

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

*Etude des activités biologiques des extraits de feuilles
d'oliviers de la région de Laghouat*

Présenté par :

- Anbi Ahmed Hocine

Devant le jury composé de :

Mme. Allali Khadija	Maitre-assistant B	Présidente
M. Krantar Kamel	Maître assistant A	Examineur
Mme. Hamini Faiza	Maitre-assistant B	Promoteur

Soutenu publiquement le : 27- 06 - 2019



Remerciements

Avant tout, j'exprime mes remerciements à Dieu de m'avoir donné le courage et la force d'aller au bout afin de terminer ce travail et pour sa bienveillance.

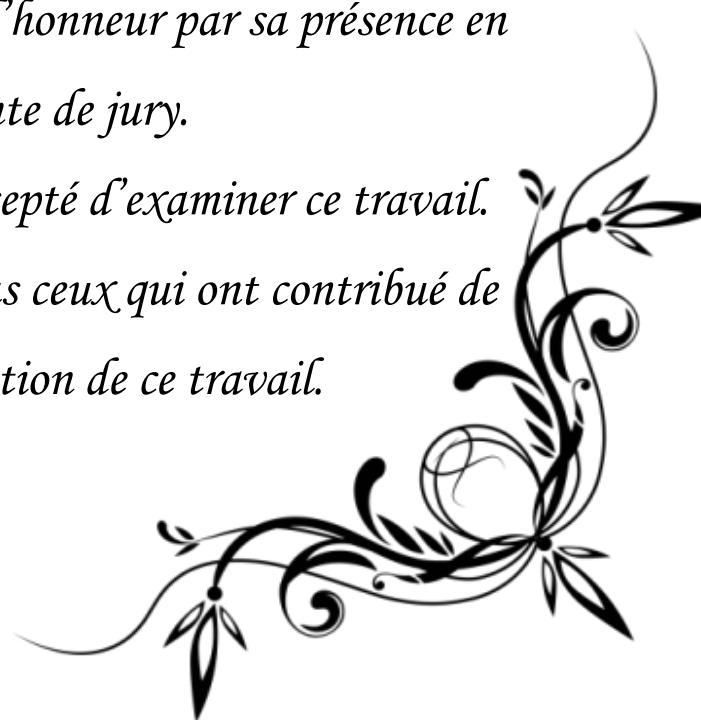
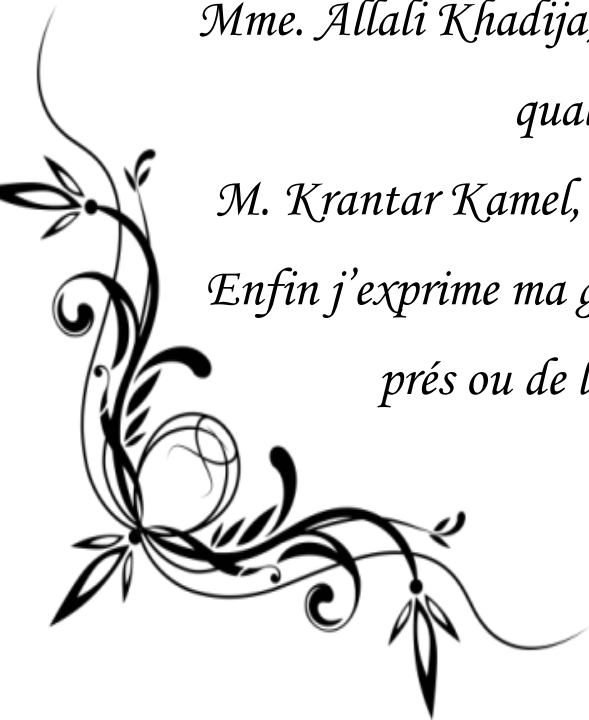
Ma profonde gratitude va à ma promotrice Mme Hamini Faiza, pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir acceptée de m'encadrer, pour ses précieux conseils, ses orientations, pour toute son aide et surtout pour sa gentillesse.

Je tiens à remercier les membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont accordé en jugeant ce travail, notamment :

Mme. Allali Khadija, qui m'a fait l'honneur par sa présence en qualité de présidente de jury.

M. Krantar Kamel, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin j'exprime ma gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail en premier lieu à mes très chers parents en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation.

A tous les membres de la famille qui m'ont souhaité toujours la réussite et le bonheur.

A tout(e)s mes ami(e)s surtout : Hicham, Salah, Kada, Yousef, Abd'Elnoor, Tarak, Sid Ali, Mohamed, Fatah, Yacine,

A tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université.



LISTE DES TABLEAUX

i

Tableau 1. Production mondiale d'olive	4
Tableau 2. Les wilayas potentielles productrices d'olives pour l'année 2017	5
Tableau 3. Structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants des feuilles d'olivier	14
Tableau 4. Teneurs moyennes en composés phénoliques totaux des extraits	39
Tableau 5. Tableau représentant les IC50 des extraits comparés à celui de la vitamine C	43
Tableau 6. Diameter d'inhibition de la souche par l'antibiotique (mm)	44
Tableau 7. Résultat des zones d'inhibition des souches par les extraits feuilles (mm)	44

LISTE DES FIGURES**ii**

Figure 1. Répartition de la production de l'huile d'olive dans le monde	5
Figure 2. Aspect générale de l'olivier	7
Figure 3. Arbre de l'olivier	8
Figure 4. Les feuilles de l'olivier	8
Figure 5. Les fleurs d'olivier	9
Figure 6. Les fruits d'olive	10
Figure 7. Schéma de l'étude expérimentale	21
Figure 8. Photo d'un arbre utilisé dans l'expérience de la variété Sigoise	22
Figure 9. Photo d'un arbre utilisé dans l'expérience de la variété Chemlal	22
Figure 10. Protocole de préparation des extraits des feuilles	26
Figure 11 . Structure du radical libre DPPH	29
Figure 12. Taux d'humidité des feuilles	34
Figure 13. Taux de cendres des feuilles	35
Figure 14. Représentation des valeurs de pH des variétés de l'étude	36
Figure 15 : poudre des feuilles	37
Figure 16 : Montage montrant l'extraction à reflux des phenols totaux	37
Figure 17 : (1) L'extrait de Chemlal et (2) L'extrait de Sigoise	37
Figure 18. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	38
Figure 19. Comparaison des teneurs en phénols totaux des deux extraits (mg d'équivalent d'acide gallique/100g de feuilles sèches)	39
Figure 20. Représentation des pourcentages de la fraction totale, des composés phénoliques de l'extrait 1 (Chemlal)	41
Figure 21. Représentation des pourcentages de la fraction totale, des composés phénoliques de l'extrait 2 (Sigoise)	42

Figure.22. représentant la comparaison entre les extraits et la vitamine C	45
Figure 23. Photo des cultures des bactéries (A,B <i>Staphylococcus aureus</i>. C,D <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. E,F <i>Bacillus subtilis</i>) dans les deux cas des témoins (Chloramphénicol et DPPH).	46
Figure 24. Photo des cultures des bactéries (1,2 <i>Staphylococcus aureus</i>. 3,4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. 5,6 <i>Bacillus subtilis</i>) dans les deux cas de extraits avec concentration deferent (0.5 g/l , 0.125 g/l et 0.25g/l)	47

Qx : Quintaux

Ql : quintal

APS : Algérie Presse Service

DSA : Direction des Services Agricoles

LDL : Lipoprotéines de basse densité

HDL : Lipoprotéines de haute densité

MS : Matière Sèche

AMP : L'adénosine monophosphate

DMSO : Diméthylsulfoxyde

GN : Gélose Nutritive

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

IC 50 : Concentration effective à 50%

ATCC : American type culture collection = Collection américaine des cultures type.

PPT : Les teneurs en polyphénols totaux

EAG : équivalent d'acide gallique

Sommaire

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
Liste des abréviations	iii

Introduction générale..... 2

Partie 1. Etude bibliographique

Chapitre I. L'Olivier.....3

I – 1. Historique et répartition géographique	4
I – 2. Production des olives	4
I-2.1. Dans le monde	4
I-2.2. En Algérie	5
I-2.3. A Laghouat	6
I – 3. Caractéristiques de l'olivier	6
I – 4. Botanique et classification	7

Chapitre II. Les feuille de l'olivier.....8

II – 1. Les propriétés des feuilles d'olivier	12
II – 2. Historique d'utilisation des feuilles en médecine traditionnelle	12
II – 3. Intérêt des feuilles d'olivier pour la santé	12
II – 4. Composition chimique des feuilles d'oliviers et propriétés	13
II-5 Valeur alimentaire des feuilles et application dans l'alimentation animal	14

Chapitre III. Les composés phénoliques.....15

III – 1. Définition	16
III- 2. Activité biologique de polyphénols	16
III.2.1. Effet antimicrobien	16
III.2.2. Effet antiallergique	17
III.2.3. Effet anti-inflammatoire	17
III.2.4. Effet antiulcéreux	17
III.2.5. Effet anticancéreux	17
III.2.6. D'autres effets biologiques	18

Partie 2. Etude expérimentale.....

I. Matériel et methode20

I - Méthodologie de travail	21
-----------------------------	----

II- Matériel biologique.....	22
II.1.Echantillon	22
II.2. Mode d'échantillonnage	22
II.3. Période d'échantillonnage	23
III - Analyses biochimiques	23
III.1. Matériel	23
III. 1. 1. Liste et réactifs utilisés	23
III.1.2. Principaux outils et appareils utilisés	24
III.2. Méthodes.....	24
III.2.1. Teneur en eau	24
III.2.2. Cendres	25
III.2.3. pH	25
III.2.4. Extraction des phénols totaux	25
III.2.5. Dosage des composés phénoliques totaux	27
IV - Activités biologique	27
IV.1. Matériel	27
IV.1.1. Matériel biologique et réactifs utilisés	28
IV.1.2. Principaux outils et appareils utilisés	28
IV.2. Méthodes	28
IV.2.1 Activité antioxydante	28
IV.2.2. Coloration de Gram	30
IV.2.3. Activité antimicrobienne d'extrait.....	30
V - Analyses statiques	32

II. Résultats et discussion33

1. Taux d'humidité	34
2. Taux de cendres.....	35
3. PH	36
4. Rendement de l'extraction	36
5. Taux de phénols totaux.....	38
6. Pondération des fractions	41
7. Activité antioxydante des extraits de feuilles	42
8. Activité antibactérienne des extraits des feuilles	44

III. Concluions50

IV. Bibliographie52

V. Annex61

Introduction générale

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive, elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce et la Tunisie (*Tsagaraki et al, 2007*).

L'industrie oléicole génère en plus de l'huile d'olive d'autres produits ou sous-produits ; un rejet solide connu sous le nom « grignon » et un autre liquide connu sous le nom « margine ».

On note aussi parmi les sous-produits les feuilles perdues durant la récolte (traditionnelle ou moderne). Les feuilles sont connues pour leur richesse en composés phénoliques qui ne cessent de prendre de l'importance grâce à leurs vertus sur la **santé**, leurs pouvoirs antioxydants, leurs pouvoirs antimicrobiens ainsi que leur utilité **cosmétique**. (*Hana F, 2009*.)

Pour ce qui est de l'industrie **agroalimentaire** : les préoccupations de sécurité alimentaire prennent aujourd'hui une place importante, à l'échelle mondiale. Certes, la qualité sanitaire des aliments est aujourd'hui satisfaisante et meilleure que dans le passé, mais les crises récentes liées à l'alimentation ont montré la difficulté de maîtriser certains risques liés aux entérobactéries. (*Hana F, 2009*).

En dépit des améliorations modernes dans le secteur d'hygiène et les techniques de production des aliments, les industriels sont encore en face des pertes économiques importantes. Ces pertes sont beaucoup plus importantes pour les produits ayant une sensibilité particulière aux enzymes (oxydation des lipides) et aux micro-organismes. Par conséquent, il y a encore le besoin de création de nouvelles méthodes pour la réduction ou l'élimination des germes pathogènes. (*Hana F, 2009*).

Ces dernières années, des agents **antimicrobiens** et **antioxydants** naturels extraits à partir de plantes sont de préférence employés dans les produits agroalimentaire à cause de leurs effets sur la santé et leurs sécurité comparés avec ceux des conservateurs synthétiques. Les risques pour la santé associés aux conservateurs synthétiques ont incité à établir des règlements stricts pour leurs utilisations dans les produits alimentaires et par conséquent, le développement d'utilisation des agents antimicrobiens naturels et antioxydants extraits de plantes présente une alternative qui ne cesse de se manifester : C'est dans ce cadre que s'est inscrite notre étude.

Notre étude s'est structurée et s'est articulé autour de 2 grandes parties :



Dans un premier temps une recherche bibliographique portant sur l'importance de l'olivier et des composés phénoliques.



Dans un deuxième temps la partie expérimentale qui consiste en une caractérisation biochimique des feuilles d'oliviers issus de la région et un test du pouvoir antioxydant des phénols totaux. Par la suite nous avons testé leur pouvoir antimicrobien sur des bactéries qui sont pathogènes pour l'homme soit directement soit indirectement via l'alimentation.



Partie 1.

Etude bibliographique

Chapitre I. L'Olivier



1. Historique et répartition géographique

L'oléiculture remonte à l'invention de l'agriculture. Les premiers cultivateurs du néolithiques étaient cueilleurs du fruit de l'oléastre, l'olivier sauvage. Cette plante est, à l'état naturel, originaire du Bassin méditerranéen. Le fruit était consommé tel quel et en huile.

À l'époque, c'était la seule matière grasse que l'on pouvait transporter sur de longues distances. Les peuples marchands (Phéniciens, Grecs...) seront de grands propagateurs de la culture de l'olivier. À l'époque de Rome, l'arbre est cultivé sur tout le pourtour de la Méditerranée, en Mésopotamie et sur les rives de la mer Noire. Pendant des millénaires, la culture est maintenue et le commerce en est florissant. C'est à l'avènement de l'économie anglosaxonne venue de pays utilisant le beurre, que le marché de l'huile d'olive commence à décliner. (**Frederic P et al, 2010**)

2. Production des olives

2.1. Dans le monde

Il se récolte 3.269.249 tonnes d'olives chaque année, dont 750 000 tonnes comme olives "de table" à manger, et le reste pour faire de l'huile d'olive (**Niaounakis, 2006**). En 50 ans, la production et la consommation mondiales d'huile d'olive ont triplé, passant de 1 à 3 millions de tonnes. L'Europe est un acteur important de ce marché avec l'Espagne, premier producteur mondial, et la Grèce, premier pays consommateur. Face à la baisse de la production européenne, due aux mauvaises conditions climatiques (sécheresse de l'été et douceur de l'hiver), la Tunisie est devenue le premier exportateur mondial en 2015 (**COI, 2016**).

