

République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان  
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMEN  
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de  
l'Univers  
Département de biologie



## MEMOIRE

Présenté par

***ASKEUR Ikram et REFFES Imane Widad***

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En sciences biologiques

Option : Microbiologie Fondamental

### **Thème**

Evaluation de l'activité antibiofilm des extraits de feuilles  
d'*Olea europea*

Soutenu le 30/06/2022 devant le jury composé de :

Présidente	BOUALI Waffa	MCA	Université de Tlemcen
Encadrant	MKEDDER Ilham	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	M'EHEMDI Imene	MCA	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2021/2022**

## ***Remerciement***

Nous remercions, ALLAH qui nous a donné la santé, la volonté et la patience tout au long de nos études.

Nous remercions vivement M<sup>me</sup> ***MKEDDER Ilham*** Maître de Conférences « A » à l'université de Tlemcen. On la remercie pour supervisé ce mémoire, pour sa disponibilité, sa patience, son orientation, et pour ses conseils précieux qui ont pu mener ce travail à terme, et nous nous somme enrichies de savoirs et nos savoir-faire.

Un grand merci aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail  
Mademoiselle ***BOUALI Waffa*** Maître de Conférences « A » pour l'honneur qu'elle nous fait a présidé le jury de ce mémoire ,merci pour la confiance qu'elle nous a accordée.

Madame ***MEHEMDI Imene*** Maitre de conférence classe « A » pour nous avoir accepté d'examiner ce modeste travail et leur aimable traitement et leurs observations attentives.

Sans oublier nos familles pour le soutien exemplaire moral et matériel, tout au long de notre cycle.

Nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de cette mémoire.

## *Dédicaces*

Louange à Allah, seigneur de l'univers le tout puissant et miséricordieux qui m'a inspiré et comblé de bienfait, je lui rends grâce.

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie je dédie mon travail

A ma très chère mère qui m'a encouragé à aller en avant et qui m'a donné tout son amour pour continuer mes études.

Mon mari, ma sœur, à mon grand-père et mes tantes, mes oncles, mes cousins et ma cousine

A mon binôme, a toute ma famille sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, moyen, secondaire ou de l'enseignement supérieur.

À mon encadreur Mme MKADDER Ilham qui nous a aidés dans notre profil de fine étude.

**Imene**

## *Dédicaces*

Louange à Allah, seigneur de l'univers le tout puissant et miséricordieux qui m'a inspiré et comblé de bienfait, je lui rends grâce.

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie je dédie mon travail :

A mon marie **MEDJAHDI Hichem** et mon petite enfant **Mohamed Amine**

A ma très chère mère et mon très chère père, source de vie, de bonheur, d'amour.

A mes frère **Chihab et Mohamed** et mes sœurs **Aicha et Ahlem**

A ma belle-mère, mon frère Hocine et sa femme Hanane et ses petits-enfants, à mes belles sœurs et ses enfants

Je dédie ce travail à l'âme de mes deux grandes mères **Aicha et Fatma**

Mes précieuses amies **Hadjer et Nafissa**

A mon binôme, a toute ma famille sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, moyen, secondaire ou de l'enseignement supérieur.

À mon encadreur Mme MKADDER Ilham qui nous a aidés dans notre profil de fine étude.

**Ikram**

## الملخص

تم استخدام أوراق *Olea europaea* لفترة طويلة في طب الأعشاب، ولها العديد من المزايا العلاجية ضد العديد من الأمراض والفضائل في الحفاظ على الصحة العامة. هذا العمل عبارة عن تجميع لمقالين عن تقييم النشاط المضاد للبكتيريا والمضاد للبيوفيلم للمستخلصات الميثانولية والإيثانولية لأوراق الزيتون المحضرة بالنقع والسوكسلت على التوالي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلصين يظهران نشاطاً مضاداً للبكتيريا ومضاداً للبيوفيلم ضد السلالات المختبرة. أفضل مستخلص هو المستخلص الميثانولي والبكتيريا الأكثر حساسية هي المكورات العنقودية الذهبية.

**الكلمة المفتاحية:** نبات طبي، *Olea europaea*، نشاط مضاد للبكتيريا، نشاط مضاد للبيوفيلم

## Résumé

Les feuilles d'*Olea europaea* sont employées depuis longtemps en phytothérapie, elle possède de nombreux avantages thérapeutiques contre de nombreuses maladies et des vertus dans le maintien de la santé globale.

