes existent comme glycosides avec différentes unités de sucre et sucres acylés à différentes positions des squelettes de polyphénols (Tsao, 2010).

Les phénols végétaux distingués par le nombre d'atomes de carbone constitutifs en conjonction avec la structure du squelette phénolique de base. Les plus répandus et les plus divers des phénoliques sont les flavonoïdes qui sont construits sur un squelette de flavone C6-C3-C6 dans lequel le pont à trois carbones entre les groupes de phényle est généralement cyclique avec de l'oxygène.

D'un point de vue biologique, ces composés phénoliques sont définis comme des métabolites secondaires dans l'olivier, et ont une contribution importante dans la plante la protection et la résistance contre les agents pathogènes fongiques, qui peuvent être d'une importance cruciale pour la culture durable de l'olivier (Aouidi, 2012).

Les phénols sont des composés qui ont un ou plusieurs groupes d'hydroxyle attachés directement à un anneau aromatique. Le phénol est la structure sur laquelle l'ensemble du groupe est basé. L'anneau aromatique dans ce cas est, bien sûr, le benzène.

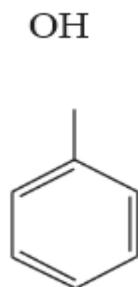


Figure 5 : Formules brute et chimique d'une fonction phénol

Les phénols sont à bien des égards similaires aux alcools des structures aliphatiques où le groupe hydroxyle est attaché à une chaîne de carbones. Le groupe phénolique hydroxyle, cependant, est influencé par la présence de l'anneau aromatique. En raison de l'anneau aromatique, l'hydrogène de l'hydroxyle phénolique est labile, ce qui rend les phénols des acides faibles (**Falleh et al., 2008**).

2. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient. On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes (**Boros et al., 2010**), ou sous forme conjuguée à l'ester ou hétérosides (Macheix *et al.*, 2006). Les différentes classes de ces composés phénoliques et les plantes qui les renferment sont représentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Classification des composés phénoliques (Aouidi, 2012).

| Structure | Classe |
|-----------|---|
| C6 | Phénols simples |
| C6-C1 | Acides phénoliques |
| C6-C2 | Acétophénones et acides phényle acétiques |
| C6-C3 | Acides cinnamiques, aldéhydes cinnamyl, alcools cinnamyl, coumarins, isocoumarins et chromones |
| C15 | Chalcones, aurones, dihydrochalcones, flavans, flavones, flavanones, flavanonols, anthocyanidins, anthocyanins, |
| C30 | Biflavonyls |

La plupart des composés phénoliques sont présents conjugués avec un mono ou polysaccharides, liés à un ou plusieurs groupes phénols, et peut être aussi des dérivations fonctionnelles comme des esters et des méthyles esters. Plusieurs classes de ces composés ont été catégorisées selon leur squelette de base (Tableau 2). On distingue trois principales classes :

- les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinamiques);
- les flavonoïdes;
- les tannins et lignanes, ainsi que les coumarines et les stilbènes qui sont rare.

2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques non flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux principaux types, l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique basés sur les squelettes C1 – C6 et C3 – C6. Alors que les fruits et légumes contiennent de nombreux acides phénoliques libres, en grains et les graines en particulier dans le son ou la coque les acides phénoliques sont souvent sous forme liée. Ces acides phénoliques ne peuvent être libérés ou hydrolysés que par hydrolyse acide ou alcaline, ou par des enzymes (**Falleh *et al.*, 2008**).

2.2. Les tannins

Les tannins sont des molécules polyphénoliques de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les graines des plantes (Achat, 2013). Ils sont du grand intérêt pour la nutrition et la médecine à cause de leur capacité antioxydante puissante et leur effet protecteur possible sur la santé humaine (**Oszmianski *et al.*, 2007**).

La plupart des propriétés biologiques des tannins sont liées au pouvoir de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines. Les liaisons non covalentes, hydrogènes et hydrophobes participent à la formation du complexe tannins- protéine (Sereme *et al.*, 2011).

2.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont le squelette structural général C6 – C3 – C6 dans lequel les deux unités C6 (anneau A et anneau B) sont de nature phénolique (Figure 6). En raison du modèle d'hydroxylation et des variations de l'anneau chromane (anneau C), les flavonoïdes peuvent être divisés en différents sous-groupes tels que les anthocyanes, les flavan-3-ols, les flavones, les flavanones et les flavonols (D'Archivio *et al.*, 2007). Alors que la grande majorité des flavonoïdes ont un anneau B attaché à la position C2 de l'anneau C, certains flavonoïdes tels que les isoflavones

et les néoflavonoïdes, dont l'anneau B est connecté aux positions C3 et C4 de l'anneau C, respectivement, se trouvent également dans les plantes (Mohammedi, 2013). Les chalcones, bien que dépourvus de l'anneau hétérocyclique C, sont toujours classés comme membres de la famille des flavonoïdes. Ces structures de base des flavonoïdes sont des aglycones; cependant, dans les plantes, la plupart de ces composés existent sous forme de glycosides (Falleh *et al.*, 2008).

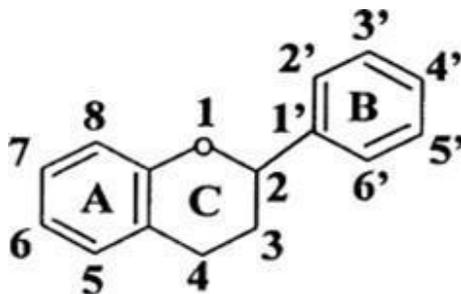


Figure 6 : Structure générale des flavonoïdes.

3. Biosynthèse des composés phénoliques

Du point de vue biosynthétique, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques : la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autres à la formation des acides phénoliques, flavonoïdes et lignines et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (Macheix *et al.*, 2006).

3.1. La voie de Shikimate

La voie de l'acide shikimique (Figure 7) est la voie la plus importante pour la biosynthèse des composés aromatiques dans les plantes et les micro-organismes, y compris les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane.

Selon Falleh *et al.* (2008), cette voie conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques, par la suite elle conduit après transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples.

3.2. La voie de l'acide malonique

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques,

obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Chira *et al.*, 2008).

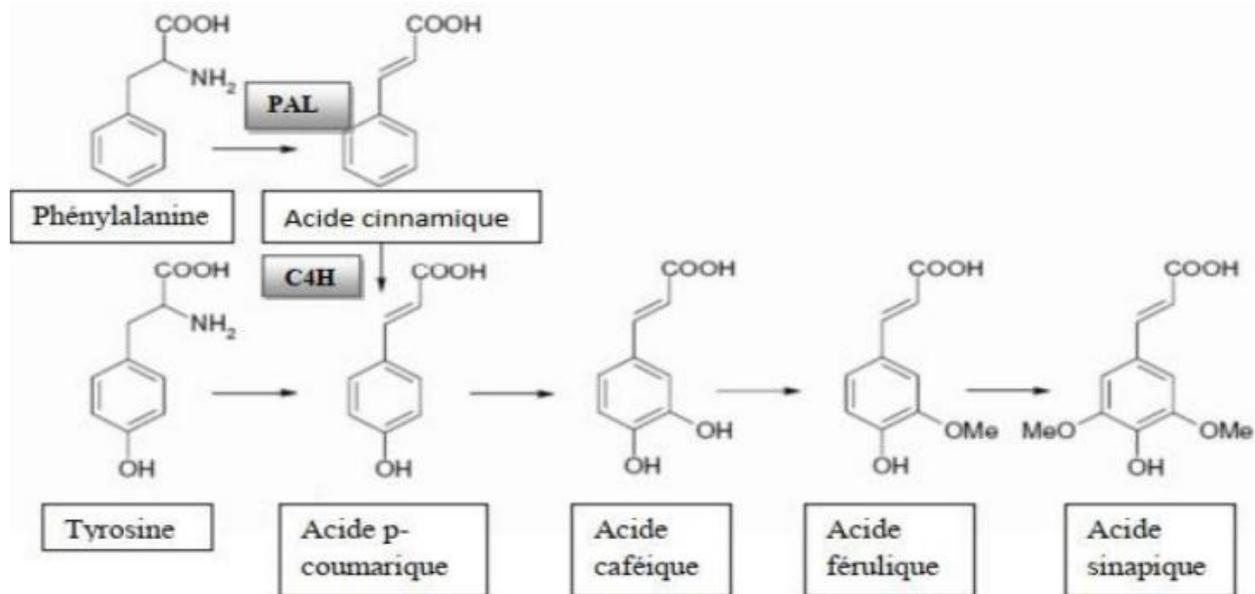


Figure 7 : Biosynthèse des composés phénoliques les plus largement distribués par la voie de shikimate. PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase (Crozier *et al.*, 2006).

4. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques

Les composés phénoliques sont pour la plupart des dérivés substitués d'acide hydroxycinnamique (forme libre phénolique) et acide hydroxybenzoïque (forme liée phénoliques) (Singh et Saldaña, 2011). Les feuilles d'olivier peuvent être considérées comme une source naturelle bon marché et facilement disponible des composés phénoliques. Le rendement théorique maximal des teneurs en polyphénols déterminée par l'essai Folin-Ciocalteu, soit 250,2 mg d'acide gallique par 100 g de poids sec d'extrait de feuilles d'olivier (Sivakumaran *et al.*, 2004). Il varie entre 2,8 et 44,3 mg/g de matière sèche (Boudhrioua *et al.*, 2009). Elle peut même dépasser les 250 mg/g de matière sèche (Mylonaki *et al.*, 2008).