Tableau1. Production mondiale d'olive

Principaux pays producteurs			
Année 2003	Production (en tonnes)	Superficie cultivée (en hectares)	Rendement (q/Ha)
Monde	17 317 089	8 597 064	20,1
1. Espagne	6 160 100	2 400 000	25,7
2. Italie	3 149 830	1 140 685	27,6
3. Grèce	2 400 000	765 000	31,4
4. Turquie	1 800 000	594 000	30,3
5. Syrie	998 988	498 981	20,0
6. Tunisie	500 000	1 500 000	3,3
7. Maroc	470 000	550 000	8,5
8. Égypte	318 339	49 888	63,8
9. Algérie	300 000	178 000	16,9

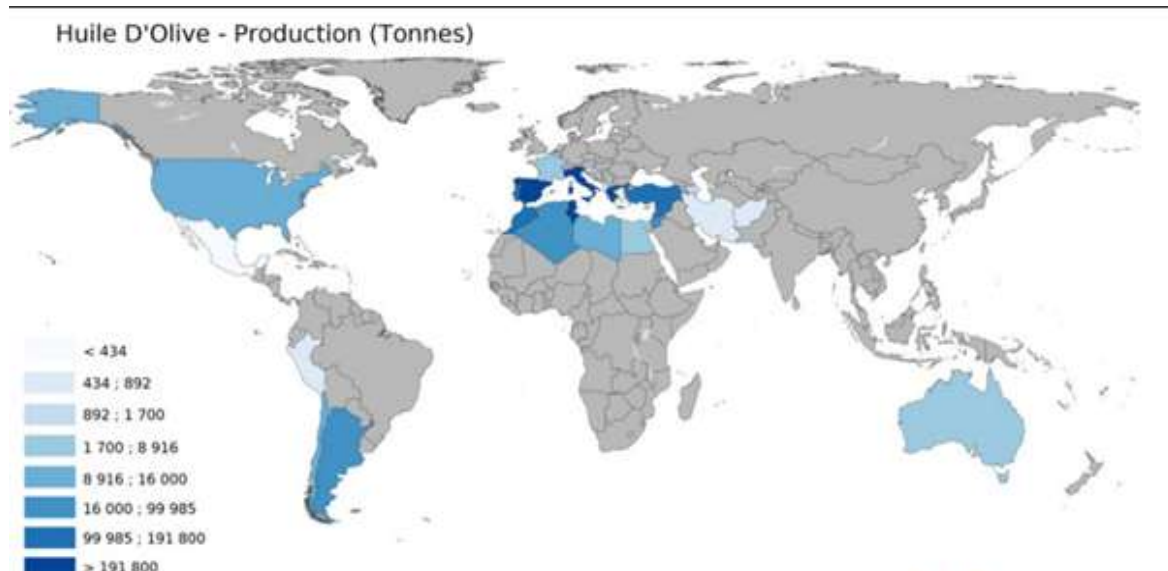


Figure 1. Répartition de la production de l'huile d'olive dans le monde (FAO,2016)

2.2. En Algérie

Durant les 30 ans qui ont suivi l'indépendance, l'oléiculture fut abandonnée et le paysan livré à lui-même. Malgré une prise de conscience salvatrice, quoique tardive, l'évolution des plantations est insignifiante

La production a été de 2.928.812 qx d'olive de table, de 3.915.794 qx d'olive à huile, la production d'huile avait atteint 685.215 hl en 2017. Etalée sur une superficie globale de 432.916 hectares comprenant 60.969.641 d'arbres, dont 36.117.825 oliviers en production, la filière oléicole avait enregistré en 2017 un rendement de 19 kg/arbre et 17,5 litres/ql. (APS, 2017)

Tableau 2. Les wilayas potentielles productrices d'olives pour l'année 2017

Les wilayas	Production (qx)
Mascara	800.000
Tlemcen	730.000
Bejaia	600.551

Source : APS

2.3. A Laghouat

La wilaya de Laghouat a, dans le souci de diversifier sa production agricole et contribuer au développement économique local et national, lancé d'autres expériences agricoles, à l'instar de l'oléiculture qui, bien qu'entamée timidement, a connu ces dernières années plusieurs extensions de ses surfaces.

Les expériences d'oléiculture, faites au début à petite échelle à des fins de lutte contre la désertification et avec des récoltes modestes, se sont multiplié donnant lieu à des productions, au titre de la saison 2010-2011, de plus de 20.000 quintaux d'olives sur une surface oléicole de 832 ha parmi une superficie globale de plus de 1.525 ha plantés en oliviers à travers la wilaya de Laghouat.

Les services de l'agriculture et des forêts a visé, à la faveur du programme quinquennal de développements 2010-2014, d'étendre la surface oléicole à plus de 25.000 autres hectares répartis à travers les différentes communes de la wilaya. La DSA s'emploie, dans le cadre de la mise en œuvre de la stratégie nationale de développement de cette filière à travers le pays, à l'intensification des campagnes de sensibilisation en vue d'améliorer les rendements et la productivité et d'attirer de nouveaux investissements. (*El mouwatin, 2012*)

2. Caractéristiques de l'olivier

L'olivier est un arbre polymorphe, de taille moyenne. Très rameux, au tronc noueux, au bois dur et dense, à l'écorce brune crevassée, il peut atteindre quinze à vingt mètres de hauteur, et vivre très longtemps. Il s'adapte aux conditions extrêmes de l'environnement, mais exige une intensité lumineuse importante et un sol aéré (*Ghedira, 2008*).

L'olivier, arbre typiquement méditerranéen, se caractérise par un fruit, l'olive, dont l'huile est un composant essentiel du régime méditerranéen. Riche en acides gras insaturés, en vitamine E et en polyphénols (notamment en hydroxytyrosol), l'huile d'olive présente essentiellement des propriétés antioxydantes, antihypertensives, antiagrégantes plaquettaires responsables d'effets préventifs des maladies cardiovasculaires (*Ghedira, 2008*).



Figure 2. Aspect générale de l'olivier (Anonyme, 1897).

La consommation régulière de cette huile a des effets bénéfiques dans certains troubles de l'appareil digestif et hépatobiliaire, dans l'ostéoporose, dans la prévention du vieillissement et dans le renforcement du système immunitaire. L'huile d'olive exerce un effet protecteur vis à vis de certaines tumeurs malignes et diminue l'incidence de certains types de cancer (*Ghedira, 2008*).

3. Botanique

3.1. Description du végétal

L'olivier est toujours vert, ses dimensions et ses formes varient avec les conditions climatiques, l'exposition, la fertilité du sol, les variétés mais si on le laisse végéter seul il prend couramment une forme pyramidale, peut atteindre 12 à 15 mètres de hauteur et son tronc se maintient le plus souvent élancé (*Maillard, 1975*) de bas en haut, l'olivier se présente ainsi :



Figure 3. Arbre de l'olivier (Anonyme, 2010).

3. 1.1. Les feuilles

Persistantes, opposées, coriaces, ovales oblongues, à entières et un peu enroulés, portées par un court pétiole ; elles sont vert grisâtres, à vert sombre dessous blanchâtres et à une seule nervure dessous. Très souvent, elles contiennent des matières grasses, des cires, des chlorophylles, des acides (gallique et malique), des gommes et des fibres végétales (Amouretti,1985).



Figure 4. Les feuilles de l'olivier (Anonyme, 2017).

3.1.2. Les fleurs

Elles sont gamopétales, très petites, d'un blanc tirant vers le vert, réunies en grappes auxiliaires inversées de chaque côté à base de chaque pédoncule (**Amouretti, 1985**). La formule florale est de 4 sépales incomplètement soudés ; 4 pétales linéaires ; 1 androcée à 2 carpelles concrescents en un ovaire à 2 loges – 2 ovules (**Roque, 1959**).



Figure 5. Les fleurs d'olivier (Anonyme, 2007).

3.1.3. Système racinaire

Il s'adapte à la structure des sols et n'émet des racines profondes que si les conditions d'alimentation sont difficiles. Il reste généralement, à une profondeur de 50 à 70 cm. Ce système racinaire de l'olivier forme sous le tronc une souche ligneuse très importante dans laquelle s'accumulent des réserves, surtout si les conditions de son alimentation sont difficiles, cette souche est appelée la matte.

3.1.4. Le fruit

La période de la mise à fruit s'installe d'octobre à novembre ; les fruits sont ovoïdes gros (1.5 à 2cm), longtemps verts, puis noirs à complète maturité, de formes variables suivant les variétés à pulpes charnues huileuses (**Rol et M. Jacamon, 1968**). En allant de l'extérieure vers l'intérieure, le fruit est constitué de l'épicarpe (peau), mésocarpe (pulpes ou chair), l'endocarpe (paroi du noyau)

et le noyau à amande huileuse (**Bonnier , 1990**).



Figure 6. Les fruits d'olive (Anonyme, 2014).

4. Classification

L'olivier appartient à la famille des oléacées, qui comprend 30 genres et 600 espèces selon la classification de (**Conquist, 1981**), *Olea europaea*, est la seule espèce portant des fruits comestibles. La sous-espèce *europaea* est différente de la sous-espèce *Oleaster* à laquelle appartiennent des oliviers sauvages (**Chevalier, 1948 et Ciferri, 1950 in ZOUIRECH, 2015**). L'olivier présent la classification suivante **Pagnol (1975)**:

- ❖ **Règne** : Plantae
- ❖ **Sous règne** : Tracheobionta
- ❖ **Embranchement** : Spermaphytes (phanégames)
- ❖ **Sous Embouchement** : Angiospermes
- ❖ **Classe** : Dicotylédones
- ❖ **Sous classe** : Astéridées (ou gamopétales)
- ❖ **Ordre** : Gentianales
- ❖ **Famille** : Oleacée
- ❖ **Genre** : *Olea*
- ❖ **Espèce** : *Olea europaea*

A photograph of three dark, glossy olives and several green olive leaves. The olives are arranged in a cluster, with one in the foreground and two slightly behind it. The leaves are light green and elongated, some showing a slight yellowing at the tips. The background is a plain, light color.

Chapitre II.

Les feuilles de l'olivier

II. 1. Caractéristiques des feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier sont opposées, ovales allongées, portées par un court pétiole, coriaces, entières, enroulées sur les bords, d'un vert foncé luisant sur la face supérieure, et d'un vert clair argenté avec une nervure médiane saillante sur la face inférieure. Le feuillage est persistant, donc toujours vert, mais cela ne veut pas dire que ses feuilles sont immortelles. Elles vivent en moyenne trois ans puis jaunissent et tombent, principalement en été.

En cas de sécheresse, les feuilles sont capables de perdre jusqu'à 60% de leur eau, de réduire fortement la photosynthèse et de fermer les stomates permettant les échanges gazeux pour réduire les pertes en eau par évapotranspiration, permettant ainsi la survie de l'arbre au détriment de la production fructi-florale (*Mico et al .2005*).

II. 2. Historique d'utilisation des feuilles en médecine traditionnelle

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

II. 3. Intérêt des feuilles d'olivier pour la santé

La feuille d'olivier est un des hypotenseurs végétaux les plus intéressants. Les résultats d'essais menés sur des animaux indiquent que la feuille d'olivier a une action hypotensive. Cependant, un seul essai préliminaire a été publié. Réalisée auprès de 30 sujets souffrant d'hypertension artérielle, cette étude signale que la prise d'un extrait de feuille d'olivier durant trois mois a fait baisser la tension artérielle des participants (*Aydogan.2008 ; Cherif et al .1996*).

Les feuilles d'olivier, contiennent aussi des Flavonoïdes (antioxydant), ces antioxydants aident à neutraliser les radicaux libres, et jouent un rôle important dans la protection de la paroi artérielle (*Aydogan.2008*).

De plus, les feuilles d'olivier ont une action préventive sur l'artériosclérose et les maladies coronariennes, par ces propriétés elles diminuent le mauvais cholestérol (LDL) en

augmentant le bon (HDL), ce qui en fait un inestimable complément du traitement du diabète non insulino-dépendant ***Cherif et al .1996***).

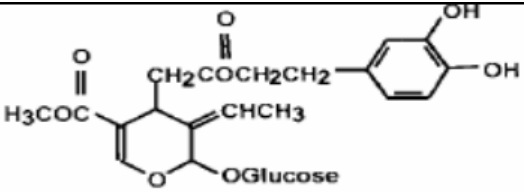
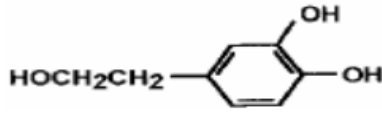
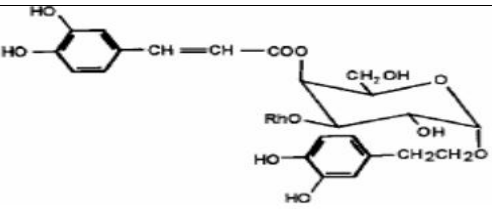
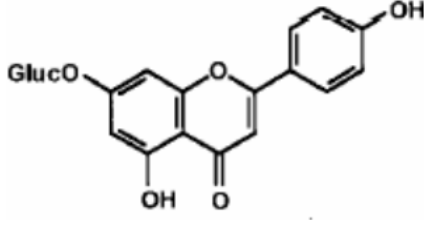
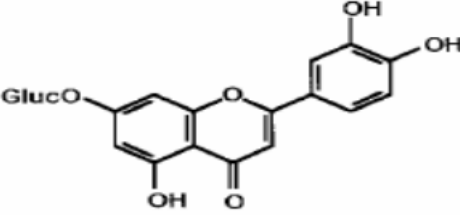
II. 4. Composition chimique des feuilles d'oliviers et propriétés

La composition chimique des feuilles et brindilles varie en fonction de nombreux facteurs (variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, proportion de bois, 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 guère 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%) (***Civantos, 1983***).

La feuille d'olivier est riche en triterpènes, flavonoïdes, sécoiridoides dont l'oleuropéoside et en phénols. Elle exerce des activités antioxydantes, hypotensives, spasmolytiques, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes et antiseptiques, outre les propriétés diurétiques pour lesquelles elle est utilisée sous forme de spécialité phytothérapeutique (***Gonzalez, et al,1992***).(***Zarzuelo et al , 1991***.)

Les phénols présents dans les feuilles d'olivier (Tableau 3) sont essentiellement l'hydroxytyrosol, Tyrosol, Catechin, acide caféique, acide vanillique, vanilline, Rutine, Lutéolin-7-glucoside, Verbascoside, Apigenin-7-glucoside, Diosmetin-7-glucoside, Oleuropéine, et la Lutéoléine (***Benavente-Garcia et al, 2000***).

Tableau 3. Structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants des feuilles d'olivier

Composé phénolique	Composé phénolique
Oleuropéine	
Hydroxytyrosol	
Verbascoside	
Apigenin-7-glucoside	
Lutéolin-7-glucoside	

II. 5. Valeur alimentaire des feuilles et application dans l'alimentation animale

Les feuilles d'olivier sont largement utilisées dans l'alimentation des animaux (chèvre, vœux....).

La digestibilité de la matière organique (MO) est en moyenne de 50%, mais varie fortement selon la proportion de rameaux dans le mélange et le mode de conservation.

Ces deux facteurs agissent de façon déterminante sur la digestibilité et donc la valeur nutritive des résidus de la taille. Depuis les travaux de **Maymone et al. (1950)** (**Maymone et al, 1950**), on sait que la digestibilité des résidus de la taille diminue fortement après le séchage au soleil ou l'ensilage.

La digestibilité des feuilles sèches est de 30 à 50%, alors que pour les feuilles vertes, elle est de 50 à 60%. Distribués en vert, les feuilles et rameaux sont bien ingérés par les animaux, sans problèmes d'adaptation ni de troubles. Toutefois certains auteurs rapportent (**Gomes cabrer et al, 1982**) des ingestions fortes variables de 24 à 80 g de MS par kg de poids métabolique.

A photograph of three dark, glossy olives and several green olive leaves, arranged in a cluster. The olives are dark purple-black with a smooth, reflective surface. The leaves are elongated and green, some showing slight yellowing at the tips. The background is a plain, light color.

Chapitre III.

Les composés phénoliques

III. 1. Définition

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes.

Le terme polyphénols a été introduit en 1980, en remplacement au terme ancien de tanin végétal (vegetable tannin), et a été défini par comme suit : « Composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines. » (**Wikipedia, 2009**). Il s'ajoute à cette définition le fait qu'ils possèdent un pouvoir antioxydant élevé.

III.2. Activité biologique des composés phénoliques

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical et biotechnologique où on leur reconnaît des activités anti-virales, antitumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, anticancéreuses et antimicrobiennes.

III.2.1. Effet antimicrobien

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 (**Bisignano et al, 1999**). Dans le cadre de cette étude, 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. Ces données montrent que, outre l'emploi potentiel de ses principes actifs comme additifs alimentaires ou dans des programmes intégrés de prise en charge de parasites, *Olea europaea* peut être considéré comme une source potentielle d'agents antimicrobiens prometteurs pour le traitement des infections des systèmes gastro-intestinal ou respiratoire de l'homme. La feuille d'olivier elle-même est un fongicide et contient un antibactérien l'oleuropéine, qui protège l'arbre des champignons et moisissures (**Bisignano et al, 1999**).