Le présent travail est une synthèse de deux articles portant sur l'évaluation de l'activité antibactérienne et anti biofilm des extraits méthanolique et éthanolique de feuilles d'olives préparés, par macération et Soxhlet respectivement.

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits présentent une activité antibactérienne et anti biofilm vis-à-vis des souches testées. Le meilleur extrait est l'extrait méthanolique et la bactérie la plus sensible est staphylococcus aureus.

**Mots clés :** plante médicinale, *olea europaea*, activité antibactérienne, activité anti-biofilm

## Abstract

The leaves of *Olea europaea* have been used for a long time in herbal medicine; it has many therapeutic advantages against many diseases and virtues in maintaining overall health.

This work is a synthesis of two articles on the evaluation of the antibacterial and antibiofilm activity of methanolic and ethanolic extracts of olive leaves prepared by maceration and soxhlet respectively.

The results obtained show that the two extracts exhibit antibacterial and antibiofilm activity against the strains tested. The best extract is the methanolic extract and the most susceptible bacteria is *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** medicinal plants, *olea europaea*, antibacterial activity, anti-biofilm activity

## Table de matières

<b>Liste des abréviations.....</b>	
<b>Liste des figures.....</b>	
<b>Liste des tableaux .....</b>	
<b>Introduction .....</b>	<b>02</b>
<b>Première partie : Synthèse Bibliographique .....</b>	
<b>Chapitre 1 : les biofilms.....</b>	
1. Définition et critères généraux.....	<b>05</b>
2. Etapes de formation de biofilm.....	<b>05</b>
2.1.Adhésion réversible (non spécifique) .....	<b>05</b>
2.2.Adhésion irréversible (spécifique) .....	<b>06</b>
2.3.Formation de micro-colonies et la sécrétion de la matrice extracellulaires .....	<b>06</b>
2.4.Maturation.....	<b>06</b>
2.5.Dispersion .....	<b>06</b>
3. Lutte contre les biofilms .....	<b>07</b>
3.1.Méthodes chimiques.....	<b>08</b>
3.2.Méthodes physiques .....	<b>08</b>
3.3.Les bactériophages.....	<b>08</b>
3.4.Bactériocines.....	<b>08</b>
3.5.Inhibition de Quorum Sensing.....	<b>09</b>
3.6.Utilisation des plantes .....	<b>09</b>
<b>Chapitre 2 : <i>Olea europea</i>.....</b>	
1. Historique.....	<b>11</b>
2. Systématique.....	<b>12</b>
3. Description botanique.....	<b>13</b>
4. Composition chimique des feuilles d'olivier.....	<b>14</b>
5. Principales propriétés .....	<b>15</b>
5.1. Effet antihypertensive.....	<b>15</b>
5.2. Effet antioxydant.....	<b>15</b>
5.3. Effet hypocholesterolemiant.....	<b>15</b>
5.4. Effet antispasmodique sur la musculature lisse .....	<b>15</b>

5.5. Effet antibactérien .....	<b>15</b>
5.6. Effet antibiofilm.....	<b>15</b>
6. Utilisations .....	<b>15</b>
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes.....</b>	
1. Objectif .....	<b>18</b>
2. Préparation des extraits .....	<b>18</b>
2.1.Extraction par macération.....	<b>18</b>
2.2.Extraction par soxhlet.....	<b>18</b>
3. Dosage des phénols totaux .....	<b>19</b>
4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	<b>20</b>
5. Isolement et identification des bactéries.....	<b>20</b>
5.1.Identification par Viteck 2.....	<b>20</b>
6. Souches de référence utilisées.....	<b>21</b>
7. Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	<b>21</b>
8. Evaluation de l'activité anti bactérienne des extraits .....	<b>22</b>
8.1.Méthode de diffusion en puits.....	<b>22</b>
8.2.Détermination des concentrations minimale inhibitrice et bactéricides de.....	<b>22</b>
8.2.1. Méthode de macro dillution.....	<b>22</b>
8.2.2. Méthode de micro dillution.....	<b>23</b>
9. Capacité des bactérie isolé à forméun biofilm.....	<b>23</b>
10. Activité antibiofilm des extraits préparés.....	<b>24</b>
<b>Troisième partie : Résultat et discussion.....</b>	
1. Teneurs totales en phénols et flavonoïdes.....	<b>26</b>
2. Identification bactérienne.....	<b>26</b>
3. Sensibilité aux antibiotiques.....	<b>27</b>
4. Activité antibactérienne .....	<b>28</b>
5. Activité anti biofilm.....	<b>31</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>35</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>37</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>41</b>