Les polyphénols sont présents dans presque toutes les parties de l'olivier, mais leur nature et la concentration varient beaucoup d'un tissu à l'autre (Boussadia, et Djenoune, 2017).

Comme on peut classer les composés phénoliques en cinq groupes qui sont principalement présents dans les feuilles d'olivier : sécoiridoïdes (oleuropéine, diméthyleuropéine...ect), acide phénolique et ses dérivés (acide vanicique, acide caféique...ect), alcools phénoliques (tyrosol,

hydroxytyrozole) et flavones (lutéoline-7 - glycoside, diosmétine-7-glycoside...ect), flavonols (quercétine, isoramnetine, routine) et flavonoïdes contenant des flavanols (catéchine, galloctatine) (Bayram *et al.*, 2020).

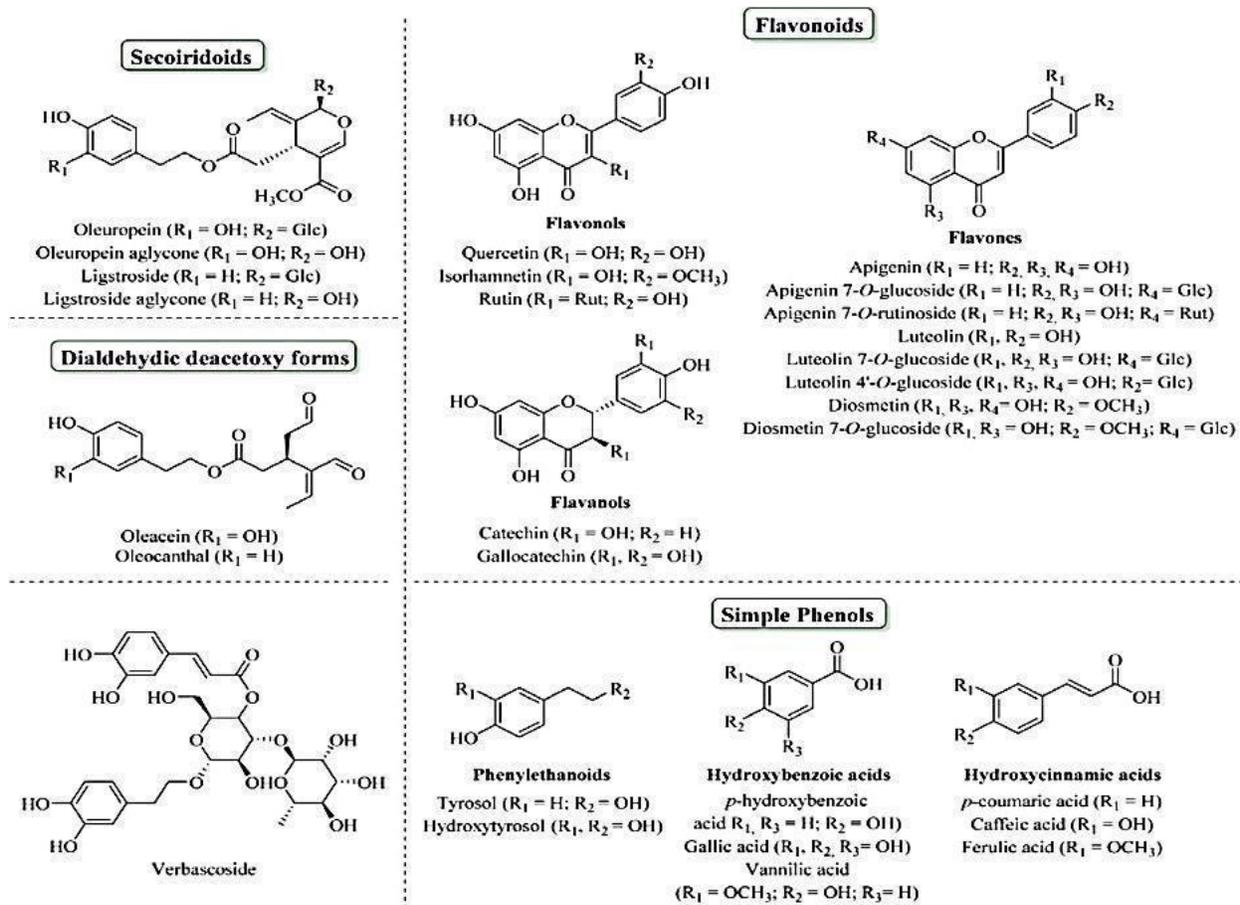


Figure 8 : Exemples de polyphénols dans l'olivier. Glc-Glucose ; Rut-Rutinose

5. Profil bioactif des feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier contiennent plusieurs composés phénoliques tels que les sécoiridoïdes (oleuropéine, ligstroside, diméthyleoleuropéine et oléoside), les flavonoïdes (apigénine, kaempférol, lutéoline) et les composés phénoliques (caféine acide, tyrosol, hydroxytyrosol). Une analyse qualitative et quantitative de la composition a été effectuée en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la photodiode. La détection par réseau a révélé six composés polyphénoliques majeurs présents dans l'extrait de la feuille d'olivier : oleuropéine (24,5 %), verbascoside (1,1%), lutéoline-7-*O*-glucoside (1,4%), apigénin-7-*O*-glucoside, hydroxytyrosol (1,5 %) et tyrosol (0,7 %) (Hayes *et al.*, 2011 ; Niaounakis et Halvadakis, 2006 ; Rafiee *et al.*, 2012).

L'huile essentielle de feuilles d'olivier est un produit très complexe, c'est un mélange contenant des aldéhydes, des cétones, des esters, des alcools, des alcènes et des alcanes. Les composants majeurs de l'huile essentielle de feuille d'olivier sont du 2-décenal-(E) (20,43 %), benzène-acétaldéhyde (4,00 %), 2-undécenal (3,71 %) et valencen (3,31 %) (**Konoz *et al.*, 2013**).

Partie expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthodes

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

L'extraction est une étape très importante pour l'isolement des polyphénols. En raison de l'énorme complexité et de la variabilité entre les composés phénoliques en termes de polarité, de structure chimique, de quantités relatives dans l'échantillon et de complexité des matrices naturelles, il n'existe pas de protocole d'extraction normalisé. Généralement, l'extraction de polyphénols à partir de plantes a été effectuée à l'aide de techniques d'extraction conventionnelles telles que l'extraction solide-liquide (SLE) et l'extraction liquide-liquide (LLE). Ces techniques sont associées à l'utilisation d'un volume élevé de solvants, de longs temps d'extraction ou d'une faible sélectivité et de la reproductibilité (**Herrero *et al.*, 2013**).

Les techniques d'extraction conventionnelles soient remplacées par des techniques d'extraction avancées, elles sont toujours les plus couramment utilisées pour récupérer les polyphénols des matrices naturelles. Les principales techniques d'extraction avancées proposées pour réaliser l'extraction des polyphénols ont été l'extraction assistée par ultrasons (EAU), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction de liquide sous pression (PLE), l'extraction de fluide supercritique (SFE)

1.1. Techniques d'extraction conventionnelles

1.1.1. L'extraction solide-liquide (SLE)

Parmi les techniques d'extraction conventionnelles, l'extraction solide-liquide est le plus utilisé pour extraire les polyphénols à partir de matrices solides. L'échantillon est mis en contact avec un solvant ou un mélange de solvants où les analytes cibles sont dissous. Les conditions optimales d'extraction des polyphénols dépendent de leur solubilité dans le solvant. Il y a beaucoup d'études liées à l'ESS de composés phénoliques de différentes matrices telles que la mangue, le sorgho et les pelures de melon (**Shaheen *et al.*, 2017**).

1.1.2. L'extraction liquide-liquide (LLE)

Lorsque l'échantillon est liquide, la technique préférée est l'extraction liquide-liquide. Cette procédure consiste à différencier la solubilité des analytes entre deux liquides immiscibles (**Ivanova-Petropulos *et al.*, 2015**). Habituellement, les échantillons liquides sont solubilisés dans l'eau (**Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015**).

Les extractions solide-liquide (SLE) ou liquide-liquide (LLE) sont effectués par agitation, chauffage et reflux à différentes températures et temps d'extraction. Différentes études ont montré

que les temps d'extraction, les températures et les solvants les plus courants dans les SLE étaient de 15 min–72h à température ambiante à 70°C en utilisant de l'eau, de l'éthanol/ l'eau et du méthanol/eau comme solvants à différents pourcentages (**Plaza *et al.*, 2018**).

Pour l'extraction liquide-liquide, l'eau et eau/acide acétique ont été utilisées pour extraire des composés phénoliques des vins, du miel et du sirop de canneberge (**Rodríguez-Pérez *et al.*, 2015**).

1.2. Techniques d'extraction avancées

1.2.1. Extraction assistée par ultrasons

Cette technique consiste en la formation de cavitations acoustiques par ultrasons, aidant à la pénétration du solvant dans la matrice, ainsi que la libération de polyphénols dus à des altérations produites dans la paroi cellulaire de la matrice par cavitation à bulles (**Corbin *et al.*, 2015**).

Les paramètres les plus importants sont la fréquence et l'intensité du rayonnement, le temps d'extraction, la température et la composition des solvants. Les ultrasons de haute intensité augmentent la pression et la température dues à la cavitation de bulle, produisant une perturbation dans la paroi cellulaire de la matrice avec la libération suivante des polyphénols. Habituellement, la puissance et la fréquence utilisées pour l'extraction des polyphénols étaient respectivement de 50 à 400 W et de 20 à 60 kHz (**Corbin *et al.*, 2015**).