III.2.2. Effet antiallergique

Ces effets sont attribués à l'influence des polyphénols sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles (*Di Carlo et al, 1999*).

III.2.3. Effet anti-inflammatoire

Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysine agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (*Landolfi et al, 1984*).

III.2.4. Effet antiulcéreux

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques (*Di Carlo et al, 1999*).

III.2.5. Effet anticancéreux

Présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert, la catéchine a montré une activité anti-tumorale (*Bracke et al, 1991*). Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe les croissances cellulaires en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones (*Larocca et al, 1994*).

La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres (*Landolfi et al, 1984*). En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène (*Scutt et al, 1987*) et inhibe l'activité de la collagénase (*Makimura et al, 1993*).

III.2.6. D'autres effets biologiques

Les polyphénols peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (**Chaudhy et al, 1983**) Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (**Ong et al, 1997**) ;(**Ong et al, 2000**).

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires (**Chu et al, 1992**).

Les effets anti-viraux des flavonoïdes ont été également démontrés. D'autres essais in vitro ont permis d'observer que l'oleuropéine des feuilles d'olivier a des propriétés antioxydantes (**Baycin et Altiok, 2007** ;**Al-Azzawie et al, 2006** ; **Wojcikowski et al 2007**).



Partie 2.

Etude expérimentale

I. Méthodologie de travail

Lieu de réalisation du travail

Le travail expérimental, subdivisé en plusieurs étapes a été réalisé en 3 différents lieux :

- ✓ L'échantillonnage a été fait sur terrain (Ain-Madhi et El-Assafia).
- ✓ La caractérisation biochimique, l'extraction des phénols totaux, leur dosage ainsi que l'étude de l'activité antioxydante ont été fait au laboratoire de recherche des sciences fondamentales à l'université de Laghouat.
- ✓ L'étude de l'activité antibactérienne et a été réalisée au laboratoire de microbiologie du département de biologie à l'université Ammar Telidji Laghouat.

Schéma de l'étude expérimentale

Les étapes de cette étude expérimentale sont résumées dans la figure 7.

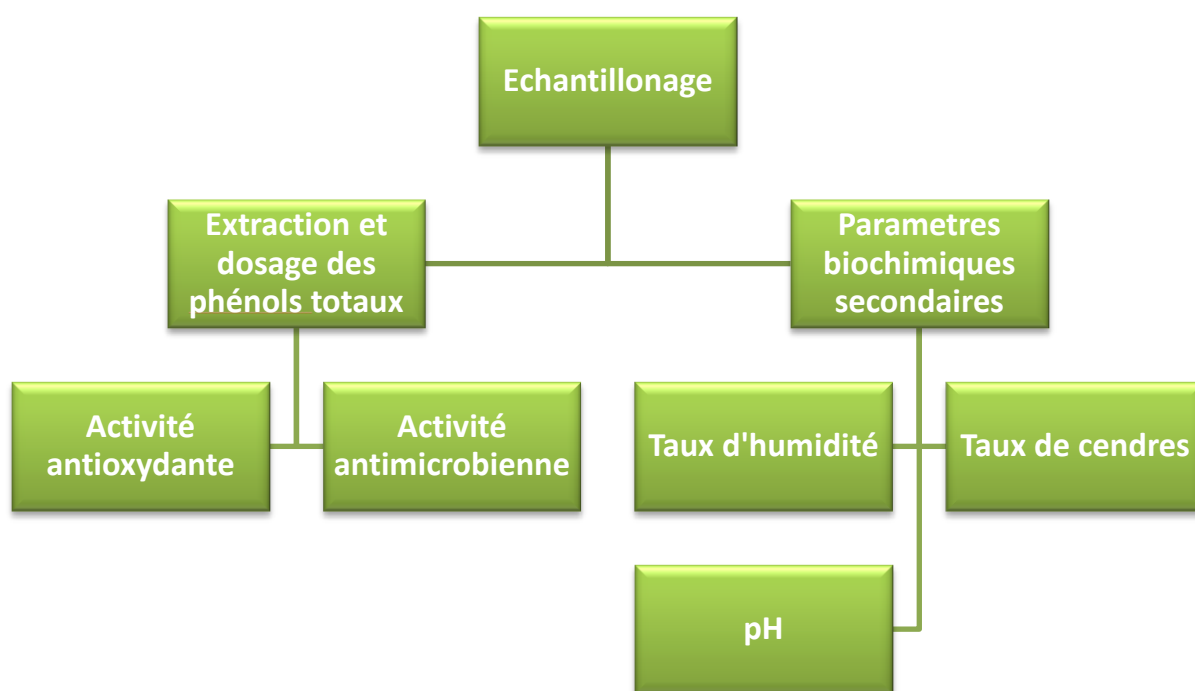


Figure 7. Schéma de l'étude expérimentale

II. Matériel biologique

II.1. Echantillons

Nous avons choisis de faire notre étude sur 2 variétés présentes au niveau local.

Variété	Importance/Fréquence locale	Autre signalisation en Algérie
Chemlal	Fréquent	Abondant dans Tizi Ouzou
Sigoise	Abondant	Abondant dans Sig (Mascara)

Source :CNIS

II.2. Mode d'échantillonnage

Il n'existe pas de méthode d'échantillonnage normalisée. L'échantillonnage a été fait de manière à ce qu'il soit le plus représentatif possible. Quelques feuilles de chaque arbre sur différentes branches et à différents niveaux de hauteurs.



Figure 8. Photo d'un arbre utilisé dans l'expérience de la variété Sigoise (Ain-Madhi)

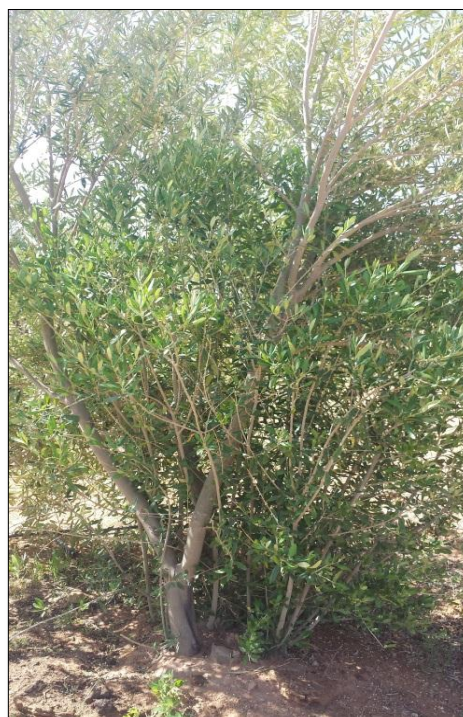


Figure 9. Photo d'un arbre utilisé dans l'expérience de la variété Chemlal (El-Assafia)

II.3. Période d'échantillonnage

L'échantillonnage a été fait durant la période printanière de l'année 2019.

III. Analyses biochimiques

III. 1. Matériel

III. 1. 1. Liste et réactifs utilisés

Nous avons utilisé les réactifs suivants :

- ✓ Ethanol
- ✓ Méthanol
- ✓ Acétate d'éthyle
- ✓ Ether de pétrole
- ✓ Folin-Ciocalteu

III.1.2. Principaux outils et appareils utilisés

- ✓ Balance de précision type KERN
- ✓ Etuve ventilée type MEMMERT
- ✓ Four à moufle type FURNACE 1300
- ✓ Mixeur MOULINEX
- ✓ Evaporateur rotatif type BUCHI R-200
- ✓ pH mètre type EUTECH
- ✓ Agitateur magnétique-plaque chauffante Fisher Scientific
- ✓ Bain marie MEMMERT

III.2. Méthodes

III.2.1. Teneur en eau

La teneur en eau a été déterminée par dessiccation d'un échantillon de 2g dans une étuve isotherme à une température de $70^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ à pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'une masse constante de l'échantillon. La teneur en eau est égale à la perte de masse subie dans les conditions de mesure.

$$H\% = \frac{M1 - M2}{P} \times 100$$

M1 : La masse initiale en g « (matière fraîche +capsule) avant dessiccation ».

M2 : La masse finale en g « (matière sèche +capsule) après dessiccation ».

P : La masse de la prise d'essai.

La teneur en matière sèche MS% est calculée selon la relation :

$$MS\% = 100 - H\%$$

III.2.2. Cendres

Lors de la minéralisation par voie sèche, l'échantillon est déposé dans un creuset, en porcelaine (environ 2 g). La matrice alimentaire est détruite dans un four à moufle à 500 °C pendant 4 heures (*Greenfield et Southgate, 2007*).

$$\text{Teneur en cendre} = \frac{M2 - M0}{M1 - M0} \times 100$$

M0 : Poids du creuset vide (g)

M1 : Poids (Creuset+ échantillon) avant incinération (g)

M2 : Poids (Creuset + Cendres) après incinération (g)

III.2.3. pH

On a placé 15 g dans un contenant et on a y ajouté 60 ml d'eau distillée. On a par la suite chauffé au bain-marie à 60° C pendant 30 minutes en remuant de temps en temps puis

procéder à la détermination du pH en utilisant un pH-mètre à 20° C +/- 2 ° C après étalonnage de l'appareil (*Bousdira, 2007*).

II.2.4. Extraction des phénols totaux

Les feuilles ont été séchées puis broyées dans un mixeur. Nous avons obtenu des poudres pour les 2 variétés. Après les avoir pesées 2 g de chacune nous avons procédé à l'extraction.

Pour l'extraction, chaque échantillon a été mélangé avec 100 ml d'éthanol-eau dans les proportions (80 /20 : v/v). L'extraction à reflux a duré 6h puis le contenu des ballons a été filtré et évaporé pour n'avoir que la phase aqueuse. L'éthanol a été récupéré à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Comme le montre la figure 10 deux autres lavages ou extraction aux solvants organiques avec des solvants à polarité croissante ont suivis (avec une ampoule à décanter). L'un avec l'éther de pétrole et l'autre avec l'acétate d'éthyle. A la fin on obtient une phase aqueuse et une fraction qu'on récupère avec 5 ml de méthanol. (*Marie-JosBphe Amiot et al,1986*).

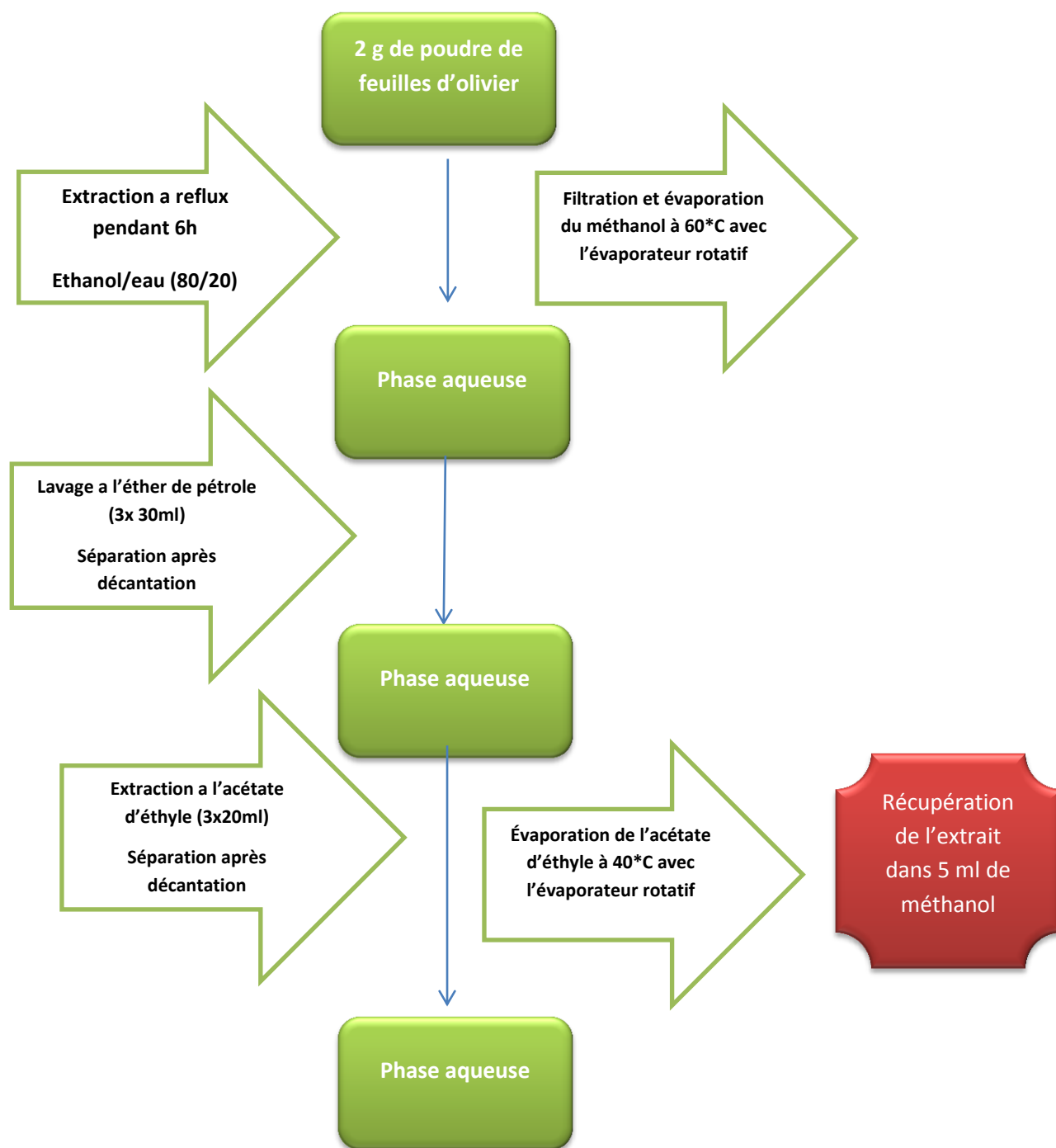


Figure 10. Protocole de préparation des extraits des feuilles

II.2.5. Dosage des composés phénoliques totaux

La teneur en phénols totaux a été réalisée par une méthode adaptée par **Singleton et Ross (Lamaison, 1990)**. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de phénols totaux présents dans le milieu.

Pour le dosage : On introduit 100 µl de l'extrait additionné de 500 µl de réactif Folin-Ciocalteu (à 10%) et de 50 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 4% dans un tube à essai. On agite puis incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et la lecture se fait à 760 nm contre un blanc.

Une gamme de 9 concentrations d'acide gallique allant de 0,02 à 0,32 mg /ml a été préparée à partir d'une solution mère de concentration 0.5 g/l. La concentration en phénols totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

IV. Activités biologiques

IV.1. Matériel

IV.1.1. Matériel biologique et réactifs utilisés

Les extraits utilisés pour ces tests sont ceux obtenus des extractions des feuilles avec l'acétate d'éthyle et solubilisé dans le Méthanol.

Nous avons fait le choix de tester nos extraits sur 6 souches bactériennes dont la moitié est de Gram + et l'autre de Gram -. Les souches bactériennes ont été obtenues au niveau du laboratoire d'analyse microbiologique de l'hôpital Ahmed Ben Adjila de Laghouat. Elles ont été conservées par la suite au réfrigérateur dans des tubes à essai sur milieu de conservation.

Nous avons utilisé les réactifs et milieux suivants :

- ✓ Méthanol
- ✓ DMSO
- ✓ Chloramphenicol
- ✓ Gélose nutritive
- ✓ Cristal violet
- ✓ Lugol
- ✓ Fushine
- ✓ Alcool
- ✓ DPPH

IV.1. 2. Principaux outils et appareils utilisés

- ✓ Bain marie MEMMERT
- ✓ Micropipette 100-1000 µl ACCUMAX PRO
- ✓ Micropipette 20-200 µl DRAGON LAB
- ✓ Etuve ventilée type MEMMERT
- ✓ Four Pasteur type JOUAN et Autoclave FULGENS AND LAUMOND
- ✓ Autoclave
- ✓ Microscope optique

IV.2. Méthodes

IV.2.1 Activité antioxydante

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante in-vitro de nos extraits des composés phénolique a été réalisée par le piégeage du radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) (Fig. 11).