## Liste des abréviations

<b><i>B.cereus</i></b>	<i>Bacillus cereus</i>
<b><i>B.subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>CMB</b>	Concentration minimale bactéricide
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>E.F</i></b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b><i>E.faecalis</i></b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b>EPS</b>	Substance polymérique extra moléculaire
<b>GN</b>	Carte pour les bacilles à gram négatif fermenté et non fermenté
<b>GP</b>	Carte pour les Cocci à gram
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide à haute performance
<b><i>K.pneumonia</i></b>	<i>Klebsiella pneumonia</i>
<b>Nd</b>	Valeur non déterminée
<b><i>P.aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PC UVD</b>	Spectraux double Brem
<b>QS</b>	Quorum sensing
<b><i>S.aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S.M</i></b>	<i>Methicillin resistant</i>
<b>UV-VIS</b>	Spectroscopie ultraviolet –visible
<b>VITEK</b>	Carte d'identification d'antibiogramme



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Modèle de développement de biofilm mature chez <i>P.aeruginosa</i> .....	<b>7</b>
<b>Figure 2</b> : Répartition géographique naturelle du complexe <i>Olea europeae</i> .....	<b>11</b>
<b>Figure 3</b> : Arbre d'olivier .....	<b>13</b>
<b>Figure 4</b> : Montage de soxhlet.....	<b>19</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Composition chimique de feuilles d'olives .....	<b>14</b>
<b>Tableau 2</b> : Article traité .....	<b>18</b>
<b>Tableau 3</b> : Résultat de l'antibiogramme.....	<b>28</b>
<b>Tableau 4</b> : Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles d'olive....	<b>29</b>
<b>Tableaux 5</b> : CMI /CMB de l'extrait éthanolique des feuilles d'olive.....	<b>30</b>
<b>Tableaux 6</b> : CMI et CMB (ug /ml) de l'extrait éthanolique des feuilles .....	<b>31</b>
<b>Tableaux 7</b> : Activité antibiofilm d'extrait éthanolique des feuilles d'olive .....	32
<b>Tableaux 8</b> : Activité antibiofilm d'extrait éthanolique des feuilles d'olive .....	32

# ***Introduction***

La plupart des micro-organismes favorisent un mode de vie en communautés où se trouvent fixées sur un support plutôt que libre et isolées dans le milieu environnemental. L'attachement sur une surface est un mode de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement. Cette stratégie appelé « biofilm » représente 90% du mode de vie bactérienne dans la nature (**Costerton., 1980 ; Fillox et Vallet, 2003**).

Les biofilms bactériens sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans le domaine de la santé publique ou Ils jouent un rôle majeur dans plus de 80% des infections (**National Institutes of Health, 2007**).

l'échec thérapeutique et les coûts de plus en plus élevés des traitements des infections dues aux bactéries résistantes, appellent à trouver en urgence d'autres alternatives de soins (**Toty et al., 2013**). De ce fait, le recours à la phytothérapie devient de plus en plus intéressant en raison de la richesse des plantes possédant un pouvoir antibactérien et anti-biofilm remarquable (**Atefbeibu, 2002**).

L'olivier (*Olea europea L.*) est une espèce de la famille des Oleaceae et constitue une source importante de nutriments et d'éléments biologiques, et de principes biologiquement actifs. Les olives contiennent de nombreux composés potentiellement bioactifs ayant des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales et hypocholestérolémies (**Covas, 2007**), mais également composés des activités bactéricides et antifongiques (**Huang et al., 2003**).

Suite aux situations actuelles de cette année 2022 et de la pandémie du Covid-19, notre sujet de master et objectif d'origine restent irréalisables, en conséquence, nous avons orienté notre travail sur la réalisation d'une synthèse des deux articles visant à évaluer sur l'activité antibiofilm des extraits de feuilles de l'*Olea europea L.*

***Première partie***  
***Synthèse bibliographique***

***Chapitre 1***  
***Les biofilms***

La plupart des espèces bactériennes ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces appelées biofilms (**Kolter, 2008**).