1.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) a été appliquée à différentes matrices pour extraire des polyphénols (**Routray *et al.*, 2014**). Cette technique d'extraction permet une diffusion élevée des fluides car elle applique de l'énergie micro-ondes en combinaison avec une température élevée et une pression contrôlée. Elle est basée sur les interactions des molécules polaires dans les milieux par rotation dipolaire et conduction ionique induite par les micro-ondes, qui provoquent le chauffage du solvant. En ce sens, la chaleur facilite la diffusion des composés phénoliques de la matrice au solvant (**Routray *et al.*, 2014**). Pour être capable d'absorber les micro-ondes, le solvant ou la matrice doit contenir des molécules de dipôle. L'effet micro-ondes dépend grandement de la nature du solvant et de la matrice (**Flórez *et al.*, 2015**).

Les principaux avantages de l'utilisation du MAE comprennent des temps d'extraction plus courts d'environ 1 à 3 min et des volumes de solvants inférieurs à ceux des techniques d'extraction conventionnelles (**Herrero *et al.*, 2013**). En général, l'éthanol, le méthanol, l'eau, l'acétone et leurs

combinaisons sont les solvants les plus utilisés pour l'extraction des polyphénols par MAE (Moreira *et al.*, 2017).

1.2.3. Extraction liquide sous pression (PLE)

Elle est fondée sur l'application de températures suffisamment élevées (habituellement au-dessus du point d'ébullition du solvant) et sur des pressions pour maintenir le solvant d'extraction à l'état liquide (Wijngaard *et al.*, 2012). Elle est également appelée extraction de liquide pressurisé, extraction de solvants pressurisés, ou extraction accélérée de solvant. En appliquant une température élevée, le processus d'extraction devient plus efficace grâce à des taux de diffusion plus rapides, facilitant ainsi une extraction plus rapide, ce qui, avec une haute pression, améliore la diffusion dans la matrice de l'échantillon et améliore l'efficacité d'extraction par rapport à l'utilisation du même solvant à des températures ambiantes (Plaza et Rodríguez-Meizoso, 2013).

Les paramètres qui sont le plus souvent optimisés dans PLE sont la température, le solvant d'extraction, la pression, le temps et le débit. La sélection et la température des solvants peuvent être considérées comme les plus importantes. Des solvants tels que l'éthanol, l'eau et leurs mélanges, ont été utilisés pour extraire des composés phénoliques des plantes (Oniszcuk *et al.*, 2019). L'ajout d'acide formique ou acétique (1% à 5%) peut faciliter la solubilité des analytes dans le solvant et stabiliser les polyphénols (principalement les anthocyanidines). Habituellement, des températures d'extraction de 80 à 150 °C et des temps d'extraction de 1 à 160 min ont été appliqués pour extraire les composés phénoliques des plantes par PLE (Ong *et al.*, 2006). L'utilisation de températures plus élevées (>150°C) doit être soigneusement étudiée en raison de la dégradation des composés phénoliques en raison du fait qu'il s'agirait de composés thermolabiles, ainsi que de l'apparition de réactions chimiques indésirables dans la matrice de l'échantillon.

1.2.4. Extraction de fluide supercritique (SFE)

Elle peut fonctionner avec n'importe quel solvant qui est pressurisé et chauffé au-dessus de son point critique. Il existe une variété de solvants qui peuvent être utilisés dans des conditions supercritiques, mais le dioxyde de carbone (CO₂) est le plus utilisé, même pour atteindre l'extraction de polyphénols parce que le CO₂ offre plusieurs avantages. Ce solvant a un faible point critique de pression et de température (31°C et 7,3 MPa), il est non toxique, non inflammable, non explosif, et il est considéré comme un solvant de qualité alimentaire, solvant écologiquement durable, facile à obtenir, bon marché, et il permet d'obtenir un extrait sans solvant (Herrero *et al.*, 2015).

Compte tenu de la nature chimique des polyphénols, le CO₂ est incapable de les extraire en raison de sa faible polarité. Ainsi, de petites quantités (5% à 30%) des cosolvants polaires (méthanol, éthanol et mélanges d'éthanol et d'eau) sont utilisés avec le CO₂ pendant l'extraction (**Santana et Macedo, 2019**). Le type et la quantité de cosolvant est l'un des paramètres les plus importants impliqués dans l'extraction de composés phénoliques. L'éthanol a fourni le meilleur rendement d'extraction.

2. Méthodes d'identification et de quantification des composés phénoliques

2.1. Méthode colorimétrique

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

Tous les composés phénoliques des végétaux absorbent en UV (ultraviolet) et certains d'entre eux absorbent également dans le visible. Le spectre d'absorption résulte de la présence simultanée du cycle(s) benzénique (s), des fonctions hydroxyles phénoliques et des différentes doubles liaisons présentes dans la molécule. Lorsqu'un composé phénolique est très fortement majoritaire dans un matériel végétal donné, on peut alors avoir une estimation approximative rapide de la teneur du matériel à partir du spectre d'absorption (UV ou visible) (**Macheix *et al.*, 2005**).

2.2. Méthodes chromatographiques

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

2.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

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

2.4. Méthodes couplées

D'autres techniques performantes sont aussi utilisées, on peut citer, la chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS) donnent aussi des résultats très satisfaisants, le couplage de ces techniques à différents détecteurs (la détection UV à une longueur d'onde fixe, la détection à barrette de diodes, la détection fluori- métrique...) s'avère déterminant, améliore davantage leur sensibilité et leur résolution (**Saitta *et al.*, 2002**).

L'application de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) est recommandée pour l'identification de certains composés phénoliques. En effet, cette technique permet l'analyse complète de la structure, mais généralement, elle est employée pour déterminer la masse moléculaire et pour établir la distribution des substituants sur les noyaux phénoliques (**Proestos *et al.*, 2006**). Pour de nombreux auteurs, ce sont les techniques les plus adéquates pour l'étude des flavonoïdes (**Prasain *et al.*, 2004**).

Chapitre 4

Résultats et discussion

1. Activité antibactérienne

On parle d'un effet bactériostatique lorsque la substance antibactérienne empêche la multiplication des bactéries et d'un effet bactéricide lorsqu'elle détruit totalement la bactérie (Sudjana *et al.*, 2009). L'extrait de feuille d'olivier renforcerait le système immunitaire et permettrait de lutter contre de nombreux agents infectieux ; bactéries, parasites, virus et certains champignons. L'action antibactérienne dépendra du microorganisme lui-même, de l'agent antibactérien et de l'environnement où se situe l'action (Lee-Huang *et al.*, 2003).

2. Principales substances antimicrobiennes

2.1. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances d'origine naturelle, hémi-synthétiques ou synthétiques capables d'inhiber la croissance ou d'entraîner la mort des bactéries. Ils ont une activité sélective et spécifique liée à un mécanisme d'action précis (Holmström *et al.*, 2003). Ce sont les principales armes médicamenteuses les plus efficaces utilisées contre les infections bactériennes. Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (Yala *et al.*, 2001).

2.2. Composés phénoliques

Les effets antimicrobiens des phénols issus de l'olive, l'huile d'olive et les feuilles de l'olivier ont été le sujet de différentes recherches qui confirment l'effet antimicrobien des polyphénols. Il a été établi que les sécoiridoïdes (oleuropéine et ses dérivés), une des classes principales de polyphénols 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 (Farhi, 2009).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) calculées présentent une preuve d'une large activité antimicrobienne de l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine contre les souches bactériennes étudiées (Djenane *et al.*, 2012).

3. Détermination de l'activité antibactérienne

3.1. Méthode de contact direct (Bourgeois et Leveau, 1980)

Une colonie issue d'une culture jeune de chaque espèce microbienne activée préalablement sur milieu spécifique, est prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile, chacune sera ensuite

ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif, suivi d'une incubation à 37°C durant 03 heures. A partir de la dernière solution qui constitue l'inoculum de l'espèce de bactérie donnée, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique sont effectuées ; allant à 10^{-4} pour les germes étudiés.

Des prélèvements de 1 ml de chaque dernière dilution décimale sont ensuite individuellement ajoutés à 9 ml de chaque extrait des plantes testés dilué à l'eau distillée, respectivement, à raison de 0, 20, 40, 60, 80 et 100%.

Les mélanges des solutions sont enfin ensemencés en triple essais (3 boîtes de Petri) chacune en surface à raison de 0.1 ml sur le milieu spécifique de croissance pour chaque espèce microbienne. La lecture du nombre de colonies développé est effectuée après incubation des milieux ensemencés à 37°C pendant 24 à 72 heures.