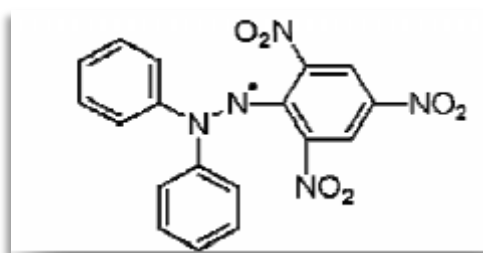
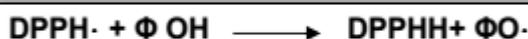


Figure 11. Structure du radical libre DPPH•

Le DPPH est un radical de couleur violet intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne) se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH (*Tirzitis et al, 2010 Prior et al. 2005*). L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Sanchez-Moreno **Sanchez-Moreno (Sanchez-Moreno, 2002)**.



L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs Control} - \text{Abs Extrait})}{\text{Abs Control}}$$

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective IC₅₀ (ou l'inverse 1/IC₅₀) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH dans le milieu réactionnel (*Popovici et al., 2009*).

On teste l'action des échantillons de feuilles afin de savoir s'ils ont un rôle antiradicalaire (scavenging activity). On prépare 7 dilutions de chaque extrait ensuite un volume de 1 ml des différentes concentrations de chaque extrait exprimées en g/l est ajouté à 1 ml de la solution méthanolique du DPPH (250 µ molaire = 0.025 g/l) préparée. La lecture est faite à 517nm après 30 min à l'obscurité.

Pour la comparaison on a choisi l'acide ascorbique (ou vitamine C). Une gamme de 9 concentrations allant de 0,0025 à 0,0225 mg /ml a été préparée à partir d'une solution mère de 0,025 g/l de concentration. La lecture se faisant après 30 minutes d'obscurité.

IV.2. 2. Coloration de Gram

Voici succinctement les différentes étapes de cette coloration :

- Coloration par le cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincer à l'eau
- Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincer à l'eau déminéralisée.
- Décoloration (rapide) à l'alcool est l'étape la plus importante de la coloration : verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration.
- Recoloration à la fuchsine. Mettre de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 50 °C.
- Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement $\times 1000$).

IV.2. 3. Activité antimicrobienne d'extrait

- ♣ **Préparation des milieux de culture** (voir annexe 1)
- ♣ **Stérilisation du matériel**

On stérilise à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes : L'eau distillée et les tubes à essai utilisés dans la préparation de la solution bactérienne (coloration de Gram), les tubes à hémolyse pour la préparation des solutions et les embouts à micropipettes.

On stérilise à four pasteur à 121° C pendant 15 minutes : Les disques en papier Whatman (6 mm de diamètres) après enrobage dans du papier aluminium et la pince ainsi que les pipettes Pasteur.

♣ **Préparation des dilutions des extraits à tester**

Ces extraits organiques ont été dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Le test a été effectué à différentes concentrations des extraits : 0.5g/l, 0.25g/l et 0.125g/l.

♣ **Protocole d'évaluation de l'activité antibactérienne (test de sensibilité)**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion en gélose dite méthode de diffusion de disques (**Institut Pasteur d'Algérie, 2008**).

➤ **Préparation de l'inoculum**

La suspension est faite ainsi : On prélève des colonies avec une anse pour la décharger dans un tube à essai contenant de l'eau distillée stérile. On compte les colonies avec une cellule de Malassez et on effectue des dilutions jusqu'à obtention de d'une concentration de 10^6 germe/ ml.

➤ **Ensemencement et dépôt des disques**

- ✓ On a coulé la gélose nutritive dans les boîtes de Pétri et séchée avant l'emploi.
- ✓ On a prélevé à chaque fois un volume de 100 µl de l'inoculum et le décharger dans les boîtes de Pétri contenant le milieu GN.
- ✓ A partir d'une pipette Pasteur stérile, on a fabriqué un râteau et s'en servir pour étaler l'inoculum sur toute la surface de la gélose de façon homogène (en tournant la boîte de 60° à chaque fois).
- ✓ Les disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre sont imprégnés d'une petite quantité des extraits et ensuite déposés sur la surface de la gélose inoculée (après séchage).
- ✓ Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.
- ✓ Un antibiogramme avec un antibiotique (Le chloramphénicol qui est sous forme de disques prêts à l'emploi) a été effectué pour servir de témoin positif afin de permettre la comparaison de nos résultats.

- ✓ Des tests préliminaires ont été effectués afin de s'assurer que les autres facteurs (DMSO, méthanol) n'interviennent pas dans l'activité antibactérienne. Ils se sont révélés négatifs.

➤ **Lecture des antibiogrammes**

La lecture des antibiogrammes a été faite à l'aide d'un pied à coulisse. Un extrait est considéré actif lorsqu'on aperçoit une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 6 mm et à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée.

V. Analyses statistiques

L'étude de la signification des différences est faite grâce au logiciel d'analyses statistiques « **R** » (*CC BY-NC-SA 3.0 FR*).

Nous avons utilisé pour les graphes l'Excel (Microsoft® Office 2010 Proofing Tools)



Résultats et discussion

1. Taux d'humidité

En observant la figure 12 on constate que le taux d'humidité des feuilles de variété de Chemlal est plus élevé que celui de la variété de Sigoise. Celui de ce dernier est de 56.3 % du poids frais des feuilles du poids frais des feuilles.

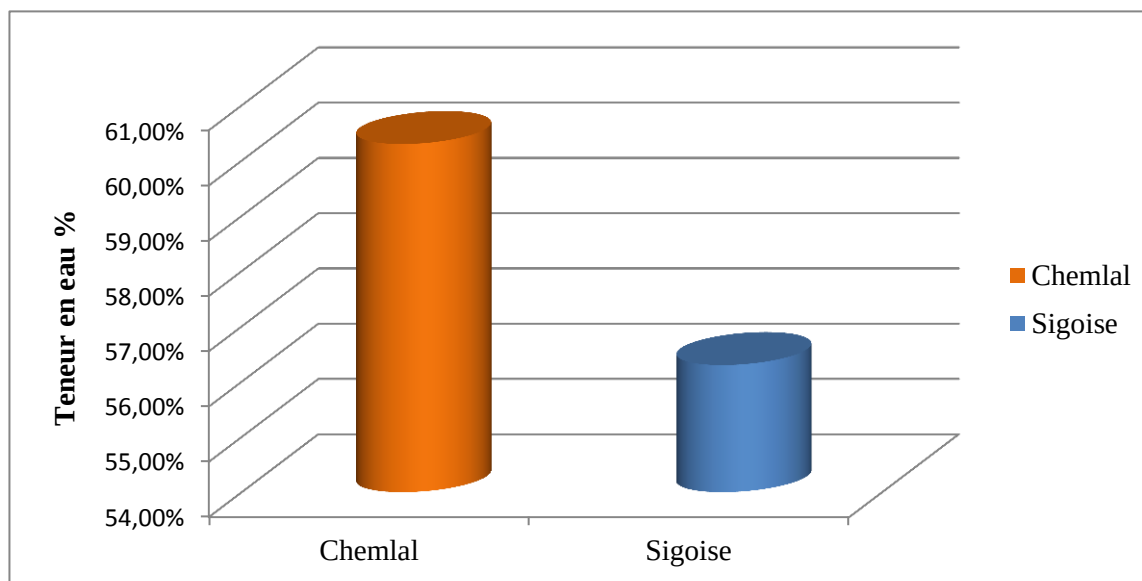


Figure 12. Taux d'humidité des feuilles

En effet, nous avons remarqué que la teneur en eau obtenue pour la variété Chemlal est de 60.3% du poids frais des feuilles. Cette valeur est élevée par rapport à l'étude faite par **(Boudhioua et al, 2008)** qui l'a trouvé de 49,75%.

Rappelons que la teneur en eau dépend la conduite culture et des conditions edapho-climatiques. En cas de sécheresse, les feuilles sont capables de perdre jusqu'à 60% de leur eau, de réduire fortement la photosynthèse et de fermer les stomates permettant les échanges gazeux pour réduire les pertes en eau par évapotranspiration, permettant ainsi la survie de l'arbre au détriment de la production fructi-florale **(Ghedira, 2008)**.

2. Taux de cendres

Selon la figure 13, on remarque qu'il y a une différence entre les feuilles des deux variétés. Le taux de cendre de la variété Chemlal est très semblable à celui trouvé dans la bibliographie.

La variété Sigoise étant la plus riche en cendres avec une valeur de 10.5%, constitue une source intéressante en éléments minéraux et en particulier en : K, Ca, Na et Mg (*Boudhrioua et al,2009*).

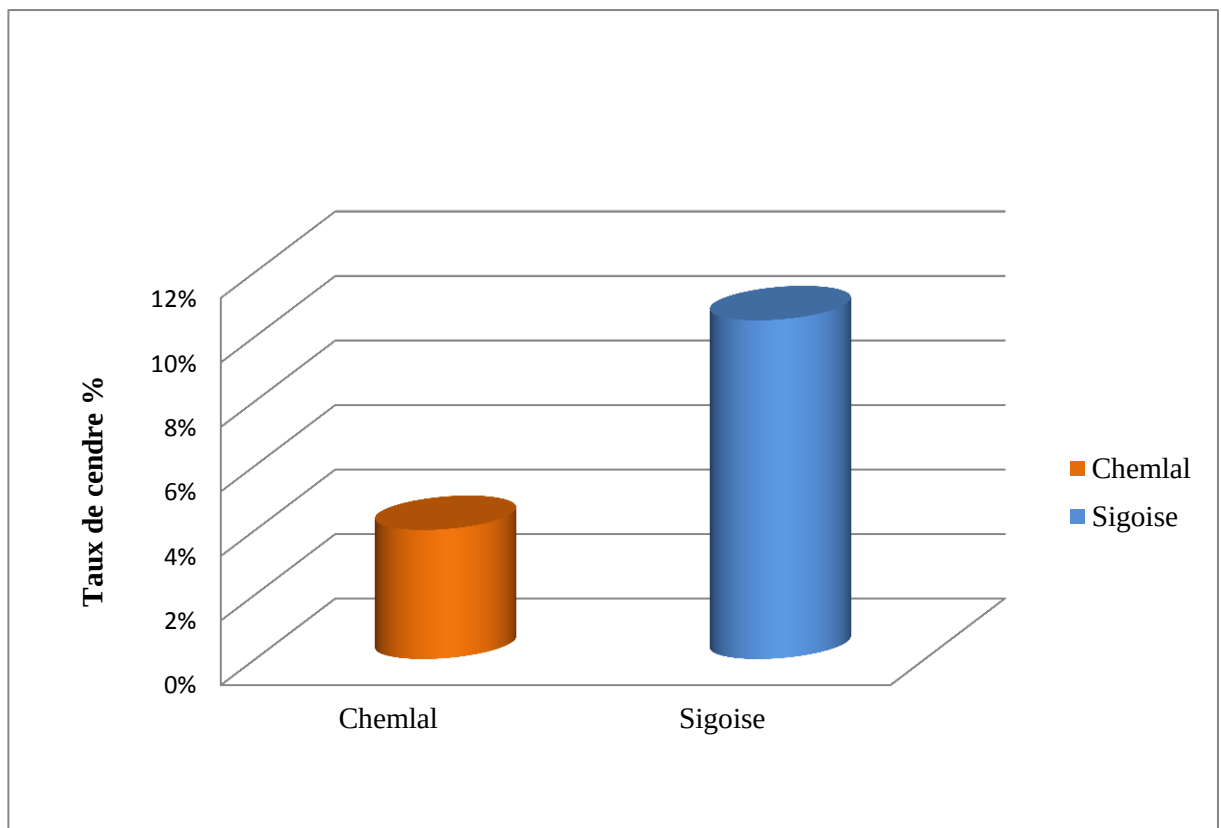


Figure 13. Taux de cendres des feuilles

3. pH

Les valeurs de pH obtenues sont représentées dans le diagramme qui suit :

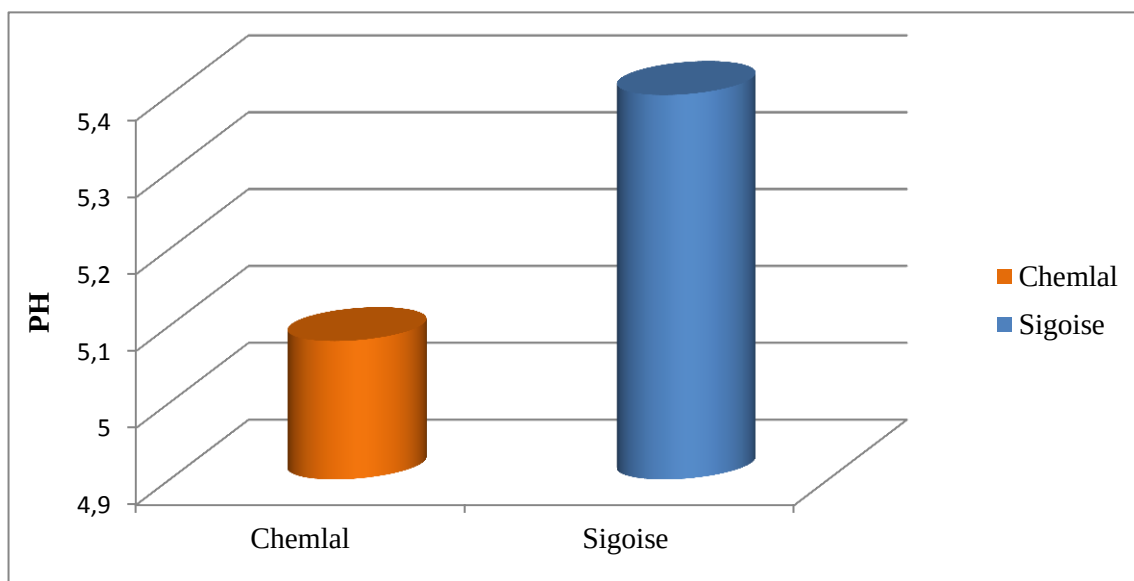


Figure 14. Représentation des valeurs de pH des variétés de l'étude

Les feuilles de la variété Chemlal présentent une acidité plus élevée par rapport à ceux de la variété Sigoise 5.4. L'acidité peut être due à la présence d'acides phénoliques et d'autres acides organiques.

4. Rendement de l'extraction

La figure 41 représente l'extraction à reflux d'un échantillon dans un mélange méthanol-eau (80 /20 : v/v), elle a durée 6h. En général, la plupart des phénols simples présents dans la vacuole peuvent aisément être extraits avec le mélange méthanol/eau (80/20, v/v) (*Collin et al., 2011*). L'eau et le méthanol sont des solvants protéiques polaires.

Ensuite deux autres lavages ou extraction aux solvants organiques avec des solvants à polarité croissante ont suivis (avec une ampoule à décanter). L'un avec l'éther de pétrole (solvant peu polaire) qui va entraîner les pigments chlorophylliens et caroténoïdes (*Collin et al., 2011*) ainsi qu'une partie des composés phénoliques de faible polarité. L'autre avec l'acétate d'éthyle (polarité moyenne). L'acétate d'éthyle va attrapez les composés phénoliques (*Collin et al. 2011*).