## 1. Définition et critères généraux

Les biofilms sont des communautés microbiennes adhérentes à une surface et fréquemment incluses dans une matrice de polymères exo cellulaires. (**Characklis, 1990**). Cette matrice est aussi appelée « couche muqueuse ». Ce sont des couches de micro-organismes associés à un type de surface et constitués d'un seul type ou de plusieurs types de micro-organismes (levures, bactéries, protozoaires ou des combinaisons de toutes ces espèces). (**Characklis, 1990**).

La structure des biofilms dépend des micro-organismes qui le composent, des molécules engagées dans leur formation et des variations physico-chimiques de leur environnement. (**Characklis, 1990**).

Le biofilm est composé essentiellement des microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent. Les micro-organismes représentent 2 à 15% du matériel du biofilm selon l'espèce formatrice tandis que la matrice extracellulaire (EPS, extracellular polymeric substances), représente 50 à 90% de la masse organique carbonée du biofilm. Mais l'eau demeure le principal composant du biofilm (**Costerton, 1999 ; Sutherland, 2001 ; Donlan, 2002**). La matrice du biofilm peut aussi contenir des ions métalliques, des cations divalents, des protéines, ADN, lipides, phospholipides ainsi que des composants de l'hôte (**Sutherland, 2001 ; Donlan, 2002 ; Hall-Stoodley et al., 2012**).

## 2. Etapes de formation de biofilm

### 2.1. Adhésion réversible (non spécifique)

L'adhésion est une accumulation de micro-organisme et de matériels extracellulaires sur une surface solide. Les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide (**Hoiby et al., 2011**) par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles). Leur attachement se fait de manière réversible, par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques.

Cette étape est influencée par des conditions de l'environnement impliquant le pH, la température, la concentration en oxygène et en nutriments, l'hydrodynamique de fluide, ainsi que par la nature de la surface (sa rugosité et son hydrophobicité) (**Beloin et al., 2008**)

### **2.2. Adhésion irréversible (spécifique)**

Au fur et à mesure que les cellules se multiplient, le nombre de bactéries associées à la surface augmente conduisant à la formation de colonie (**O'toole et Kolter., 1998 ; Sauer et Comper, 2001**), et l'adhésion devient irréversible par la formation de molécules protéiques, l'adhésine. Ce passage à un biofilm attaché de manière irréversible correspond à la synthèse de structures à la surface de la bactérie et des modifications du profil d'expression des gènes (**Roux et Ghigo, 2006**).

### **2.3. Formation de micro-colonies et la sécrétion de la matrice extracellulaires EPS**

Les colonies formées commencent à sécréter de la matrice extracellulaire. Après une fixation irréversible, la colonie bactérienne se dilate soit par division cellulaire soit en combinant la division cellulaire avec l'engagement des autres cellules microbiennes. Les cellules mobiles s'attachent à la matrice alors que les cellules non mobiles s'attachent pas (**Mack et al., 1999**).

### **2.4. Maturation**

Dans cette phase les cellules microbiennes s'agrègent pour former un biofilm, pour cela elle produisent des signaux d'auto-indicateurs qui aboutissent à l'expression de gène spécifique du biofilm et permet la communication des cellules entre elles (**Gupta et al., 2015**). Cette communication bactérienne se fait à l'aide d'un produit de détection appelée « **Quorum Sensing** » (**Phillips et al., 2010**), à ce stade le micro-organisme secrète une matrice extracellulaire polysaccharide (EPS) (**Gupta et al., 2015**). Cette phase se caractérise par une augmentation de la taille du biofilm (**Thierry, 2008**).