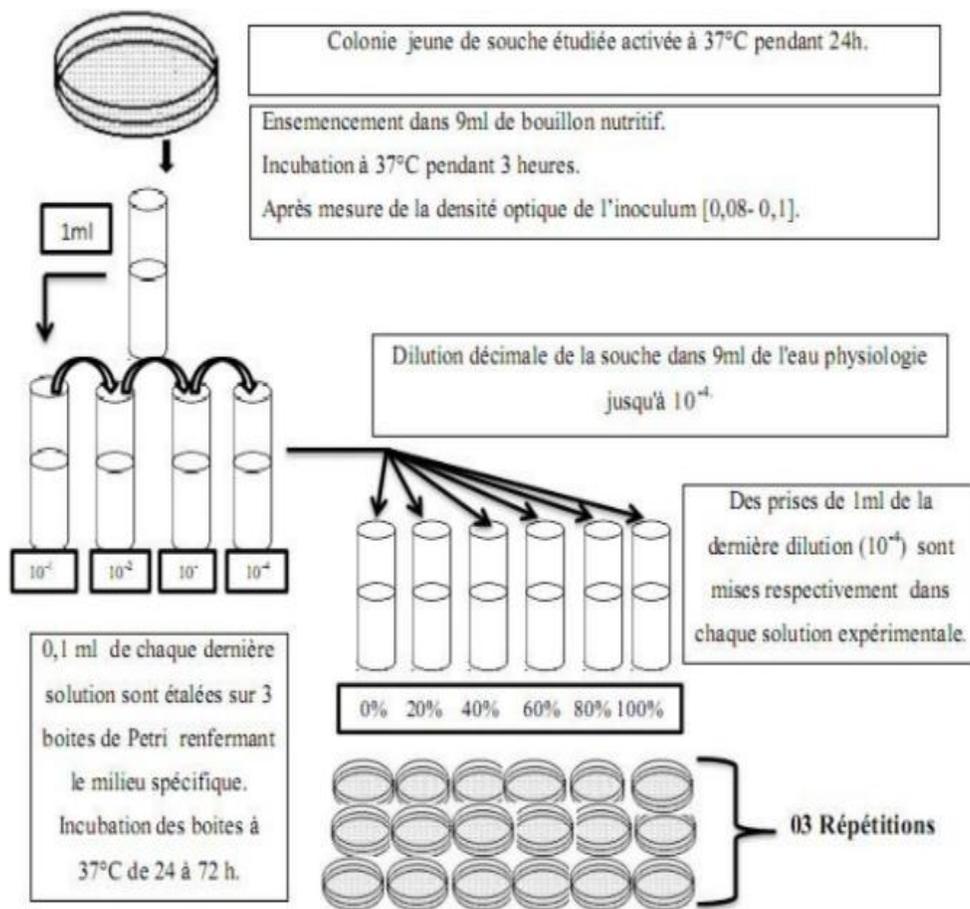


Figure 9 : Détermination de l'activité antibactérienne par méthode de contact direct (**Bourgeois et Leveau, 1980**)

3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antibiotique et /ou en principes actifs nécessaires pour inhiber la croissance d'un microorganisme (**Djenane et al., 2012**). Les extraits des plantes obtenus par extraction aux différents solvants sont utilisés pour déterminer la concentration minimale inhibitrice de germe. Ainsi, une colonie de la bactérie prélevée à l'aide d'une anse de platine dans 10 ml de bouillon nutritif, est incubée pendant 3 heures à 37°C en vue d'obtenir les inoculations, des prises de 0,2 ml de chaque inoculum sont ensuite introduites respectivement dans 2 ml de chaque extrait dilué non pas avec de l'eau mais avec le bouillon Mueller Hinton.

Les mélanges des tubes contenant séparément chaque extrait préparé à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80 et 100%) et l'inoculum de bactérie, sont ensuite incubés à 37 °C pendant 18 à 24 heures (**LA et al., 2008**). La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance du microorganisme étudié. La CMI correspond donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité.

3.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide d'une espèce de germe étudié représente la plus petite concentration d'extrait de la plante qui laisse 0,01% au moins de survivant de l'inoculum initial après incubation (**LA et al., 2008**).

Pour sa détermination, le tube témoin (inoculum) a été dilué à l'eau physiologique jusqu'à 10^{-4} . Cette dilution représente 0,01% de survie du microorganisme. Elle estensemencée par strie de 5 cm sur une Gélose Mueller Hinton puis incubée à 37°C pendant 24 heures.

Le nombre de colonies de bactéries obtenu sur la strie de la dilution 10^{-4} est comparé à celui de chaque tube expérimental contenant l'inoculum, égalementensemencé sur le même milieu de culture en strie de 5 cm et incubé à 37 °C durant 18 à 24 heures. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de colonies présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspondra à la concentration minimale bactéricide.

4. Mécanisme d'action antimicrobien

Les composés phénoliques sont reconnus d'être synthétisés par les plantes en réponse à l'infection microbienne (**Boulekbache *et al.*, 2013**). En effet, ils sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, possédants des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes. L'intensité et le spectre d'activité antimicrobienne varient selon la bactérie et le type d'extrait et le type de bactéries (**Djenane *et al.*, 2012**).

L'action antibactérienne des phénols est liée à leurs capacités à dénaturer les protéines et sont généralement classés comme agents agissant en surface (**Casas-Sanchez *et al.*, 2007**). Leur action conduirait à la fuite des constituants cellulaires des bactéries tels que les protéines, le potassium et le phosphate.

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 10). Les polyphénols agissent par privation de substrat, rupture de la membrane et de la paroi cellulaire (**Silva et Fernandes Júnior, 2010**).

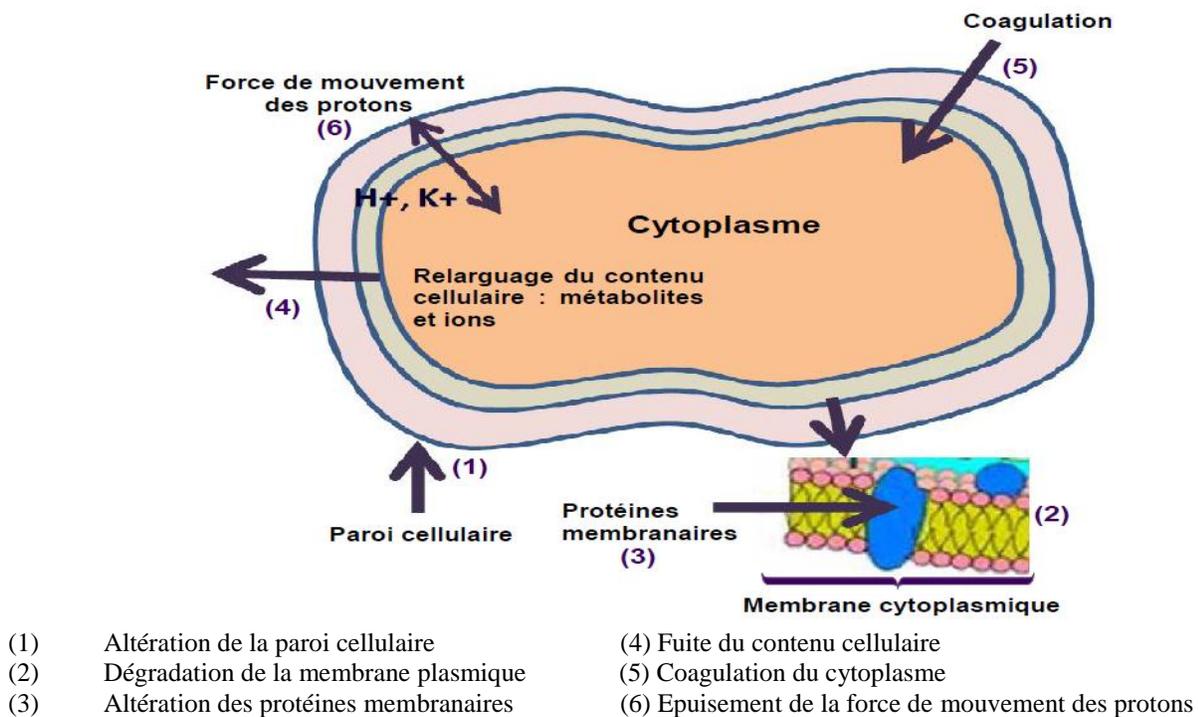


Figure 10 : Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérés comme sites d'action pour les composés naturels (**Silva et Fernandes Júnior, 2010**).

5. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'olive

Malgré la grande disponibilité de médicaments antimicrobiens cliniquement utiles, plusieurs arguments (spectre antimicrobien limité et effets secondaires graves des antibiotiques majeurs, augmentation de la résistance clinique des micro-organismes précédemment sensibles, émergence d'infections auparavant rares) stimulent le développement de nouvelles molécules végétales avec une activité antibactérienne. Parce que la feuille d'olive (*Olea europaea*) est connue pour être résistante dans la nature aux attaques microbiennes et d'insectes, beaucoup de recherches ont porté sur l'activité antibactérienne des composés contenus dans les olives, l'huile et feuilles d'olive (Djenane *et al.*, 2012).

5.1. Effet antibactérien des extraits aqueux de feuilles d'olive

Selon l'étude de Aliabadi *et al.* (2012), l'activité antibactérienne des extraits aqueux de feuilles d'olive est testée par la méthode de diffusion de puits d'agar contre certaines bactéries pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus cereus*.

Tableau 3 : Activité antibactérienne des extraits aqueux de feuilles d'olive à différentes concentrations (Aliabadi *et al.*, 2012)

| Bactéries pathogènes | <i>S. aureus</i> | <i>S.typhimurium</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumonia</i> | <i>B. cereus</i> |
|----------------------|------------------|----------------------|----------------|---------------------|------------------|
| Extrait mg/ml | | | | | |
| 10 | - | 1 | - | - | - |
| 15 | 1 | 2 | - | 2 | 1 |
| 25 | 3.5 | 4 | 2 | 4.5 | 2.1 |
| 35 | 7.2 | 8.5 | 6 | 7.2 | 7 |
| 50 | 9 | 11.5 | 8.2 | 10 | 9.5 |

(-) zones d'inhibition en millimètre

Selon Aliabadi *et al.* (2012), les extraits de feuilles d'olive ont montré de bons effets inhibiteurs sur les bactéries pathogènes. Markin *et al.* (2003) ont également signalé que l'extrait de feuille d'olivier avec une concentration de 0,6 % (w/v) a tué *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *K. pneumonia* dans l'exposition à 3 heures. D'autre part, *B. cereus* n'a été inhibé que lorsque la concentration a été augmentée à 20 % (w/v) et cela peut-être due à la capacité de formation des spores dans cette espèce.