Figure 15 : poudre des feuilles

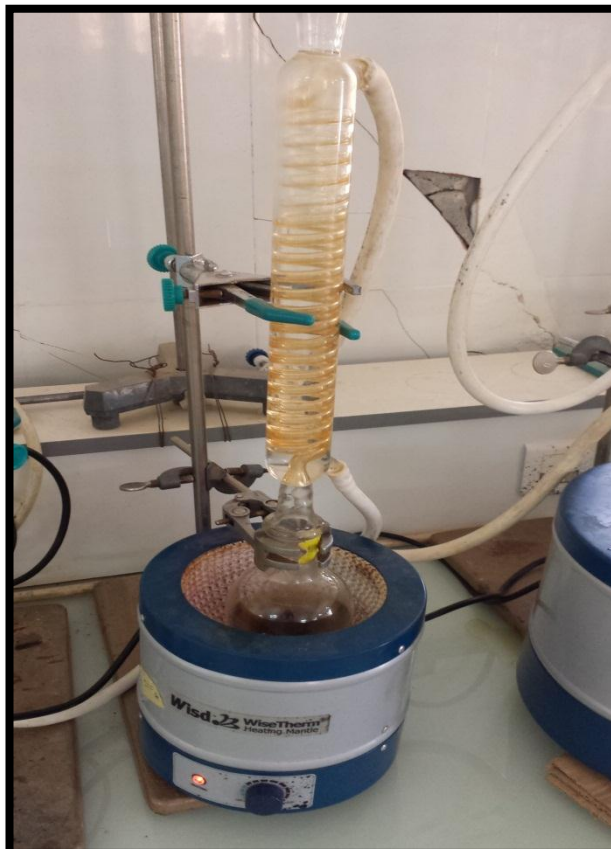


Figure 16 : Montage montrant l'extraction à reflux des phenols totaux

Au final on obtient 2 phases aqueuses et 2 fractions qu'on récupère chacune avec 5 ml de méthanol, après la vaporisation par évaporateur rotatif. Les extraits obtenus ont les couleurs suivantes : jaune foncé pour Chemlal et vert pour la variété Sigoise.



Figure 17 : les deux extraits des feuilles

5. Taux de phénols totaux

La figure 18 représente la courbe d'étalonnage de l'acide gallique qui a été réalisée afin de calculer les concentrations des extraits en composés phénoliques totaux.

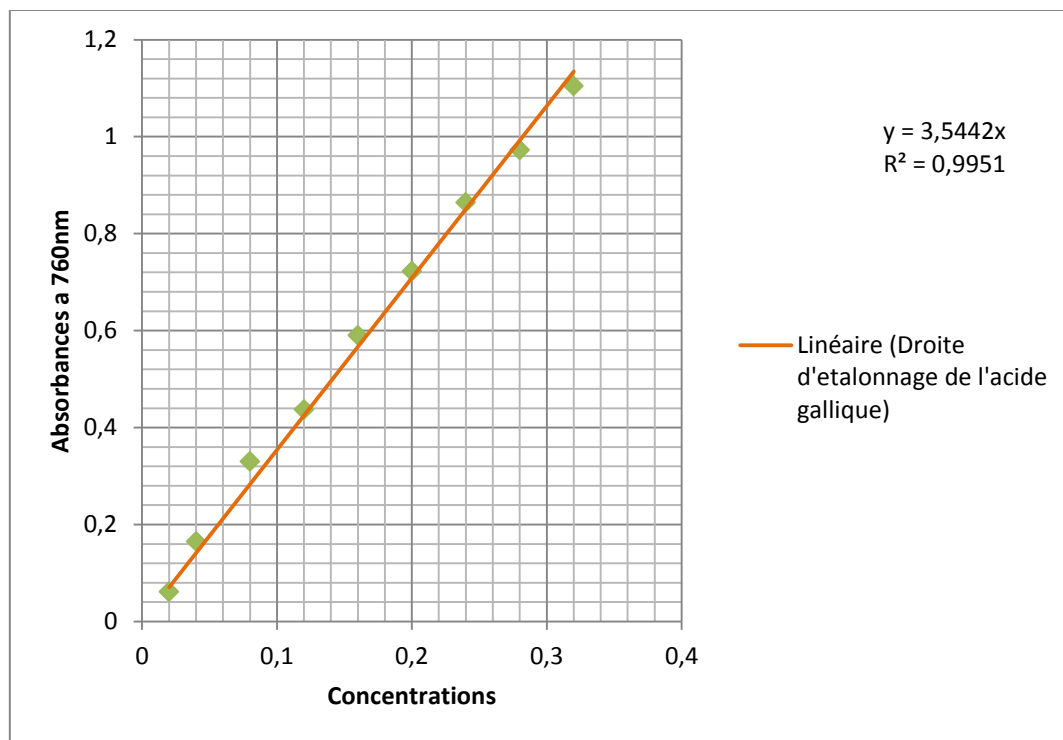


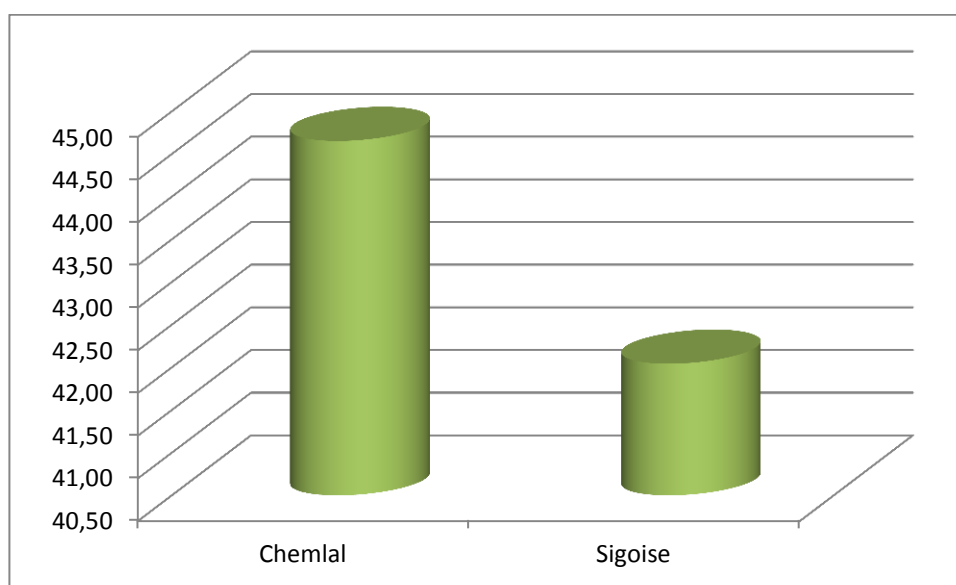
Figure 18. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

L'estimation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu qui donne une coloration bleue. L'intensité de cette dernière est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu.

La figure 19 représente une comparaison des teneurs en composés phénoliques des échantillons de feuilles extraits avec l'acétate d'éthyle. On peut voir que les valeurs obtenues dépendent de la variété

Tableau 4. Teneurs moyennes en composés phénoliques totaux des extraits

	Chemlal	Sigoise
mg/ml	$0,89 \pm 0,01$	$0,84 \pm 0,02$
mg d'équivalent d'acide gallique / 100g de feuille sèches	$44,65 \pm 0,35$	$42,04 \pm 1,13$
mg d'équivalent d'acide gallique/100g de feuilles fraîches	$17,73 \pm 0,21$	$21,13 \pm 0,56$

**Figure 19. Comparaison des teneurs en phénols totaux des deux extraits (mg d'équivalent d'acide gallique/100g de feuilles sèches)**

Nous avons vérifié si la différence était significative selon le test de Student calculé dans R. Les résultats s'est révélé positif donc la différence des deux concentrations des deux extraits issues des deux variétés est bien réelle.

La teneur en polyphénols des feuilles de Chamlal est inférieure à celles des variétés

Chemlali et Chemchali de Tunisie qui est de l'ordre de 1,40 g/100 g de poudre de feuilles Rapportées par **Boudhrioua (2009)**.

La variation de la teneur en PT est souvent considérable elle est dépendante de plusieurs facteurs : des conditions climatiques et géographiques (**Mylonaki et al, 2008 ; Vasileios Ziogas et al, 2010**), des variétés d'olivier, des conditions de culture et du degré de maturation (**Boudhrioua et al, 2009 ; Vasileios Ziogas et al, 2010**), de l'état physiologique et l'âge de la plante (**De Leonardis et al., 2008**).

Plusieurs études ont montré la contribution considérable de ces facteurs liés à l'altitude sur la voie de biosynthèse des composés phénoliques sur divers variétés d'oliviers. (**Vasileios Ziogas et al., 2010**).. Comme exemple avec la variété Amfissis (Konservolia) de Grèce, cultivée à 10 et 300mètres d'altitude, la teneur en composés phénoliques au stade des olives vertes est de $2,5 \pm 0,11$ mg (EAG/g d'olives) à 10 et 300 mètres d'altitudes, cette teneur diminue au stade des olives pourpres avec une teneur de $1,9 \pm 0,05$ mg/g. Alors qu'elle augmente au stade des olives noirs à 300 mètres d'altitudes avec une teneur de $2,9 \pm 0,16$ mg/g en comparaison à celle obtenue à 10 mètres d'altitudes qui est de $2,3 \pm 0,15$ mg/g (**Bouaziz et al. 2004**) ont noté une augmentation des composés phénoliques dans l'olive de la variété Chemlali de Tunisie au dernier stade de maturation à 10 et 300 mètres d'altitude.

De plus, le rendement d'extraction dépend de la polarité du solvant utilisé, qui détermine la quantité, la qualité des composés phénoliques extraits et de la classe des phénols dans le matériel végétal (**Naczka et Shahidi, 2004 ; Sineiro et al, 2008**). Des études ont rapportés que les hauts rendements sont habituellement obtenus avec l'éthanol et le méthanol et leurs mélanges avec l'eau. En effet l'eau joue un rôle important dans le processus d'extraction des PT en augmentant leur diffusion des tissus végétaux (**Alouk et al., 2008**). D'après, (**Savarese et al. 2007 ; Chew et al. 2009**), le méthanol est le solvant de choix pour l'extraction des PPT à partir des fruits, végétaux et huiles. Grâce à sa polarité et sa capacité à réduire l'activité des polyphénol-oxydases, ce solvant a prouvé son efficacité d'extraire les PPT simples (**Ryan et al, 2001 ; Abad-Garcia et al, 2007**). Quand à l'acétate d'éthyle, c'est un solvant très sélectif pour les molécules de bas (180 Da) et moyen (13KDa) poids moléculaire (**Obeid et al., 2005**). De plus, (**Ait Baddi et al. 2008**). ont démontré que l'acétate d'éthyle exerce lui aussi un haut pouvoir d'extraction. Il contribue

aussi à l'élimination des fractions protéiques, glucidiques et acides organique qui peuvent interférer avec l'extrait phénolique.

6. Pondération des fractions

La figure 20 montre une représentation générale des pourcentages de composés phénoliques dans la fraction totale récupérée avec le solvant.

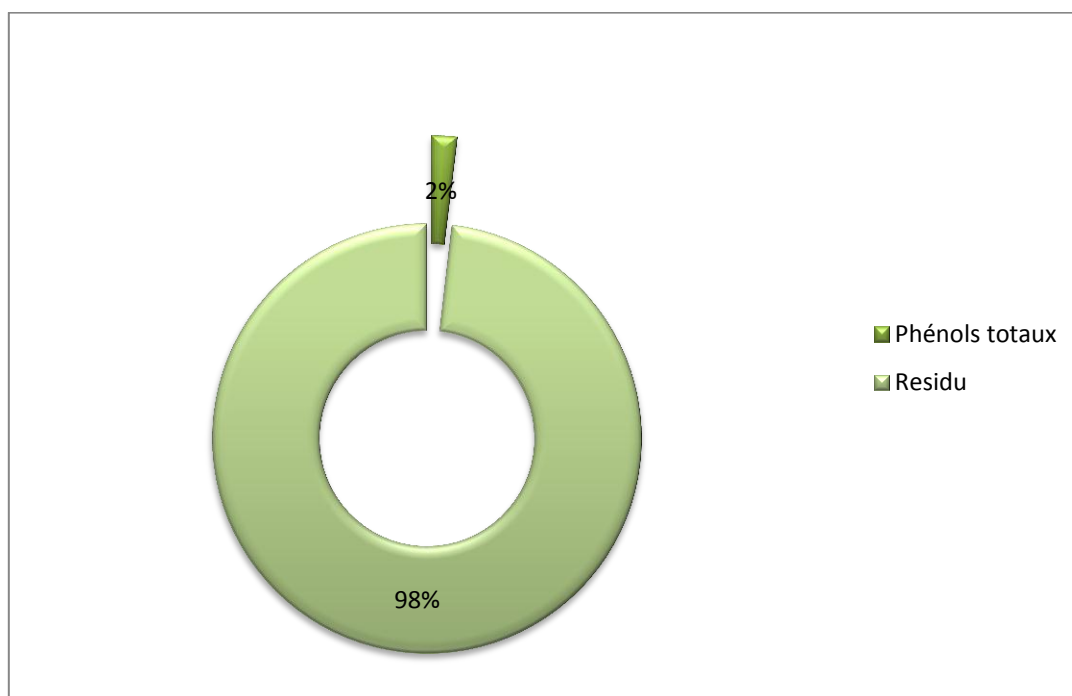


Figure 20. Représentation des pourcentages de la fraction totale, des composés phénoliques de extrait 1 (Chemlal)

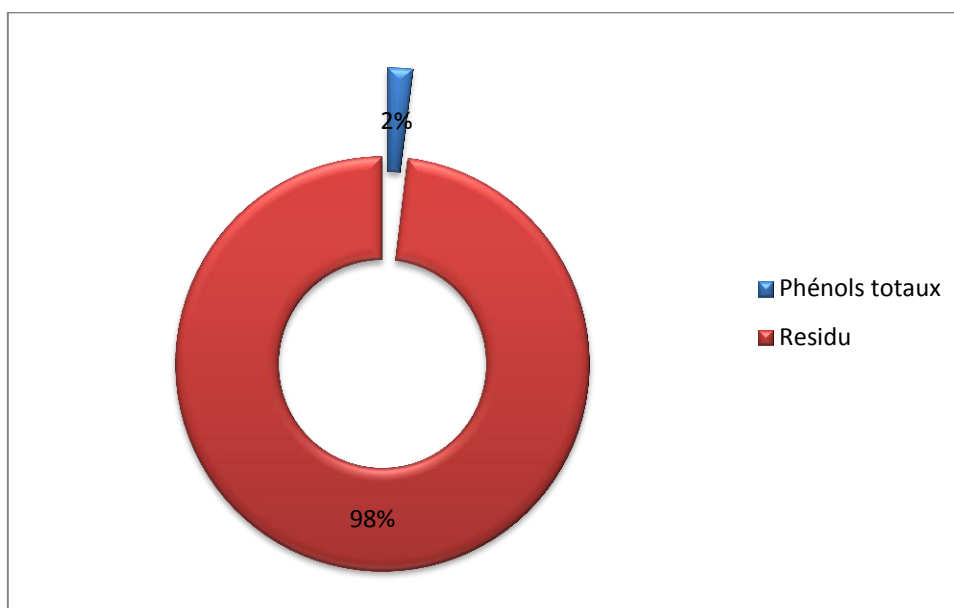


Figure 21. Représentation des pourcentages de la fraction totale, des composés phénoliques de extrait 2 (Sigoise)

Elle suggère que les solvants sont loin d'être sélectifs pour l'attraction des composés phénoliques et qu'une purification est nécessaire pour éviter les interférences au cours de la lecture au spectrophotomètre.

La figure 21 pourrait aussi suggérer que l'utilisation d'un seul standard tel que l'acide gallique pourrait être limitatif et qu'une confirmation par analyse HPLC pourrait compléter l'étude.

7. Activité antioxydante des extraits de feuilles

Les potentiels antioxydants des différents extraits méthanoïques sont exprimés par IC₅₀ : Plus la valeur de l'IC₅₀ est faible, plus le potentiel antioxydant de l'extrait est fort. Les valeurs sont déterminées graphiquement à partir d'une courbe linéaire présentant le pourcentage d'inhibition (I%) en fonction des concentrations croissantes de l'extrait.