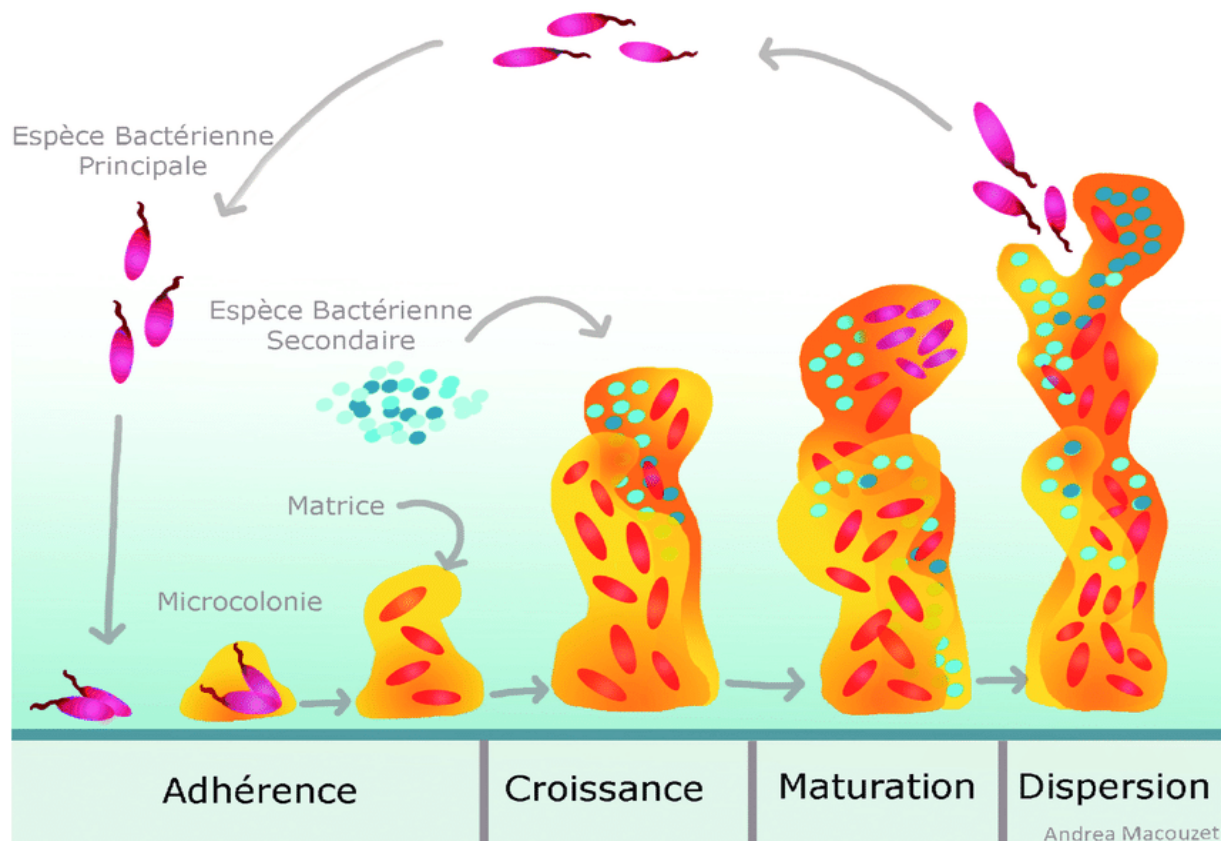
### **2.5. Dispersion**

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, (cette étape se produit lors du vieillissement du biofilm, ou de certain stress ou carences). Il s'agit du stade de dispersion (**Clutterbuck et al., 2007**). Dans cette étape les cellules s'échappent de la matrice du biofilm sous forme de bactérie planctonique libre. Des enzymes sont impliquées dans la dégradation et la reconfiguration du biofilm, ce qui entraîne une dégradation de la matrice, la dispersion du biofilm (**Yin et al., 2019**), les bactéries peuvent se détacher en petite quantités (érosion du



biofilm) et la colonisation de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation d'autres biofilms (Clutterbuck *et al.*, 2007).

Ces micro-organismes se retrouvent à l'état de libre circulation et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces ou fluides et causer différents problèmes tant au niveau médical qu'industriel, complétant ainsi le cycle de formation du biofilm. (Figure 01)



**Figure 1 :** Modèle de développement d'un biofilm mature chez *P. aeruginosa* (Andrea Macouzet).

### 3. Lutte contre les biofilms

Plusieurs approches ont été développées pour lutter contre les biofilms formés

#### 3.1.Méthodes chimiques

La désinfection est une méthode qui permet la destruction des microorganismes pathogènes sur une surface. Pour une meilleure efficacité, la désinfection doit être précédée par un nettoyage adéquat (Fong et Barn, 2012).

Les désinfectants chimiques sont les plus utilisés pour réduire le nombre des microorganismes (**Anthony et al., 2015**).