Dans une autre étude, **Korukluoglu et al. (2010)** ont étudié l'effet du solvant d'extraction sur l'efficacité antimicrobienne sur *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*. Ils ont rapporté que le type de solvant a affecté la distribution et la concentration phénolique dans les extraits, et l'activité antimicrobienne contre les bactéries testées. L'extrait des feuilles d'olivier par l'éthanol a montré l'efficacité antibactérienne la plus élevée contre *E. coli* et *S. enteritidis*. Cependant, l'extrait par l'acétone a montré l'efficacité la plus élevée contre *S. typhimurium* (**Korukluoglu et al., 2010**).

Dans l'étude d'**Owen et al. (2003)**, les composés phénoliques contenus dans l'extrait de feuille d'olive ont montré des activités antimicrobiennes contre plusieurs micro- Organismes, dont : *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. typhi* et *V. parahaemolyticus*. Dans cette étude, l'extrait aqueux de feuille d'olive a montré de bonnes capacités antimicrobiennes et l'inhibition la plus élevée de 11,5 mm contre *Salmonella typhimurium*.

5.2. Spectre d'activité antibactérienne des extraits phénoliques

La force et le spectre d'activité antibactérienne varient selon le type d'extrait et le Gram des bactéries. Cependant, les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques. Cette résistance 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 (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995**).

Pereira et al. (2007) ont testé l'effet des extraits aqueux de feuilles d'olivier sur les bactéries *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* (Gram +), *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* (Gram -) et *C. albicans* et *C. neoformans* (champignons). Ils ont remarqué que l'extrait inhibait toutes les bactéries et champignons testés, suggérant une large activité antimicrobienne des extraits de feuilles d'olive d'une manière dépendante de la concentration.

Selon le tableau 4, les valeurs du taux de croissance microbienne en présence de différentes concentrations d'extraits des feuilles d'olivier présentaient une capacité antimicrobienne suivant l'ordre *B. cereus* > *C. albicans* > *E. coli* > *S. aureus* > *C. neoformans* > *K. pneumoniae* > *P. aeruginosa* > *B. subtilis*.

B. cereus (Gram positif) et *C. albicans* (champignons) étaient les microorganismes les plus sensibles, présentant des valeurs IC₂₅ inférieures à 1 mg/ml.

Tableau 4 : Taux de croissance microbienne en présence de différentes concentrations d'extraits de feuilles d'olivier et valeurs IC₂₅ (Pereira *et al.*, 2007).

| Extrait (mg/mL) | <i>B. cereus</i> | <i>B. Subtilis</i> | <i>S. Aureus</i> | <i>E. Coli</i> | <i>K. pneumonia</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. neoformans</i> |
|------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| 0.00 | 0.67 | 0.53 | 0.66 | 0.57 | 0.68 | 0.63 | 0.40 | 0.18 |
| 0.05 | 0.69 | 0.62 | 0.71 | 0.56 | 0.61 | 0.52 | 0.35 | 0.17 |
| 0.10 | 0.54 | 0.61 | 0.73 | 0.56 | 0.60 | 0.63 | 0.36 | 0.16 |
| 0.50 | 0.51 | 0.59 | 0.68 | 0.52 | 0.61 | 0.60 | 0.39 | 0.16 |
| 1.00 | 0.48 | 0.53 | 0.60 | 0.46 | 0.59 | 0.60 | 0.26 | 0.15 |
| 5.00 | 0.37 | 0.36 | 0.35 | 0.30 | 0.44 | 0.37 | 0.12 | 0.12 |
| IC ₂₅ | 0.63 | 4.12 | 2.68 | 1.81 | 3.13 | 3.22 | 0.85 | 3.00 |

IC₂₅ (concentration inhibitrice de 25%)

En outre, il n'y avait pas de sélectivité entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cet extrait de feuilles a été en mesure de dénaturer les protéines et d'affecter la perméabilité de la membrane cellulaire de la bactérie (Pereira *et al.*, 2007).

5.3. Efficacité antimicrobienne des extraits phénoliques

Selon l'étude de Djenane *et al.* (2012), l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles d'olivier vis-à-vis des trois souches pathogènes *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis*, *S. aureus* (Figure 11), est évaluée qualitativement et quantitativement par la méthode de diffusion sur gélose. Selon les résultats représentés dans le tableau 5, l'extrait brut et les polyphénols de feuilles d'olivier ont présenté une forte activité antibactérienne. Les résultats obtenus pour ces composés sont comparables à ceux obtenus pour le chloramphénicol, un antibiotique utilisé comme témoin positif. Les diamètres d'inhibition enregistrés vis-à-vis des souches sont récapitulés dans le tableau 6.

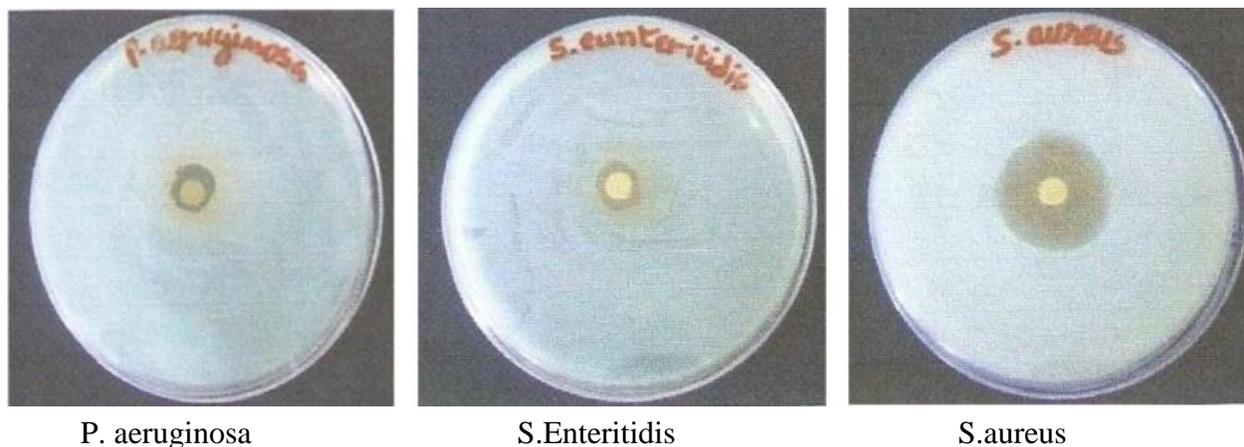


Figure 11 : Effet inhibiteur des extraits d'olivier vis-à-vis de *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* et *S. aureus* (Djenane *et al.*, 2012)

Tableau 5 : Activité Antibactérienne de l'extrait brut aqueux et des polyphénols des feuilles d'olivier (Méthode de diffusion sur gélose), exprimée en diamètre d'inhibition (mm) (Moyenne écart type) (Djenane *et al.*, 2012).

| | Zone d'inhibition (mm) | | |
|-----------------------|------------------------|--------------|-----------------|
| | Polyphénol | Extrait brut | Chloramphénicol |
| <i>S. Enteritidis</i> | 16,15 1,2a | 13,70 2,10b | 15,25 0,8a,b |
| <i>S. aureus</i> | 30,18 2,10a | 16,33 1,8b | 16,35 1,8b |
| <i>P. aeruginosa</i> | 15,57 2,15a | 15,29 1,9a | 16,15 0,7a |

(a, b) : Les moyens de la même colonne qui ne partagent pas une lettre commune sont significativement différents ($p < 0,05$) par le test multiple de Duncan.

Les recherches réalisées "*in vitro*" par plusieurs auteurs **Das *et al.* (2010)** ; **Keskin *et al.* (2012)** 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 micro-organismes. La forte activité antimicrobienne des extraits phénoliques et bruts est confirmée par la méthode de micro dilution (Tableau 6).

Tableau 6: Les Concentrations minimales inhibitrices exprimées en pourcentage (v/v) **Djenane et al., 2012).**

| | CMI % | |
|-----------------------|-------------|--------------|
| | Polyphénols | Extrait brut |
| <i>S. Enteritidis</i> | 0,1 | 1,2 |
| <i>S. aureus</i> | 0,05 | 0,9 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 0,1 | 1,2 |

Il ressort de ce tableau que les polyphénols sont plus performants par rapport à l'extrait brut en termes de valeurs de CMI. Les polyphénols ont exhibé une valeur de CMI (0,05%) inférieure de 18 fois à celle obtenue avec l'extrait brut (0,9%) vis-à-vis de *S. aureus*. Cependant, vis-à-vis de *S. Enteritidis* et *P. aeruginosa*, l'extrait polyphénolique est 12 fois plus performant que l'extrait brut (**Djenane et al., 2012**).