Tableau 5. Tableau représentant les IC50 des extraits comparés à celui de la vitamine C

	IC50 (mg/ml) ou (g/l)
Vitamine C	0,007
Chemlal	372,3
Sigoise	130,1

D'après les valeurs obtenues, l'extrait de feuilles de Sigoise présente une IC50 inférieure à ceux de l'extrait de Chemlal, et donc une activité meilleure. Les IC50 obtenu pour l'acide ascorbique, utilisé comme molécule de référence, est bien plus inférieur à ceux des extraits, est donc, l'acide ascorbique possède une activité antioxydante très élevé. Les extraits ont relativement un bon pouvoir antioxydant. Les mêmes résultats ont été obtenus dans le travail de **(Bouderballah, 2014)**.

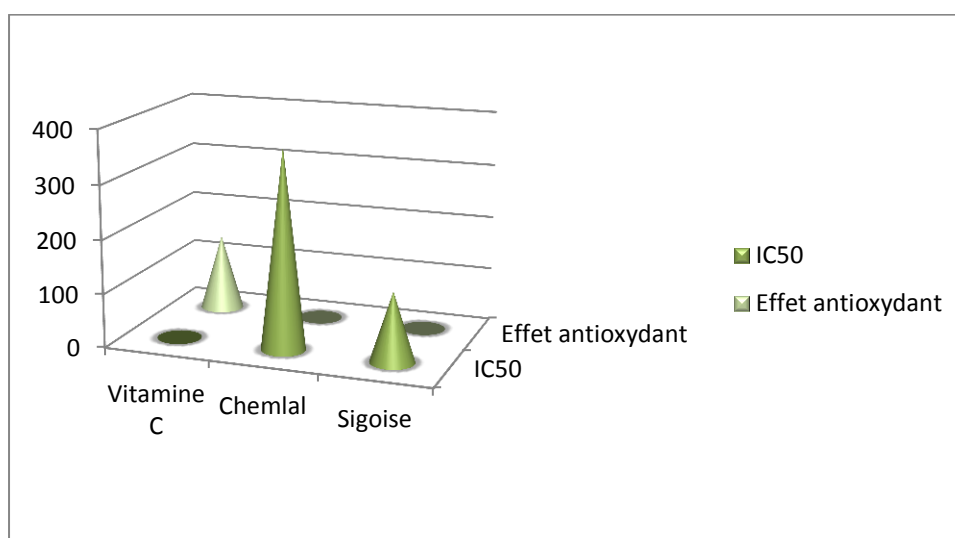


Figure 22. Figure représentant la comparaison entre les extraits et la vitamine C

9. Activité antibactérienne des extraits des feuilles

Les souches bactériennes ont montré plus ou moins une sensibilité à l'antibiotique standard testé (Témoin positif): Le Chloramphénicol (Tab. 8) :

Tableau 6. Diamètre de la zone d'inhibition de la souche par l'antibiotique (mm)

Chloramphénicol (30 µg/disque)	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 23857™	11.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25922™	24.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 19429™	18.5

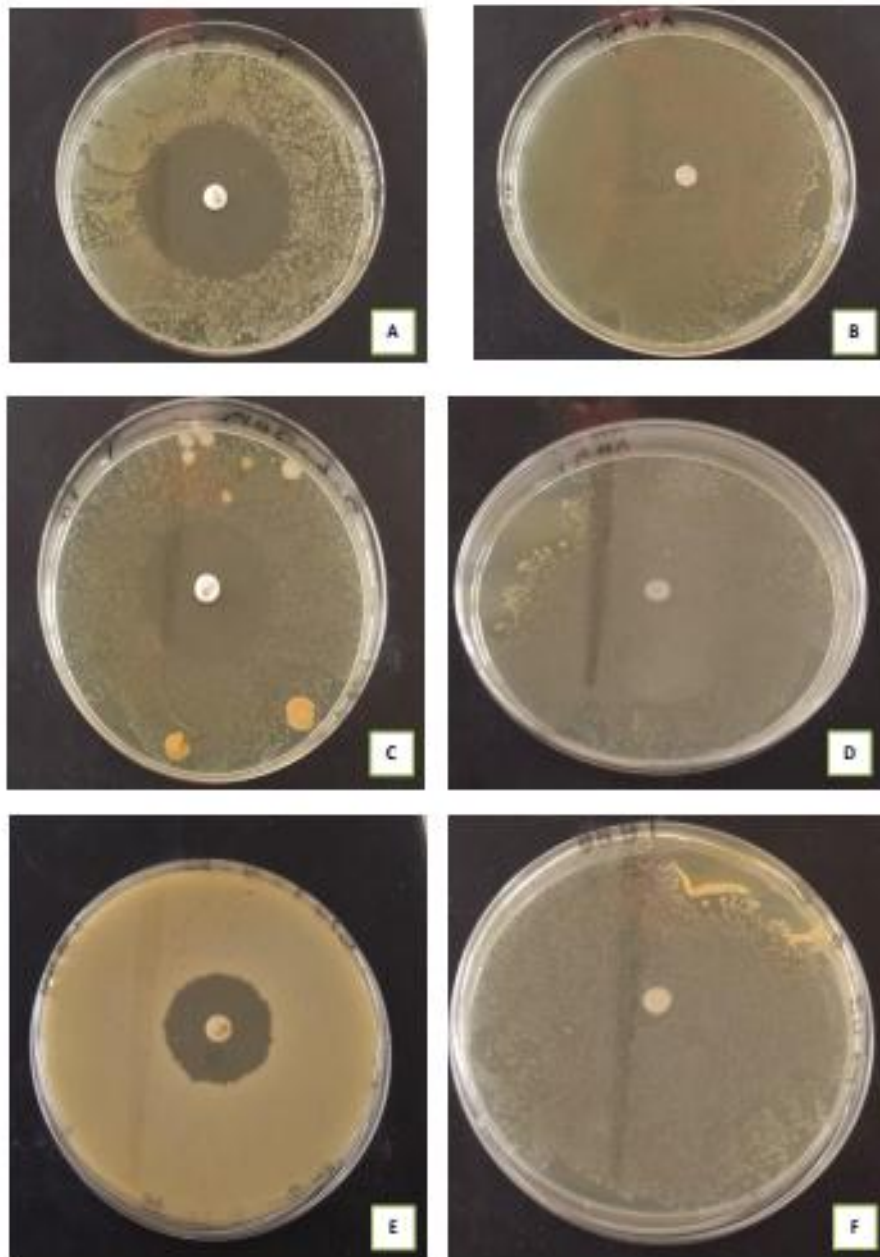
Le tableau ci-dessous rassemble les résultats obtenus par le test de sensibilité de 6 souches aux extraits de feuilles des différentes variétés.

Tableau 7. Résultat d'inhibition des souches par les extraits feuilles

	Chemlal			Sigoise		
	0,125 g/l	0,25 g/l	0,5 g/l	0,125 g/l	0,25 g/l	0,5 g/l
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-

- Résultat négative + résultat positive

Les extraits de feuilles d'olivier n'ont montré aucune activité antimicrobienne contre les bactéries testées et nous n'avons obtenu des résultats positifs dans aucune des concentrations.



1-3-5 extrait 1 et 2-4-6 extrait 2

Figure 24. Photo des cultures des bactéries (A,B *Staphylococcus aureus*. C,D *Pseudomonas aeruginosa*. E,F *Bacillus subtilis*) dans les deux cas des témoins (Chloramphénicol et DMSO).

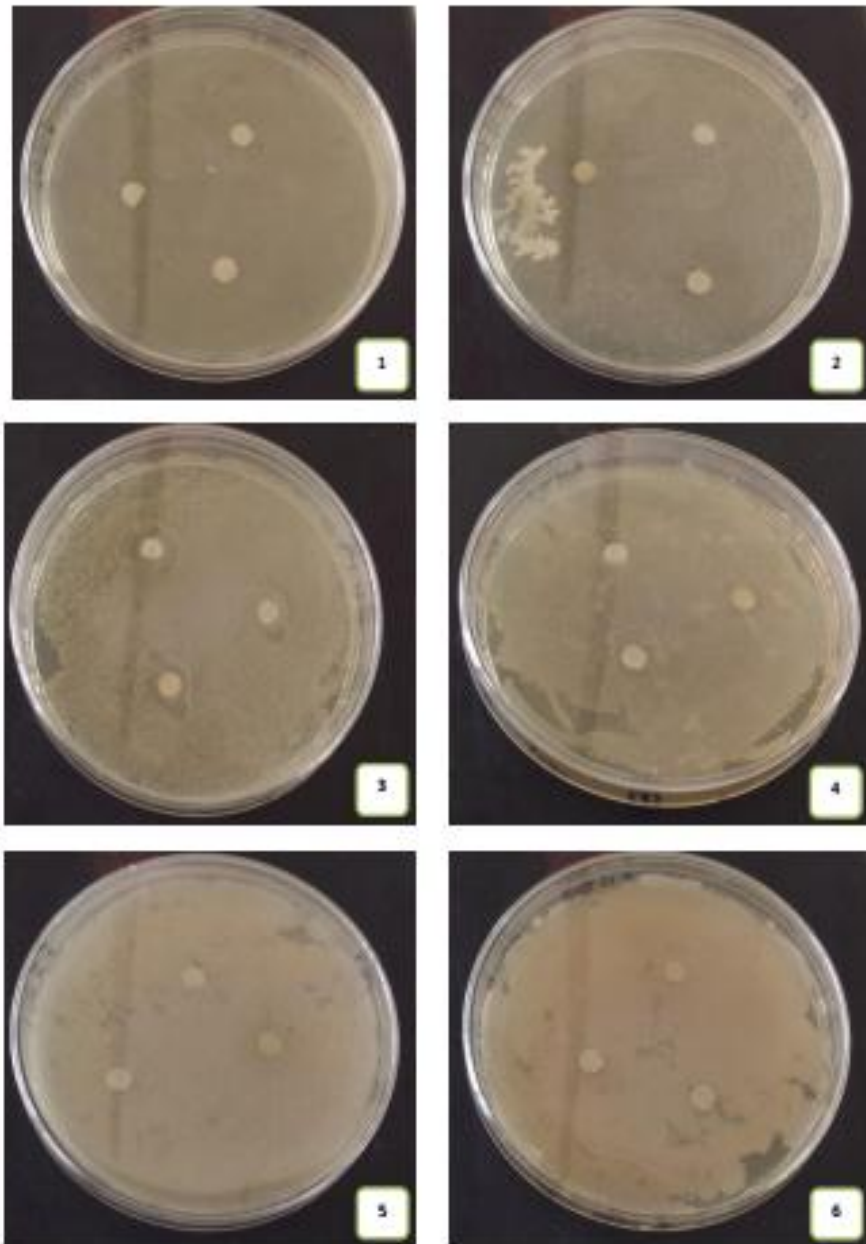


Figure 25. Photo des cultures des bactéries (1,2 *Staphylococcus aureus*. 3,4 *Pseudomonas aeruginosa*. 5,6 *Bacillus subtilis*) dans les deux cas de extraits avec concentration deferent (0.5 g/l , 0.125 g/l et 0.25g/l) (1,3 et 5 l'extrait 1).(2,4 et 6 l'extrait 2)

Il n'existe aucune corrélation entre les pouvoirs antioxydants de nos extraits de feuilles et leurs pouvoirs antibactériens. Il est évident que les composés phénoliques ne sont pas tous dotés d'un pouvoir antimicrobien. Une petite différence dans la stéréochimie d'une molécule peut être la cause d'un effet biologique négatif ou positif (**Grotewold, 2006**).

Le mécanisme d'action des composés phénoliques sur ces agents pathogènes n'est pas bien connu, les études exploitées par **Domineco (Domineco et al., 2005)**, ont mené à conclure que l'effet antimicrobien des composés phénoliques est dû partiellement à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte (fuite) de ses organites intracellulaires, en plus des caractéristiques physicochimiques de ces composés (la solubilité dans l'eau et la lipophilie) peuvent influencer cet effet antibactérien.

Des auteurs ont avancé que l'activité antibactérienne des composés phénoliques est due probablement à leur habilité à se combiner aux protéines solubles extracellulaires et ainsi aux parois cellulaires bactériennes (**Tsuchiya et al., 1996**).

Selon **Scalbert (Scalbert, 1991)**, cette défense microbienne vis-à-vis de la toxicité des tanins s'explique par

- La sécrétion par les microorganismes de polymères ayant une grande affinité pour les tanins avec lesquels ils se combinent spécifiquement ; les tanins deviennent alors incapables de se lier aux enzymes microbiennes ne pouvant pas ainsi inhiber la croissance de ces micro-organismes.
- La résistance de quelques enzymes à l'effet des tanins et c'est l'exemple de tannases et certaines invertases et alpha amylases dont l'activité n'est pas altérée en présence de fortes concentrations de tanins.

A Tizi-Ouzou, prouve que les extraits de feuilles d'olivier de la variété azerradj ont effet biologique contre *Pseudomonas aeruginosa*. Cela prouve que toutes les variétés n'ont

II. Résultats et discussion

pas la même composition phytochimique d'où la nécessité de tester plus de variétés issues de Laghouat.



Conclusion

Les pays méditerranéens, et en particulier l'Algérie, possèdent un patrimoine oléicole très important. Ceci nous a encouragés à étudier et proposer des voies de valorisation de cette biomasse renouvelable pour un développement durable du secteur oléicole et la contribution à la connaissance scientifique internationale dans ce domaine.

Les travaux de recherche de la 1ère partie ont été orientés vers un volet analytique. L'objectif de cette partie était d'effectuer la caractérisation biochimique de nos échantillons.

Étant donné que les feuilles d'olivier représentent une source d'oleuropéine (composé phénolique d'intérêt), nous avons examiné le potentiel anti-oxydant de nos extraits. Celui-ci s'est révélé assez important et on peut conclure des possibilités d'utilisation des feuilles d'olivier dans les différentes industries.

Les résultats obtenus dans la présente étude laissent apparaître que les deux variétés constituent une bonne source d'antioxydants naturels et pourraient être considérés comme un aliment fonctionnel ou ingrédient d'aliment fonctionnel.

Au terme des études microbiologiques, nous avons trouvé que les extraits des feuilles d'olivier ne montrent aucun effet antimicrobien contre les 6 germes pathogènes étudiés. Ces résultats, ne pouvant pas suggérer l'utilisation des extraits des feuilles d'olivier pour la préservation d'aliments.

L'absence de corrélation entre l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne nous amène à déduire que l'activité biologique ne peut être attribuée à la totalité des composés phénoliques, mais seulement à une partie d'entre eux, confirmant ainsi ce qui a été rapporté par plusieurs chercheurs.

En perspectives, il serait intéressant d'explorer les voies de recherches suivantes :

- ✿ Tester l'activité antimicrobienne d'extraits issues d'autre variétés.
- ✿ Optimiser les conditions de culture (la charge de l'inoculum, la concentration en ...).
- ✿ Déterminer la composition des extraits en composés phénoliques par la technique de l'HPLC.



Bibliographie

A

- Abad-garcia B., Berrueta L A., Lopez-marquez D.M., Crespo I., & Gallo B Vicent F. (2007). Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of chromatography*, 1154 (1-2), 87-96.
- Al-Azzawie HF., Alhamdani MS, Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits, *Life Sci* 2006, 78(12):1371-7.
- Altıok evren., Deniz baycini., Oguzbayraktar., Semra ulku .(2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62, 342–348.
- Amouritti M et Comet G., 1985. Le livre de l'olivier. Ed. Edisud.
- APS. Oléiculture : une production 6.844.606 quintaux (qx) en 2017. [Consulté le 15/07/2018]. [en ligne]. <http://www.aps.dz/economie/76300-oleiculture-une-production-6-844-606-quintaux-qx-en-2017>
- Ait baddi G., Cegarra J., Merlina G., Revel J.C., Hafidi M. (2008). Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste–wheat straw mixture. *Journal of Hazardous Materials*. Article in press
- Aydogan C, *Phytotherapy Research* 2008, 9:1239 - 1242.