Plusieurs composés se sont montrés efficaces contre les biofilms tels que l'hypochlorite de sodium (Na ClO) (**Kharder et al., 2001 ; Lagrange et al., 2004 ; Dosti et al., 2005 ; Ozdemir et al., 2010 ; Tote et al., 2010 ; Da Silva et al., 2011**). Par contre, les désinfectants à base de chlore sont les plus utilisés dans l'industrie alimentaire (**Galié et al., 2018 ; Yang et al., 2016**) parce qu'ils sont faciles à préparer et à appliquer et sont généralement le plus rentable (**Van Houdt et Michiels, 2010**).

### 3.2.Méthodes physiques

Les méthodes physiques sont utilisées comme des alternatives des désinfectants chimiques tels que l'utilisation de la lumière avec l'ozone pour la pasteurisation (**Pereira et Vicente, 2010; Montville et al., 2012 ; Birmpa et al., 2013 ; Fraise et al., 2013 ; Let et al., 2015**), et l'utilisation des bioélectrique pour augmenter la pénétration des substances active dans le biofilm (**Van Houdt et Michiels, 2010**). Ces méthodes doivent être autorisées par l'organisation de réglementation fédéraux et de consommateur pour l'utiliser (**Montville et al., 2012**).

### 3.3.Bactériophages

Les bactériophages sont des virus qui peuvent infecter les bactéries et affecter la formation de biofilm grâce à leurs enzymes qui peuvent détruire le composant EPS, et puis les bactéries exposées à la surface sont infectées par ces derniers (**Harper et al., 2014 ; Zhao et al., 2017**).

### 3.4.Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens de synthèse ribosomal sécrétés par les bactéries, (**Da Silva et De Martinis, 2013**). Leur utilisation est utile pour empêcher la formation des biofilms sur les surfaces (**Galié et al., 2018**). Jusqu'à présent la nisine est la seule bactériocine autorisée par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) (**Stempel et al., 2015 ; Galié et al., 2018**). Cette bactériocine permet de prolonger la date de péremption, protéger contre l'altération des produits et réduire le nombre de traitement thermique (**Mattick et Hirsch, 1947 ; Galié et al., 2018**).

### 3.5. Inhibition de Quorum Sensing (QS)

L'utilisation des inhibiteurs du QS agissent principalement en éteignant le système médiateur QS qui, à son tour inhibe la communication cellule-cellule par dégradation enzymatique du QS, inhibition des signaux de biosynthèse du QS et le contrôle post transcriptionnel des QS (**Dong et al., 2001 ; Chung et al., 2011 ; Perez-Martinez et Haas, 2011 ; Brackman et Coenye, 2015**). Cette stratégie ciblant le QS et la formation de biofilm entraînent moins de pression de sélection et par conséquent, ne développent pas de résistance au composé inhibiteur (**Brackman et Coenye, 2015 ; Coughlan et al., 2016**).

### 3.6. Utilisation des plantes

Les plantes produisent plusieurs métabolites secondaires pour leur protection contre les agents pathogènes telle que les virus et les bactéries (**Kavanaugh and Ribbec, 2012 ; Saviuc et al., 2015 ; Khan et al., 2019**). Ces métabolites sont une bonne source pour lutter contre la formation de biofilm (**Suzuki et al., 2015**). Les plantes aromatiques sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour inhiber l'adhésion des cellules sur l'acier inoxydable (**Coughlan et al., 2016**) comme d'origan, thymol, carvacrol et le cumin. Ces plantes ayant un effet efficace contre le biofilm comme le biofilm formé par *Staphylococcus Ssp* (**Nostro et al., 2007 ; Amechrouq et al., 2018**).

***Chapitre 2***  
***Olea europea***

L'olivier, emblème du paysage méditerranéen, vit dans les terrains rocaillieux et secs de la Provence mais aussi de la Grèce, de l'Italie, de l'Espagne ainsi qu'en Afrique du Nord, en Asie, en Australie et Nouvelle-Zélande. C'est un arbre dont le tronc de couleur grise aime jouer les contorsionnistes, ce qui lui donne cette allure si originale. Résistant, son tempérament de sudiste l'empêche toutefois de survivre à des températures inférieures à  $-10^{\circ}\text{C}$ . « Lentement mais sûrement » est la devise de l'olivier. En effet, si cet arbre massif a une croissance assez lente, il peut vivre en revanche jusqu'à 2 ou 3 millénaires. Symbole de sagesse et de paix, l'olivier était vénéré par les Grecs.