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

Les valeurs de CMI indiquent que l'extrait polyphénolique est plus efficace que l'extrait brut. **Kim et al. (1995)** ont déjà indiqué qu'en raison de la variation dans la diffusion et des propriétés de solubilité des différents composés dans les différents milieux, les résultats obtenus par la méthode des disques ne peuvent pas être directement comparables à ceux obtenus par la méthode de microdilution. Leurs résultats ont montré que l'extrait polyphénolique qui a provoqué d'importantes zones d'inhibition vis-à-vis de *S. aureus* est celui qui a donné la plus faible valeur de CMI (0,05%).

Selon **Das et al. (2010)**, les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes possédants des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes. Cela a été prouvé grâce à leurs travaux portant sur l'évaluation de l'activité biologique d'extraits issus de plusieurs plantes méditerranéennes (bourrache, romarin, sauge, origan, lentisque, etc.) (**Djenane et al., 2002, 2003**).

5.4. Effets synergiques des composés phénoliques individuels et combinés de l'extrait de feuilles d'olivier

Selon les résultats de **Lee et Lee (2010)**, les effets synergiques de l'individu et des composés phénoliques combinés dans l'extrait des feuilles d'olivier testés vis-à-vis des cinq souches pathogènes *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* (Tableau 7). L'oleuropéine a montré un effet d'inhibition fort (23,5 mm) contre *S. enteritidis*, et l'acide caféique a montré des effets d'inhibition modérés (9,8 à 10,4 mm) contre *B. cereus*, *E. coli*, et *S. enteritidis*. Cependant, l'oleuropéine et l'acide caféique n'ont pas montré d'activités antimicrobiennes contre *S. aureus*. De façon constante, aucune activité antimicrobienne n'a été observée pour la rutine et la vanilline contre *B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis* et *S. aureus*. Il est intéressant de noter que le mélange combiné de composés phénoliques a montré de meilleurs effets d'inhibition contre *B. cereus* et *S. enteritidis*. Une différence significative a été détectée dans laquelle le mélange de composés phénoliques a présenté des effets d'inhibition plus élevés que les composés phénoliques individuels ($p < 0,05$).

Ces résultats indiquent que l'oleuropéine, la rutine, la vanilline et l'acide caféique contenus dans l'extrait de feuille d'olive offrent certains effets synergiques sous forme mixte.

Tableau 7: Activités antimicrobiennes de l'oleuropéine, de rutine, de la vanilline, de l'acide caféique et de leur mélange en extrait de feuille d'olive (**Lee et Lee, 2010**).

| | Oleuropéine | Rutine | Vanilline | Acide caféique | Mélange d'extrait |
|-------------------------------|--------------|--------|-----------|----------------|-------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> | - | - | - | 9.8 ± 0.0 b | 28.5 ± 0.3 a |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | - | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> | - | - | - | 10.1 ± 0.1 | - |
| <i>Salmonella enteritidis</i> | 23.5 ± 0.8 b | - | - | 10.4 ± 0.2 c | 24.5 ± 0.5 a |

(a–c) : Les moyens de la même colonne qui ne partagent pas une lettre commune sont significativement différents ($p < 0,05$) par le test multiple de Duncan. (-) Non détecté.

5.5. Effet de la méthode d'extraction sur l'activité antibactérienne des extraits phénoliques

Les chercheurs **Ghomari *et al.* (2019)** ont étudié l'effet des solvants d'extraction (éthanol, acétonitrile, eau distillée), du pH, de la température et de la méthode d'extraction (macération, sonication, macération en deux étapes) sur le contenu flavonoïde et phénolique des feuilles d'olive. En outre, des analyses qualitatives et quantitatives des composés phénoliques par (HPLC) ont été effectuées.

Les résultats ont montré que l'extrait macéré en deux étapes par l'éthanol suivi par l'eau distillée des feuilles séchées, a montré une teneur élevée en composés phénoliques et en flavonoïdes par rapport aux extraits obtenus par les autres méthodes d'extraction. D'autre part, l'effet des extraits obtenus a été étudié sur cinq bactéries pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes*) à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose. Les disques imbibés de chloramphénicol ont été utilisés comme témoins positifs. Le contrôle négatif était un disque contenant 10 ml de DMSO. Les expériences ont été répétées deux fois pour chaque essai.

Les résultats de cette étude ont montré des réponses différentes concernant les cinq bactéries testées reflétées par différents diamètres de halos. L'effet antibactérien était plus important pour l'extrait préparé à l'éthanol puis à l'eau pour les feuilles séchées (Figure 12).

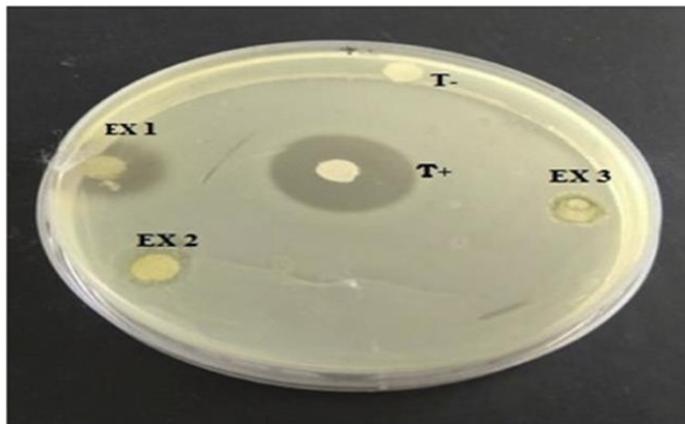


Figure 12 : Activité antibactérienne du meilleur extrait obtenu par macération en deux étapes avec de l'éthanol suivie de l'eau des feuilles séchées contre la bactérie *Escherichia coli*.

T- : témoin négatif (DMSO) ; T+ : témoin positif (Chloramphénicol) ; EX 1 : extrait testé obtenu par macération avec de l'éthanol suivi de l'eau ; EX 2 : extrait testé obtenu par macération d'eau distillée ; EX 3 : extrait testé obtenu par macération avec 20% d'acétonitrile (**Ghomari *et al.*, 2019**).

Cet extrait a montré l'activité inhibitrice contre toutes les souches étudiées. Ainsi, ces résultats ont montré que la forte teneur en flavonoïdes et en composés phénoliques totaux de ces extraits peut expliquer probablement leurs fortes activités antibactériennes par rapport aux autres techniques utilisées. Ils ont observé également que ces extraits ont une forte teneur en oleuropéine, ce composé est un sécoiridoïde contenu dans les feuilles d'olive, les olives et l'huile d'olive. Ce dernier était responsable d'une forte activité antibactérienne qui pourrait s'expliquer par ses propriétés surfactantes qui pourraient changer la perméabilité de la membrane cellulaire des bactéries (Ghomari *et al.*, 2019).

Les résultats obtenus pour l'activité antibactérienne de chaque extrait préparé (le diamètre d'inhibition est donné par (mm)) sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8: Activité antibactérienne des feuilles d'olives extraits à différentes concentrations (Diamètre de la zone d'inhibition en mm) (Ghomari *et al.*, 2019).

| Extraits | Conc mg/ml | S. aureus | L. Monocytogene | B. subtilis | P. aeruginosa | E. Coli |
|---------------------------------------|------------|-----------|-----------------|-------------|---------------|---------|
| Macération | | | | | | |
| 80% Ethanol | 30 | 3.5±0.0 | 03±0.2 | 02±0.5 | 01 ±0.2 | 03 ±0.0 |
| | 50 | 8.5±0.9 | 07±0.6 | 5.5±0.8 | 4.5 ±0.6 | 07 ±0.1 |
| 20% Acétonitrile | 30 | - | - | - | - | - |
| | 50 | - | - | - | - | - |
| Eau distillée | 30 | - | - | - | - | - |
| | 50 | - | - | - | - | - |
| Eau distillée à 60 °C | 30 | 01 ±0.3 | 01 ±0.2 | 01 ±0.2 | - | 02 ±0.0 |
| | 50 | 4.5 ±1.0 | 04 ±0.1 | 05 ±0.2 | 01 ±0.3 | 06 ±0.4 |
| Eau distillée à 60°C avec pH 3 | 30 | 01 ±0.3 | 01 ±0.0 | 02 ±0.5 | 01 ±0.0 | 01 ±0.1 |
| | 50 | 3.5 ±1.0 | 3.2 ±0.0 | 03 ±0.0 | 02 ±0.0 | 03 ±0.3 |
| Sonication | | | | | | |
| 80% Ethanol | 30 | - | - | - | - | - |
| | 50 | - | - | - | - | - |

(-): Pas d'activité antibactérienne.

Les résultats de l'antibiogramme ont également montré que toutes les souches testées sont sensibles au chloramphénicol avec des diamètres d'inhibition différents. La richesse des feuilles d'olive en molécules précieuses pourrait être exploitée dans diverses applications dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. D'autres études sont ainsi menées pour valoriser l'oleuropéine tout au long de la bioconversion vers l'hydroxytyrosol qui est un produit à forte valeur ajoutée.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'activité antimicrobienne d'*Olea europaea* L. a fait l'objet d'une étude approfondie au cours des quatre dernières décennies. Ces efforts scientifiques se sont principalement concentrés sur l'activité antimicrobienne globale des extraits bruts contre une grande variété de bactéries et de champignons. *Olea europaea* L. semble être une source fiable de composés phénoliques qui pourraient servir d'additifs alimentaires appropriés. Dans le cadre de leur bioactivité extraordinaire, l'ajout technologiquement contrôlé de certains composés phénoliques aux aliments peut être considéré comme favorable, car ils possèdent de forts effets bénéfiques pour la santé, contrairement aux agents conservateurs traditionnels.