B

- Baycin D., Altıok E, Adsorption of Olive Leaf (*Olea europaea* L.) Antioxidants on Silk Fibroin, *J Agric Food Chem* 2007, 55(4):1227-1236.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J.A, Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chemistry* 2000, 457-462.

- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A, Activité antimicrobienne in vitro de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol, *J Pharm Pharmacol* 1999, 51(8):971-4.
- Bonnier G., 1990. La grande flore de la France en couleur, édition : BARLIN, Tome 4.
- Bouaziz M., Chamkha M & Sayadi S. (2004). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5476–5481.
- N.Boudhrioua¹, I.BenSlimen, N.Bahloul, et N.Kechaou ;2008. Etude du séchage par infrarouge, de feuilles d'olivier d'origine tunisienne ;pp 113
- Boudhrioua, N. Bahloul, N. Ben Slimen, I. Kechaou, N. 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products*, vol. 29 ;pp 412-419
- Boudhrioua Nourhenf., Bahloul Neila., Ben slimen imen., Kechaou Nabil. (2009). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products*. Article in Press.
- Boudribila M- M., Les anciens Amazighs avant les phéniciens : Mode de vie et organisation sociale, *AWAL* n°29, 2004; 17- 31.
- Bousdira K., (2007). « Contribution a la connaissance de la biodiversité du palmier dattier pour une meilleure gestion et une meilleure valorisation », Mémoire de magistère, Département de technologie alimentaire, Boumerdès.
- Bracke M., Vyncke B., Opdenakker G., Foidart J.M., De Pestel G., Mareel M, Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion in vitro, *Clin Exp Metastasis* 1991, 9:13-25.

- Chaudhry P.S., Cabrera J., Juliani H.R., Varma S.D, Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin, *Biochem Pharmacol* 1983, 32:1995-1998.
- Cherif S., Rahal N, A clinical trial of a titrated Olea extract in the treatment of essential arterial hypertension, *J Pharm Belg* 1996, 69-71.
- Chevalifr A., 1948. L'origine de l'Olivier cultivé et ses variations in *Revue Internationale de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale* 28: pp1–25. 17.
- Chu S.C., Hsieh Y.S., Lin J.Y, Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity, *J Nat Prod* 1992, 55: 179-183.
- Ciferri A., 1950. Eléments pour l'étude de l'origine et de l'évolution de l'Olivier cultivé. Acte XII du Congrès international d'oléiculture 1:189–194.
- Civantos L, Valorisation des sous-produits de l'olivier, *Réunion du comité technique* (FAO) 1983, 143-145.
- CNIS. VARIETES D'OLIVES EN ALGERIE.2009. <http://www.olivier-elmoubaraka.dz/VARIETES.htm>
- COI « CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL ». (2014). Caractérisation des feuilles d'olivier, composition chimique d'huiles d'olive de différentes origines et traçabilité de l'huile d'olive. OLIVÆ N° 119, p49
- Collin S. et Jean Crouzet, (2011). « Polyphénols et procédés ». Edition Lavoisier. P. 337.

D

- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo, A.A., Capasso F, Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, Review. *Life Sci.* 1999, 65: 337-53.
- Djenane.D, Yangüela.J , Derriche.F, Bouarab.L, Roncales, P (2012). Extrait de feuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis* et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur

la viande de dinde. Article Pharmacologie/application à la nutrithérapie p 13

- Domenico T., Francesco C., Maria G.S., Vincenza V., Mariateresa C.D., Antonella S., Gabriela M. et Giuseppe B, (2005). « Mechanisms of antibacterial action of Three Monoterpenes ». *Antimicrob Ag .Chemother.* 49: 2474-2478.

E

- El Mouwatin. Culture de la pomme de terre et oléiculture à Laghouat : des expériences prometteuses. [Consulté le jeudi 12 juillet 2012]. [en ligne]. <http://www.elmouwatin.dz/?Culture-de-la-pomme-de-terre-et>

F

- Frederic P. Miller, Agnes F. Vandome, John McBrewster, 2010. Oléiculture: Olivier (arbre), Olive, Huile d'olive, Oléastre, Extraction de l'huile d'olive, Appellation d'origine Contrôlée

G

- Ghedira K, L'olivier, *Phytothérapie* 2008, 6: 83–89
- Gomes cabrera A., Parellada J., Garrido A. et Ocaña F, Utilisation des rameaux d'olives en alimentation animale. *Avance dans l'alimentation animale* 1982, 11 : 75-77.
- Gonzalez M., Zarzuelo A., Gamez J.M., Utrilla M.P., Jimenez J., Osuna I., Hypoglycemic activity of olive leaf, *Planta Med* 1992, 58 : 513–515.
- Greenfield H., Southgate D.A.T., (2007). « Données sur la composition des aliments : Production, gestion et organisation », Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome 2007. Seconde édition.
- Guerfel M, Ouni Y, Taamalli A, Boujnah D, Stefanoudaki E, Zarrouk M. (2009) : Effect of location on virgin olive oils of the two main Tunisian olive cultivars. *Eur. J. Lipid.Sci.Technol*, 111, 926–932

- Grotewold E., (2006). « The Science of Flavonoids ». Ed. Springer. Ohio.USA, 274p

H

- Hana F, 2009 . Effet de l'irradiation gamma sur les feuilles d'olivier et application dans les produits carnés. Mémoire de Diplôme National d'Ingénieur en Sciences Appliquées et en Technologie. biologie industrielle : Université du 7 novembre à Carthage

I

- Institut Pasteur d'Algérie, (2008). « Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale ».4ème édition, Alger, 116 p.

L

- Lamaison J. L. et Carnat C., (1990). Pharm. Acta. Helv., 1990, 65(11), 315-320.
- Larocca L.M., Giustacchini M., Maggiano N., Ranelletti F.O., Piantelli M., Alcini E., Capelli A, Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas, *J Urol*. 1994, 152: 1029-1033.
- Landolfi R., Mower R.L., Steiner M, Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations, *Biochem Pharmacol* 1984, 33:1525-1530.

M

- Makimura M., Hirasawa M., Kobayashi K., Indo J., Sakanaka S., Taguchi T., Otake S, Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity, *J Periodontol* 1993, 64:630-636.
- Maymone B., Sblendorio A., Ceci ginestrelli D, Recherche de la composition chimique, la digestibilité et la valeur nutritive des feuilles d'olives (*Olea europea*), *Food Chemistry* 1950, 4:1-19.

- Micol V., Caturla N., Pérez-Fons L., Más V., Pérez V., Estepa A, The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV), *Antiviral Research* 2005, 129-136.
- Marie - Jos Bphe Amiot, Annie Fleuriet, and Jean- Jacques Macheix (1986).Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation.J . *Agric Food Chem* Vol 34 (5) : 823-826.

N

- Naczk Marian & Shahidi Fereidoon. (2004).Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95–111.

O

- Obied H. K., Allen M. S., Bedgood D. R., Prenzler P. D., Robards K. & Stockmann R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 823–837
- Ong, K.C.; Khoo, H.E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats, *Life Sci* 2000, 67: 1695-1705.
- Ong K.C., Khoo H.E, Biological Effects of Myricetin, *General Pharmacol* 1997, 29:121-126.

P

- Pagnol J., 1975. Olivier, France, 95p.
- [3]Planétoscope .Production mondiale d'olives. [en ligne].
<https://www.planetoscope.com/fruits-legumes/1354-production-mondiale-d-olives.html>

- Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B., (2009). « Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH ». *Revue de génie industriel* 2009, 4, 25-39.
- Prior R., Wu X. et Schaich K., (2005). « Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements ». *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4290–4302.

R

- Reffye (Ph. de), Blaise (F.). — Modélisation de l'architecture des arbres. Applications forestières et paysagères. — *Revue forestière française*, vol. XLV, n° spécial "Informatique et Foresterie", 1993a, pp. 128-136.
- Rol R. & Jacamon M., 1988 - Flore des arbres, arbustes et arbrisseaux. Ed. La Maison rustique, Paris, p51
- Roque S, 1959- Entomologie oléicole. Ed. COI. 360 p.
- Ryan D., Lawrence H., Prenzler P., Antolovich M. & Robards K. (2001). Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Analytica Chimica Acta*, 21449, 1-11.
- Ryan D., Lawrence H., Prenzler P., Antolovich M. & Robards K. (2001). Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Analytica Chimica Acta* 445, 67–77.

S

- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8(3): 121-137
- Savarese M., De Marco E., Sacchi R. (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry*, 105, 761–770.

- Scalbert, A., (1991). « Antimicrobial properties of tannins ». *Phytochemistry*. 30(12): 3875–3883.
- Scutt A., Meghji S., Canniff J.P., Harvey W, Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis, *Experientia* 1987, 43: 391-393.

T

- Tirzitis G. et Bartosz G., (2010). «Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights ». Vol. 57, No. 1/2010 139–142.
- Tsagaraki E., Lazarides H. N., Petrotos K. B. (2007). Olive mill wastewater treatment. *In : Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food Industry* Springer US. pp133-157
- Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T. et Inuma M., (1996) . « Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* », 50: 27–34.

V

- Vasileios Ziogas., Georgia Tanou B., Athanassios Molassiotis A., Grigorios Diamantidis B., Miltiadis Vasil Akakis.(2010).Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry*, 120, 1097–1103

W

- Wikipédia en Français. Oléiculture.
<https://fracademic.com/dic.nsf/frwiki/1258411>
- Wojcikowski K., Stevenson L, Antioxidant capacity of 55 medicinal herbs traditionally used to treat the urinary system: a comparison using a sequential three-solvent extraction process, *J Altern Complement Med* 2007, 13(1):103-10.
- Wikipédia. *Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*.
<https://fr.wikipedia.org/wiki/Olivier>

Z

- Zarzuelo A., Duarte J., Jimenez J., Gonzalez M., Utrilla M.P., Vasodilator effect of olive leaf, *Planta Med* 1991, 57: 417–419.
- Zouirech O., 2015, Etude de la diversité génétique de variétés locales d'olivier, Licence Sciences & Techniques, Biotechnologie et Valorisation des PhytoRessources, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah faculté des sciences et techniques de Fes, 29p

A background image featuring three dark, glossy olives and a small green olive branch with several leaves. The image is centered and has a soft, slightly blurred appearance.

Annexe

Annexe 1. Composition des milieux de culture

Gélose nutritive

Pour 1 litre de milieu :

- **Extrait de viande..... 1,0g**
- **Extrait de levure2.5g**
- **Peptone5,0g**
- **Chlorure de sodium.....5,0g**
- **Agar15,0g**
- **pH = 7,0**

Annexe 2. L'information sur les deux variété étude

Sigoise

Caractères morphologiques

	● ARBRE Vigueur : Port : Densité du feuillage : Longueur des entre-nœuds :	moyenne dressé moyenne moyen	
	● FEUILLE Forme : Longueur : Largeur : Courbure longitudinale du limbe :	elliptique lancéolée longue moyenne plan	
	● INFLORESCENCE Longueur : Nombre de fleurs :	moyenne faible	
	● FRUIT Poids : Forme : Symétrie : Position du diamètre transversal maximal : Sommet : Base : Mamelon : Présence Lenticelles : Dimension Lenticelle : Début de la véraison : Couleur en pleine maturation :	faible ovoide léger asymétrique centrale pointu tronquée absent nombreuses petites uniformément noire	
	● ENDOCARPE Poids : Forme : Symétrie : A Symétrie : B Position du diamètre max : Sommet : Base : Surface : Nombre de sillons fibrovasculaires : Distribution sillons fibrovasculaires : Extrémité du sommet :	moyen elliptique asymétrique symétrique centrale pointue arrondie lisse moyen uniforme avec mucron	

Chemlal

Caractères morphologiques



ARBRE

Vigueur :
Port :
Densité du feuillage :
Longueur des entre-nœuds :

forte
dressé
moyenne
moyen



FEUILLE

Forme :
Longueur :
Largeur :
Courbure longitudinale du limbe :

elliptique lancéolée
moyenne
moyenne
plan



INFLORESCENCE

Longueur :
Nombre de fleurs :

moyenne
moyen



FRUIT

Poids :
Forme :
Symétrie :
Position du diamètre transversal maximal :
Sommet :
Base :
Mamelon :
Présence Lenticelles :
Dimension Lenticelle :
Début de la véraison :
Couleur en pleine maturation :

faible
allongée
asymétrique
centrale
pointu
arrondie
absent
nombreuses
petites
uniformément
noire



ENDOCARPE

Poids :
Forme :
Symétrie : A
Symétrie : B
Position du diamètre max :
Sommet :
Base :
Surface :
Nombre de sillons fibrovasculaires :
Distribution sillons fibrovasculaires :
Extrémité du sommet :

moyen
elliptique
léger asymétrique
symétrique
centrale
pointu
arrondie
lisse
moyen
uniforme
avec mucron

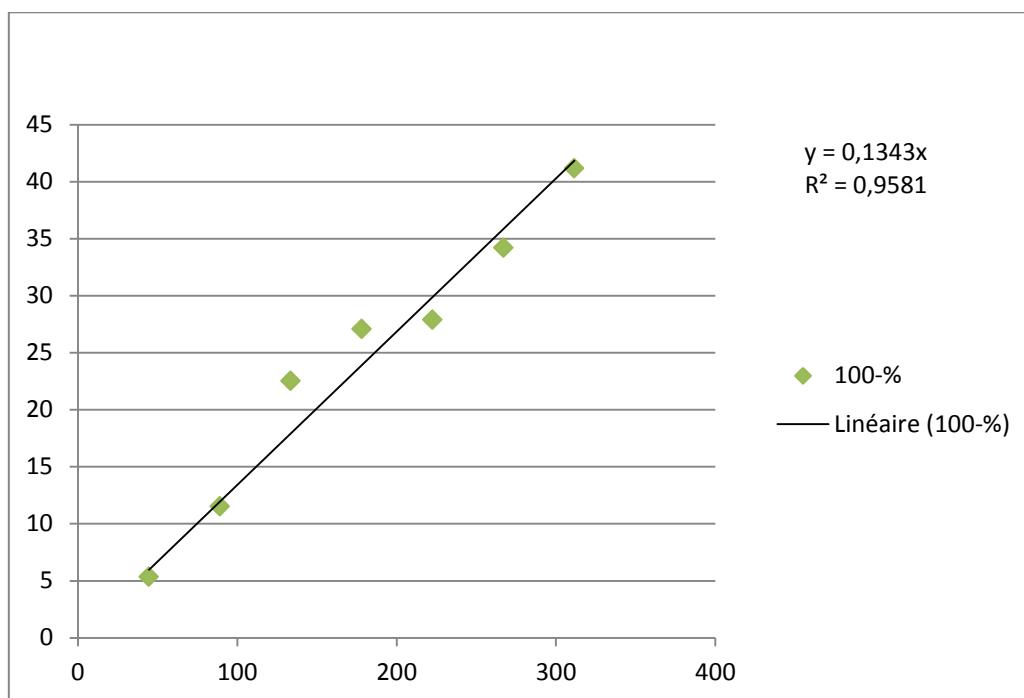


Annexe 3. Généralités sur les échantillons

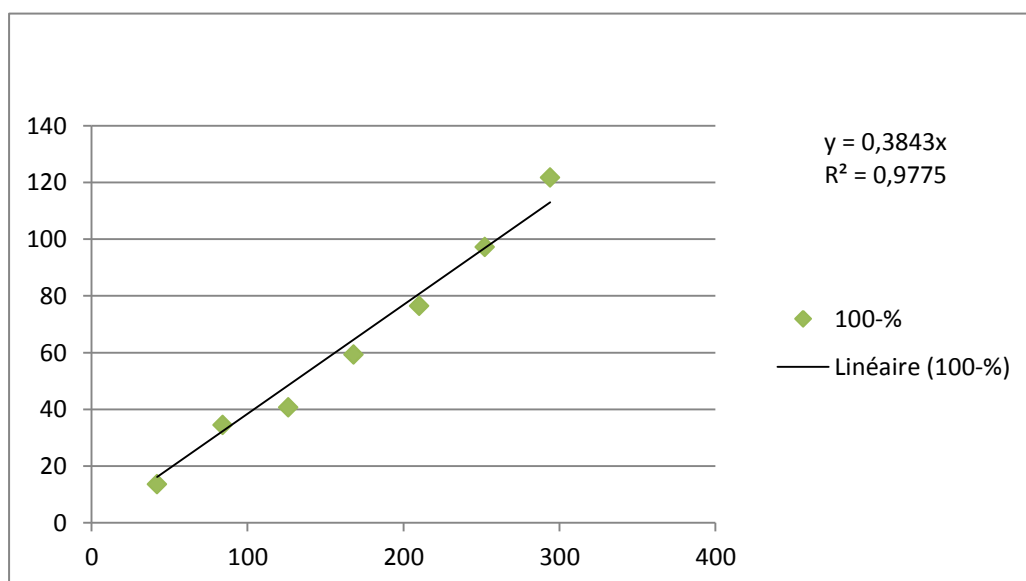
Variétés	Origine et diffusion	Caractéristiques
Chemlal	Occupe 40% des verges oléicoles nationaux, « présente surtout en kabylie » s'étend des monts Zekkar à l'ouest aux Bibans à l'est.	Variété rustique, et tardive, le fruit et de poids faible et de forme allongée, destiné à la production d'huile, le rendement d'huile de 18% à 22%.
Sigoise	Elle est dominante depuis Oued-Rhiou jusqu'à Tlemcen.	Variété rustique, le fruit et de poids moyen et de forme ovoïde, produit une olive à deux fins est très recherchée pour la conserverie et donne un bon rendement en huile de 18% à 22%.