L'olivier est un arbre cultivé pour son fruit, l'olive, qui donne une huile recherchée « l'huile d'olive ». Cette dernière, mais aussi les olives de table, sont des éléments importants de la diète méditerranéenne et sont consommées en grande quantité dans le monde entier. **(Figure 1)**

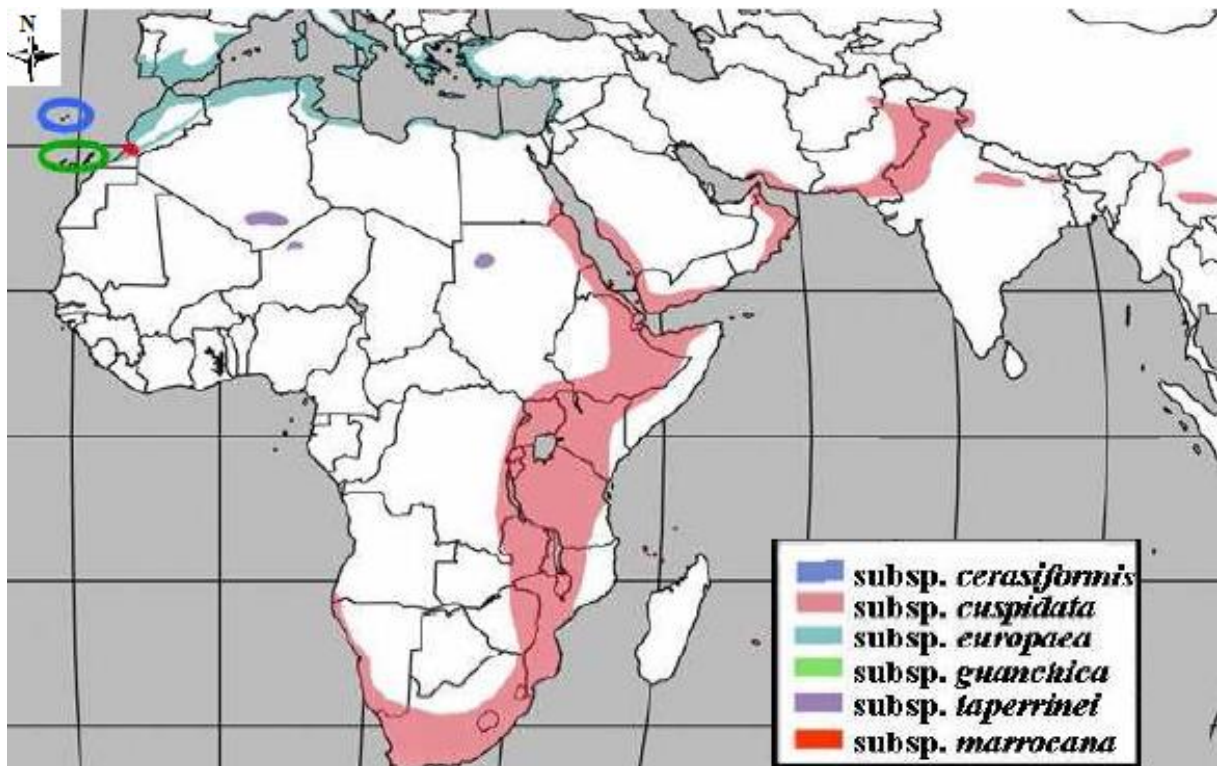


**Figure 1** : Arbre d'olivier (*Olea europaea*)

## 1. Historique

L'olivier (*Olea europaea*) le patrimoine génétique oléicole mondial est très riches en variétés il contient de 2,600 variétés différents (Muzza Lupo *et al.*, 2014)

L'olivier (*Olea europaea*) est un arbre fruitier principal, il a plusieurs variétés cultivées par l'importance sociale et économique. **Gommes et al. (2012)** disent qu'il y a plus de 805 millions d'oliviers dans le monde entier dont 98% se trouve dans le pourtour méditerranéen ; à partir d'une superficie d'environ 328 884 hectares (**Faostat, 2013**) soit 34,09 du verger arboricole nationale et l'Algérie compte un fortin d'olive environ 32 millions d'arbres (**Ben Semmane 2009 ; Mendil, 2009**). (Figure 2)



**Figure 2** : répartition géographique naturelle du complexe *Olea europaea* (l'olivier : méditerranéen. *Subsp, europaea*) (**Rubie de casas et al., 2006**).