L'extrait des feuilles d'olive est une source puissante de polyphénols ayant des propriétés antimicrobiennes importante. Ainsi, l'extrait brut des feuilles d'olivier inhibent toutes les bactéries et les champignons testés, suggérant une large activité antimicrobienne dépendante de la concentration. En outre, il n'y avait pas de sélectivité entre les bactéries gram positif et gram négatif. Cependant, l'extrait polyphénolique est révélé 12 fois plus performant que l'extrait brut. Dans ce cadre, certains chercheurs ont signalé l'existence d'une relation étroite entre la composition chimique en éléments phénoliques et l'activité antimicrobienne.

Par ailleurs, les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes possédants des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes. L'activité antimicrobienne des phénols combinés a montré des effets meilleurs que les phénols individuels utilisaient in-vitro. De plus, le type de solvant affecte également la composition et la concentration phénolique dans l'extrait et en conséquence l'activité antimicrobienne.

Bien que, les activités, les modes d'action et l'aptitude à l'utilisation des extraits des feuilles d'olivier dans les aliments nécessitent plus d'études expérimentales pour étudier le comportement des constituants phénoliques de *Olea europaea* dans les matrices alimentaires et élargir les connaissances sur les altérations sensorielles possibles.

Bibliographie

Bibliographie

- **Achat, S., 2013.** Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Avignon. Thèse de doctorat. Université A. Mira-Bejaia. 260 pages.
- **Aliabadi M. A., Darsanaki R. K., Rokhi M. L., Nourbakhsh M et Raeisi G., 2012.** Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Annals of biological research*. 3(8): 4189-4191.
- **Alonso-Salces R., Héberger K., Holland M., Moreno-Rojas J., Mariani C., Bellan G., Reniero F et Guillou C., 2010.** Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food chemistry*. 118(4): 956-965 .
- **Aouidi, F., 2012.** Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. *Cobrançosa*) Leaves. Molécules, Etude de la valorisation des feuilles d'Olivier *Olea Europaea* dans L'industrie Agro-Al. Thèse de doctorat. Université du Carthage. 213 pages.
- **Argenson C., 1999.** L'olivier. Les Editions Ctifl. 462 pages.
- **Bardoulat, M., 2004.** L'olivier, trésor de santé: un arbre, un fruit, une huile aux vertus millénaires, Alpen .Ed.sam. 94 pages.
- **Bayram, M., Topuz, S., Kaya, C., 2020.** Antioxidant, Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract and Oleuropein, Their Possibilities Usage in Foods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 8: 337-347.
- **Benguendouz, A., 2019.** Caractérisation nutritionnelle, toxicologique et aptitudes technologiques de «Sardine pilchardus» pêchée dans la côte Algérienne. M. Selsel et Attou Ghalem. Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. 163 pages.
- **Boros B., Jakabová S., Dörnyei Á., Horváth G., Pluhár Z., Kilár F et Felinger A., 2010.** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography– mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of chromatography*. 1217(51):7972-7980 .
- **Bouarroudj K., Tamendjari A et Larbat R., 2016.** Quality, composition and antioxidant activity of Algerian wild olive (*Olea europaea* L. subsp. *Oleaster*) oil. *Industrial Crops and Products*. 83 : 484-491

- **Boudhrioua N., Bahloul N., Slimen I. B et Kechaou N., 2009.** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products* . 29(2-3) : 412-419.
- **Boukhari R., 2014.** Contribution à l'analyse génétique et caractérisation de quelques variétés d'olivier et l'influence de l'environnement sur leurs rendements au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou. Mémoire de Magister,U.A.B.B. Tlemcen.188 pages.
- **Boulekbache-Makhlouf L., Slimani S et Madani K., 2013.** Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. Mémoire de Magister.Bouira. 280 pages.
- **Boukroune, H., 2018.** L'oléiculture en petite Kabylie: améliorer la qualité du produit participe au développement durable de la filière Devant. Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif. 186 pages.
- **Bouras N., 2015.** Faisabilité de mise en place d'une indication géographique sur l'olive de table variété " SIGOISE", Thèse, ENSA. de Sig-W. Mascara.187 pages.
- **Bourgeois C. et Leveau S., 1980.** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries alimentaires. 2ème édition : Entièrement. Paris : Lavoisier-Tec & Doc : Apria.
- **Boussadia, D., Djenoune, S., 2017.** Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts des feuilles de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea laperrinei*) et de l'oléastre (*Olea europaea sylvestris*) sur cinq souches bactérienne et l'étude de l'association extrait brut-antibiotique. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri. 86 pages.
- **Breton, C., Médail, F., Pinatel, C., Bervillé, A., 2006.** De l'olivier à l'oléastre: origine et domestication de l'*Olea europaea* L. dans le Bassin méditerranéen. *Cahiers Agricultures*. 15: 329-336 (321).
- **Casas-Sanchez J., Alsina M. A., Herrlein M. K et Mestres C., 2007.** Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes *Colloid and Polymer Science* . 285(12): 1351-1360.
- **Chafaa, S. 2013.** Contribution à l'étude de l'entomofaune de l'olivier, *Olea europaea* et de la dynamique des populations de la cochenille violette *Parlatoria oleae* Colvée., 1880 (Homoptera: Diaspididae) dans la région de Batna. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique – EL- Harrach. 168 pages.

- **Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C., Teissèdre, P.-L., 2008.** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* .6 : 75-82.
 - **Corbin C., Fidel T., Leclerc E. A., Barakzoy E., Sagot N., Falguières A., Renouard S., Blondeau J.-P et Ferroud C., 2015.** Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrason Sonochem.* 26 : 176-185.
 - **Crozier A., Jaganath I. B et Clifford M. N., 2006.** Phenols, polyphenols and tannins: an overview. *Structure and Role in the Human Diet.*1 – 24 .
 - **D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita* .43 : 348.
 - **Das K., Tiwari R et Shrivastava D., 2010.** Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents, current methods and future trends. *4(2):* 104-111.
 - **De Coi, B., 2000.** Method of aligning a light curtain. *Google Patents* .8 pages.
 - **Djenane D., Aïder M., Yangüela J., Idir L., Gómez D et 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. *Journal of Meat Science.*92(4): 667-674.
 - **El Hafian, M., Benlandini, N., Elyacoubi, H., Zidane, L., Rochdi, A., 2014.** Étude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales utilisées au niveau de la préfecture d'Agadir-Ida-Outanane (Maroc). *Journal of Applied Biosciences.* 81 : 7198-7213.
 - **Erbay Z. et Icier F., 2010.** The importance and potential uses of olive leaves. *Food Reviews International.* (4): 319-334.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M et Abdelly C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *Compte Rendu de Biologie.* 331: 372–379.
- **Farhi, H., 2009.** Effect of gamma irradiation on olive leaves and application on meat products; Effet de l'irradiation gamma sur les feuilles d'olivier et application dans les produits carnes. Thèse de Magister. Université du 7 novembre à Carthage .70 pages.

- **Flórez N., Conde E et Domínguez H., 2015.** Microwave assisted water extraction of plant compounds. *Chemical technology and Biotechnology* . 90(4): 590-607.
- **Gharabi, D., 2018.** Effet du stress salin sur le comportement physiologique et morphobiochimique de jeunes plants de variétés d'olivier cultivé (*Olea-europea*) locales et introduites non greffés et greffés sur oléastre. Thèse de doctorat. Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes .166 pages.
- **Ghomari O., Sounni F., Massaoudi Y., Ghanam J., Kaitouni L. B. D., Merzouki M et Benlemlih M., 2019.** Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity *Biotechnology Reports* (Amsterdam, Netherlands). 2: 347.
- **Hayes J., Allen P., Brunton N et O'grady M., 2011.** Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food chemistry*.126(3): 948-955 .
- **Herrero M., Castro-Puyana M., Mendiola J. A. et Ibañez E., 2013.** Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*. 43: 67-83.
- **Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström , A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B.- E., & Kautsky, N. (2003).** Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 255–266.
- **Irakli M., Chatzopoulou P et Ekateriniadou L., 2018.** Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities . *Food Science & Technology*: 382-388.
- **ITAF, 2006.** Catalogue des variétés Algériennes de l'olivier. 86-87.
- **Ivanova-Petropulos V., Hermosín-Gutiérrez I., Boros B., Stefova M., Stafilov T., Vojnoski B., Dörnyei Á et Kilár F., 2015.** Phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* : 1-14 .
- **Keskin D., Ceyhan N., Ugur A et Dbeyes A. D., 2012.** Antimicrobial activity and chemical constitutions of West Anatolian olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. (2): 99-102 .

- **Kim J., Marshall M. R et Wei C.-I., 1995.** Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Food chemistry*. (11): 2839-2845 .
- **Konoz E., Abbasi A., Moazeni R. S., Parastar H et Jalali-Heravi M., 2013.** Chemometrics-assisted gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatile components of olive leaf oil.
- **Korukluoglu M., Sahan Y., Yigit A., Ozer E. T et Gücer S., 2010.** Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea* L. leaf extracts. *Food Science & Technology* .(3): 383-396.
- **Krief S., 2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées, Thèse. Museum national d'histoire naturelle. PARIS . 208 pages
- **LA M. J.-., Loukou Y et Guede-guina F., 2008.** Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli* Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* trains. Félix Houphouët- Boigny. (3) :228-366.
- **Labdaoui, D., 2017.** Impact socio-économique et environnemental du modèle d'extraction des huiles d'olives à deux phases et possibilités de sa diffusion dans la région de Bouira (Algérie). Thèse de doctorat. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostganem.178 pages.
- **Lee-Huang S., Zhang L., Huang P;-L and Chang Y.-T. (2003).** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 307 (4): 1029-1037.
- **Lee O.-H. et Lee B.-Y., 2010.** Antioxydant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Food chemistry* . (10): 3751-3754.
- **Macheix J.-J., Fleuriet A et Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, PPUR presses polytechniques. Edition : Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes. 192 pages.