Annexe 4.Courbes représentant les pouvoirs de DPPH avec deux extrait et vitamine c

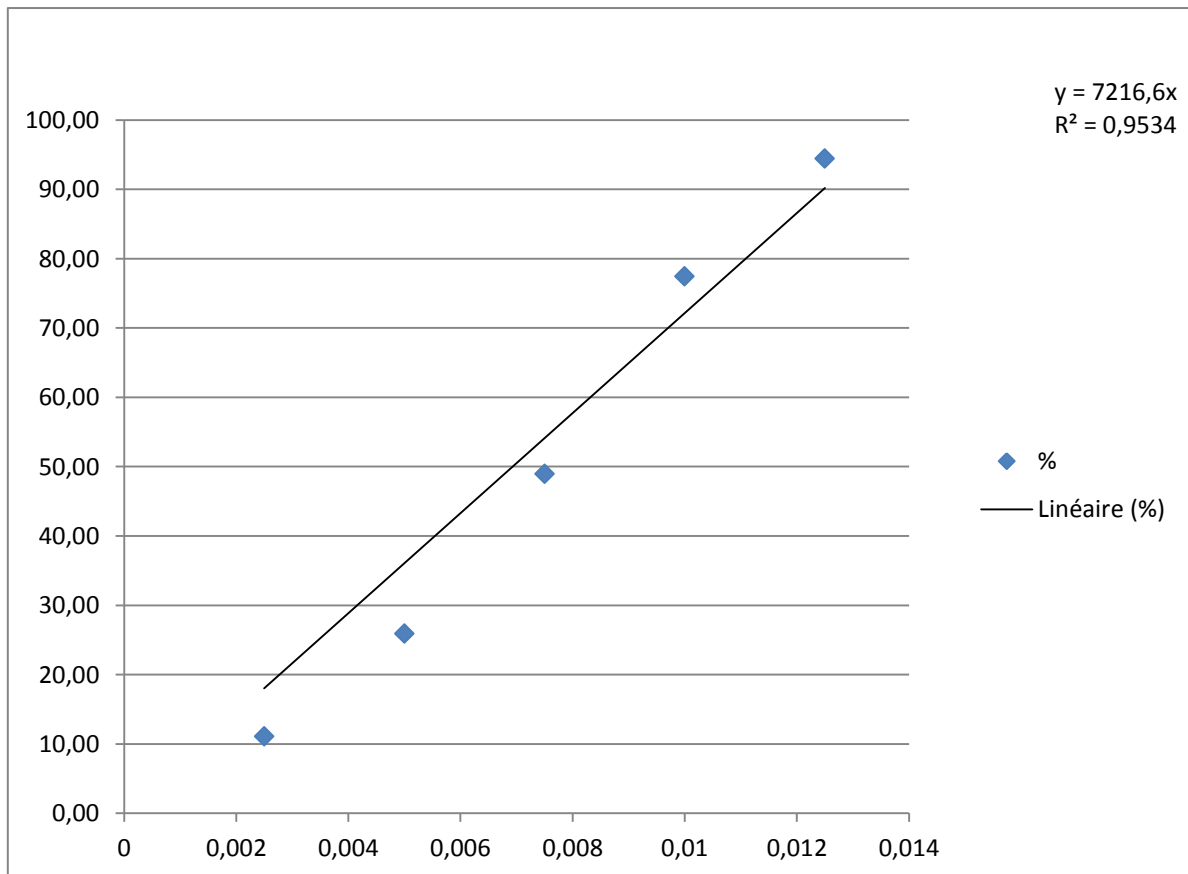
- **L'extrait 1 (Chemlal) :**



- **L'extrait 2(Sigoise) :**



vitamine c



Annexe 5. Les souches bactériennes de l'étude

Souche	Aperçu	Source
<i>Staphylococcus aureus</i>	Le staphylocoque doré (<i>Staphylococcus aureus</i>) est l'espèce la plus pathogène du genre <i>Staphylococcus</i> . Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles (patient immunodéprimé, prothèses cardiaques). <i>S.aureus</i> se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), Gram positif et catalase positif.	ATCC® 25923™
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> est une bactérie gram négatif, non mobile et encapsulée. Cette anaérobie facultative est un élément normal de la flore microbienne de la bouche, du tube digestif et de la peau des humains. Cependant, dans certaines conditions, elle peut muer en un dangereux pathogène et entraîner diverses infections, comme celles des voies urinaires.	ATCC® 33495™

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , bactérie ubiquitaire à Gram positif, catalase positive, aérobie pouvant se développer en anaérobiose, mobile par des flagelles peritriches, formant des spores très résistantes dont l'élimination efficace nécessite des conditions particulières. Malgré le fait qu'il s'agisse d'une bactérie à faible potentiel pathogène, elle peut donner lieu à de redoutables infections dans certains cas ou encore être à l'origine d'une intoxication alimentaire.	ATCC® 23857™
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> est un agent pathogène opportuniste qui «colonise» l'épithélium respiratoire de patients présentant des conditions prédisposantes, telles la mucoviscidose, la ventilation mécanique, l'immunodéficience ou la présence d'une maladie pulmonaire, comme la BPCO. Son unique flagelle ainsi que ses pili sont responsables de la mobilité de la bactérie et de son adhésion à l'épithélium respiratoire.	ATCC® 19429™
<i>Enterococcus faecalis</i>.	Les entérocoques sont des bactéries Gram positif qui se présentent sous forme de diplocoques ou de coques en chaînettes. Ils sont anaérobies facultatifs, immobiles et dépourvus de capsule. Cette famille englobe une trentaine d'espèces qui ont longtemps été classées dans le genre des streptocoques au vu de leurs similitudes avec les streptocoques du groupe D. Les deux principales espèces importantes en clinique sont l' <i>enterococcus faecalis</i> et l' <i>enterococcus faecium</i> , le premier se retrouvant plus fréquemment que le second (90% vs 10% environ).	ATCC® 49533™

<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) est une bactérie qui s'établit dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. La majorité des souches d'<i>E. coli</i> sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. C'est le cas des souches d'<i>E. coli</i> dites entéro-hémorragiques. Ces dernières provoquent des diarrhées sanglantes et produisent une puissante toxine à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU). Régulièrement, des souches d'ECEH sont la cause d'intoxications alimentaires via la consommation de produits animaux mal cuits ou consommés crus. Les fruits et les légumes frais, ayant été en contact avec ces souches peuvent être également à risque.	ATCC® 25922™
--------------------------------	---	--------------

Annexe 6. Coloration de Gram

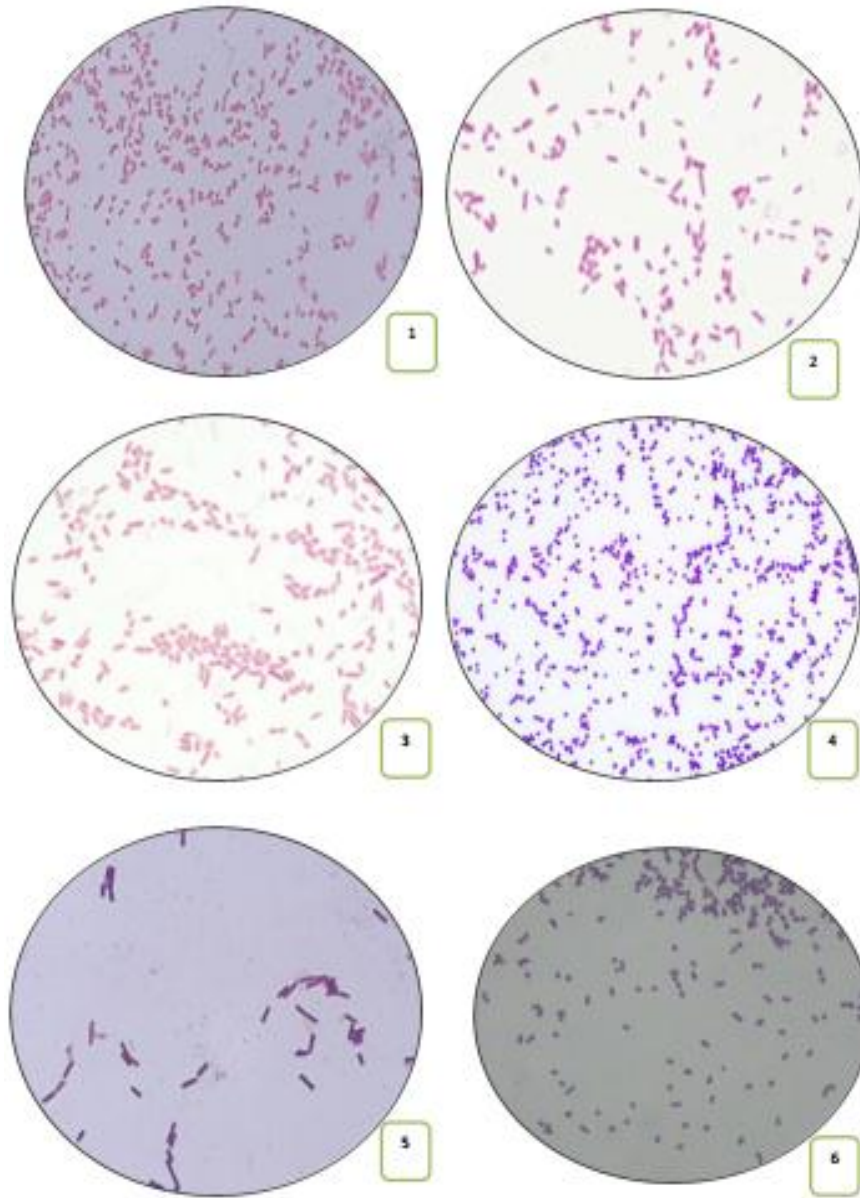


Figure 23. Observation de coloration de gram des bactéries, coloration de gram negative (1, *Escherichia coli*. 2 *Klebsiella pneumoniae*.. 3, *Pseudomonas aeruginosa*) et gram positive (4, *Staphylococcus aureus* . 5, *Bacillus subtilis*. 6, *Enterococcus faecalis*.)

Résumé



Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles, nous avons essayé dans cette étude de contribuer à la connaissance de certains effets biologiques des feuilles de l'olivier cultivé (*Olea europea subsp europea var. sativa*) récoltés dans la wilaya de Laghouat. L'extraction des composés phénoliques a été faite par le système à reflux pendant 6h. Les extraits obtenus à l'aide de l'acétate d'éthyle ont révélé des taux élevés de phénols totaux de l'ordre de $[44,65 \pm 0,35]$ mg d'équivalent d'acide gallique / 100g de feuille sèches pour la variété Chemlal et $[42,04 \pm 1,13]$ pour la variété Sigoise. Nous avons utilisé la méthode du DPPH pour l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols totaux. Elle a révélé des valeurs de CI50 de 372,3 mg/ml pour la variété Chemlal et 130,1 mg/ml pour la variété Sigoise. L'évaluation de l'activité antibactérienne n'a révélé aucun effet sur les 6 souches testées. Les résultats obtenus dans la présente étude laissent apparaître que les deux variétés constituent une bonne source d'antioxydants naturels et pourraient être considérés comme un aliment fonctionnel ou ingrédient d'aliment fonctionnel.

Mots clés :

Feuille d'Olivier ; *Olea Europaea* ; Composés phénoliques ; Oleuropéine ; Effet anti-radicalaire ; effet antibactérien



ملخص

في سياق تنمية الموارد الطبيعية ، حاولنا في هذه الدراسة المساهمة في معرفة بعض الآثار البيولوجية لأوراق شجرة الزيتون (*Olea europea subsp europea var. sativa*) التي يتم حصادها في ولاية الأغواط. تم استخراج المركبات الفينولية بواسطة نظام الارتجاع لمدة 6 ساعات. كشفت المستخلصات التي تم الحصول عليها باستخدام أسيتات إيثيل عن مستويات عالية من إجمالي الفينولات في حدود $[0.35 \pm 44.65]$ ملغ من حمض الغاليك / 100 غرام من الأوراق الجافة تشكيلة شمال و $[1.13 \pm 42.04]$ لصنف سيقواز . استخدمنا طريقة DPPH لتقييم نشاط مضادات الأكسدة من البوليفينول الكلي . كشفت قيم IC_{50} من 372.3 ملغ / مل لصنف شمال و 130.1 ملغ / مل لصنف سيقواز. وكشف تقييم النشاط المضاد للبكتيريا انه لا يوجد أي تأثير على سلالات 6 اختبارها. تشير النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة إلى أن كلا الصنفين يمثلان مصدرًا جيدًا لمضادات الأكسدة الطبيعية ويمكن اعتبارهما غذاء وظيفيًا أو مكونًا غذائيًا وظيفيًا.

كلمات المفتاحية :

ورقة الزيتون ، أوليا يوروبا، مركبات الفينول ، *Oleuropein* ، تأثير مضاد للجراثيم ، تأثير مضاد للجراثيم.

Abstract



In the context of natural resources development, we have tried in this study to contribute to the knowledge of some biological effects of the leaves of the olive tree grown (*Olea europea subsp europea var. Sativa*) harvested in the wilaya of Laghouat. The extraction of the phenolic compounds was made by the refluxing system for 6 hours. The extracts obtained using ethyl acetate revealed high levels of total phenols in the order of $[44.65 \pm 0.35]$ mg gallic acid equivalent / 100 g dry leaf for the variety Chemlal and $[42.04 \pm 1.13]$ for the variety Sigoise. We used the DPPH method to evaluate the antioxidant activity of total polyphenols. It revealed IC₅₀ values of 372.3 mg / ml for the Chemlal variety and 130.1 mg / ml for the Sigoise variety. The evaluation of the antibacterial activity revealed no effect on the 6 strains tested. The results obtained in this study suggest that both varieties are a good source of natural antioxidants and could be considered a functional food or functional food ingredient.

Keywords :

Olive leaf; *Olea Europaea*; Phenolic compounds; Oleuropein, antiradical effect, antibacterial effect.