- **Macheix J., Fleuriet A et Sarni-Manchado P., 2006.** Composés phénoliques dans la plante- Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Edition : Lausanne, Presses Polytechniques et universitaires romandes, Lavoisier Paris.390-399 pages.
- **Markin D., Duek L et Berdicevsky S., 2003.** In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern in vitro. Mycoses. 46(3-4): 132 -136 .
- **MISSAT L., 2015.** Perspectives de développement de l'olivier dans les Monts des Ksour.Mémoire de master .128 pages.
- **Mohammedi, Z., 2013.** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat. Université Abou Beker Belkaid. 173 pages.
- **Moreira M. M., Barroso M. F., Boeykens A., Withouck H., Morais S et Delerue-Matos C., 2017.** Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. Industrial Crops and Product . 104: 210-220.
- **Mushtaq A., Hanif M. A., Ayub M. A., Bhatti I. A et Romdhane M., 2020.** Olive. Medicinal Plants of South Asia , Edition Novel sources for drug discovery: 541-555 pages.
- **Mylonaki S., Kiassos E., Makris D. P et Kefalas P., 2008.** Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. Analytical and bioanalytical Chemistry. 392(5): 977.
- **Nora, N. B., Hamid, K., Snouci, M., Boumedién, M., Abdellah, M. 2012.** Antibacterial activity and phytochemical screening of *Olea europaea* leaves from Algeria. Paper presented at the Open Conference Proceedings Journal. 3 : 66-69.
- **Ong E. S., Cheong J. S. H et Goh D., 2006.** Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. Journal of chromatography A . 1112(1-2): 92-102.
- **Oniszczyk A., Olech M., Oniszczyk T., Wojtunik-Kulesza K et Wójtowicz A, 2019.** Extraction methods, LC-ESI-MS/MS analysis of phenolic compounds and antiradical properties of functional food enriched with elderberry flowers or fruits. Arabian Journal of Chemistry . 12(8): 4719-4730.
- **Oszmianski J., Wojdyło A., Lamer-Zarawska E et Swiader K., 2007.** Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. Food Chemistry. 100(2): 579-583 .

- **Owen R., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W., Spiegelhalder B et Bartsch H., 2003.** Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and chemical Toxicology*. 41(5): 703-717.
- **Özcan, M. M., & Matthäus, B., 2017.** A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*. 243(1) : 89-99.
- **Parikh B., Patel V. et Wellness H., 2017.** Quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of an underutilized Indian fruit: Rayan [*Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard]. *Food science and human wellness* . 6(1): 10-19.
- **Pereira, A. P., I. C. Ferreira, F. Marcelino, P. Valentão, P. B. Andrade, R. Seabra, L. Estevinho, A et Pereira B.,2007.** Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Journal of molecules*. 12(5): 1153- 1162.
- **Plaza M., Domínguez-Rodríguez G., Castro-Puyana M et Marina M. L., 2018.** Polyphenols analysis and related challenges. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* . 177-232 pages .
- **Plaza M et Rodríguez-Meizoso I., 2013.** Advanced extraction processes to obtain bioactives from marine foods. Edition : Blanca Hernández-Ledesma Miguel Herrero. 343-371 pages.
- **Prasain J. K., Wang C.-C et Barnes S., 2004.** Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free radical biology and medicine* .37(9): 1324-1350.
- **Proestos C., Boziaris I., Nychas G.-J. et Komaitis M., 2006.** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food chemistry*. 95(4): 664-671.
- **Rodríguez-Pérez C., Quirantes-Piné R., Contreras M. d. M., Uberos J., Fernández-Gutiérrez A et Segura-Carretero A., 2015.** Assessment of the stability of proanthocyanidins and other phenolic compounds in cranberry syrup after gamma- irradiation treatment and during storage. *Food chemistry*.174 : 392-399.
- **Roginsky V et Lissi E. A., 2005.** Review of methods to determine chain- breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* .92(2): 235-254.
- **Routray W., Orsat V., 2014.** MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods. *Industrial crops and products*. 58: 36-45.

- **Saitta M., Curto S. L., Salvo F., Bella G. Di et Dugo G., 2002.** Gas chromatographic–tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analytical Chemistry*. 466(2): 335-344.
- **Santana Á. L. et Macedo G. A., 2019.** Effects of hydroalcoholic and enzyme-assisted extraction processes on the recovery of catechins and methylxanthines from crude and waste seeds of guarana (*Paullinia cupana*). *Food chemistry*. 281: 222-230.
- **Sawadogo-Lingani, H., 2010.** La fermentation lactique dans le procédé traditionnel de fabrication de la bière de sorgho (dolo, pito): caractérisation des bactéries lactiques pour la sélection de cultures starter. Thèse de doctorat d'Etat. Université de Ouagadougou. 244 pages.
- **Selaimia, R., 2018.** Etude de l'huile d'olive d'Algérie. Thèse de doctorat. Université 8 Mai 1945 Guelma. 161 pages.
- **Sereme, A., Milogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., Nacro, M., 2011.** Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du Burkina Faso. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine* 15.
- **Shaheen N., Lu Y., Geng P., Shao Q et Wei Y., 2017.** Isolation of four phenolic compounds from *Mangifera indica* L. flowers by using normal phase combined with elution extrusion two-step high speed countercurrent chromatography. *Journal of chromatography and analytical technologies in biomolecules*. 1046: 211-217 .
- **Silva N., Fernandes Júnior A., 2010.** Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* .16(3): 402-413
- **Singh, P. P. et Saldaña M. D., 2011.** Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International* .44(8): 2452-2458.
- **Sivakumaran S., Molan A. L., Meagher L. P., Kolb B., Foo L. Y., Lane G. A., Attwood G. A., Fraser K et Tavendale M., 2004.** Variation in antimicrobial action of proanthocyanidins from *Dorycnium rectum* against rumen bacteria. *Phytochemistry* .65(17): 2485-2497 .
- **Sudjana A., D'Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., Riley T., Hammer, K. 2008.** Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 461-463.

- **Tsao R., 2010.** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Journal of nutrients*. 2(12): 1231-1246.
- **Wendakoon C. N. et Sakaguchi M., 1995.** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food protection*. (3): 280-283.
- **Wiesman, Z., 2009.** Desert olive oil cultivation: advanced biotechnologies: Academic Press . 395 pages.
- **Wijngaard H., Hossain M. B., Rai D. K et Brunton N., 2012.** Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*.46(2): 505-513.
- **Yala D., Merad A., Mohamedi D et Ouar Korich M., 2001.** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*. (1) : 5-12 .

Résumé

Les extraits de feuilles d'olivier font actuellement l'objet de nombreuses recherches scientifiques visant à explorer et exploiter leurs activités dans les différents domaines. Dans ce contexte, le présent travail a pour objectif de présenter l'effet d'extrait de ces feuilles sur les bactéries pathogènes. Plusieurs études 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 micro-organismes pathogènes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes*. Les activités antimicrobiennes de ces extraits sont difficiles à corréler à un seul composé spécifique en raison de leur complexité et leur variabilité. Donc, la valorisation des feuilles d'olivier, et leur utilisation comme un moyen de la lutte contre les bactéries pathogènes, s'avère prometteuse dans le domaine médical et agro-alimentaire.

Mots clés : feuilles d'olivier, extraits, bactéries pathogènes, polyphénols.

Abstract

Olive leaf extracts are currently the subject of much scientific research aimed at exploring and exploiting their activities in different fields. In this context, the objective of this work is to present the effect of extract of these leaves on pathogenic bacteria. Several studies have shown that polyphenols are the main antimicrobial compounds of plants, having various action modes of inhibitory and lethal activities on many pathogenic microorganisms: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Listeria monocytogenes*. The antimicrobial activities of these extracts are difficult to correlate with a single specific compound due to their complexity and variability. Therefore, valuing olive leaves, and their use as a means of combating pathogenic bacteria, is showing promise in the medical and agri-food fields.

Keywords: olive leaves, extracts, pathogenic bacteria, polyphenols.

ملخص

تخضع مستخلصات أوراق الزيتون حاليًا للكثير من الأبحاث العلمية التي تهدف إلى استكشاف واستغلال أنشطتها في مختلف المجالات. في هذا السياق، يهدف هذا العمل إلى عرض تأثير مستخلص هذه الأوراق على البكتيريا المسببة للأمراض. أظهرت العديد من الدراسات العلمية أن البوليفينولات هو المركبات الرئيسية في النباتات المضادة للميكروبات، ولها أنماط مختلفة من العمل وأنشطة مثبطة وقاتلة تجاه العديد من الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis* و *Listeria monocytogenes* من أنه الدراسات دلت كما. الصعب ربط الأنشطة المضادة للميكروبات لهذه المستخلصات بمركب محدد واحد بسبب تعقيدها وتنوعها.

لذلك، فإن تقييم أوراق الزيتون، واستخدامها كوسيلة لمكافحة البكتيريا المسببة للأمراض، يبشر بالخير في مجالي الطب والغذية الزراعية.

الكلمات المفتاحية: أوراق الزيتون، المستخلصات، البكتيريا الممرضة، البوليفينولات