## 2. Systématique

La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon **Cronquist (1981)** est la suivante :

**Règne** : Plantae

**Division** : Magnoliophyta

**Classe** : Magnoliopsida

**Ordre** : Scrophulariales

**Famille** : Oleaceae

**Genre** : *Olea*

**Espèce** : *europaea*

## Description botanique

*Olea europaea* appartient à la famille des oléacées, il s'agit d'une espèce à feuilles persistantes qui se caractérise par une longue longévité et une pollinisation anémophile (**Lieux et Parker, 1999**)

Les feuilles sont elliptiques, les fleurs sont petites et regroupées en inflorescences et sont hermaphrodites, l'olivier est une espèce plus ou moins allogame, et son système d'auto-incompatibilité n'est pas bien défini, la plante est de type gamétophytique (**Cuevas et Polito 1997**), alors que d'autres auteurs tel (**Villemur et al., 1994**) considèrent qu'il est de type sporophytique comme *Phillyrea angustifolia*. (**Figure 3**)



**Figure 3 :** *Olea europaea* (Lieux et Parker, 1999)

*Olea europaea* (olivier) est un arbre qui peut atteindre 3 à 7 mètres de hauteur dans la majorité des modes de culture. Les olives peuvent être maintenues entre quinze à vingt mètres de haut et vivre très longtemps ; le développement du système racinaire de l'arbre dépend de plusieurs propriétés physico-chimiques du sol, sa structure, sa texture, et sa profondeur. Généralement la moitié de la jeune plante développe une racine pivotante. À l'état adulte, l'olivier présente 2 ou 3 racines pivotantes qui s'enfoncent profondément et de celle-ci. **Yankovitch et Berthelot (1974)**, signalant qu'en Tunisie (Sfax), le système racinaire devient de moins en moins dense avec la profondeur (**Kasraoui, 2010**). Les fleurs sont regroupées en petites grappes dressées à l'aisselle des feuilles.

Les feuilles sont persistantes avec une durée de vie de l'ordre de trois ans (Loussert et Broussr1978), opposées, ovales oblongues, et un peu enroulées, portées par un court pétiole ; elles sont vertes grisâtres, et contiennent des matières grasses, des cires, des acides.

### 3. Composition chimique des feuilles

La composition chimique des feuilles d'olives varie en fonction de nombreux facteurs. Généralement ; la matière sèche des feuilles vertes se situe autour de 50% à 58%. Celle des feuilles sèches autour de 90%. La teneur en matière azoté totales des feuilles varie de 9à13%, alors que les rameaux ne dépassent guère 5à 6%. La solubilité de l'azote est faible, elle se situe entre 8 et 14%. Selon la proposition de bois. La teneur en matière grasses est supérieure à celle des fourrage et oscille autour de 5 à 7%, mais celle des constituants pariétaux et en particulier de la lignine est constamment élevée 18 à 20%. (Tableau 1).

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

Composition %	Boudhrioura et al., 2009	Erbay et Icier 2009	Martin et al., 2006	Gomez et al., 2003	Fegeros et al., 1995
<b>Eau</b>	46,2-49,7	49,8	41,4	Nd	44
<b>protéines</b>	5-7,6	5,4	7	Nd	Nd
<b>Minéraux</b>	2,8-4,4	3,6	16,2	26,6	9,2
<b>Lipides</b>	1-1,3	6,5	3,2	6,2	Nd
<b>Carbohydrates</b>	37,1 – 42,5	27,5	Nd	Nd	Nd
<b>Fibres brutes</b>	Nd	7	Nd	Nd	18
<b>Cellulose</b>	Nd	Nd	Nd	19.3 b	11.4 b
<b>hémicelluloses</b>	Nd	Nd	Nd	25.4 b	13.3 b
<b>Lignine</b>	Nd	Nd	Nd	30.4 b	14.2 b
<b>Polyphénols totaux</b>	1,3 -2,3 b	Nd	2.5 b	Nd	Nd
<b>Tannins solubles</b>	Nd	Nd	Nd	Nd	0.3 b
<b>Tannins condensés</b>	Nd	Nd	0.8 b	Nd	1 b

Nd : valeur non déterminée



#### 4. Principaux effets biologiques

L'olivier est caractérisé par une action antihypertensive, l'extrait d'olivier permet une diminution de la pression artérielle systolique et diastolique. Cette plante se caractérise par son effet antioxydant (dû à la présence de terpènes) ; et participe à une diminution du LDC-C<sub>1</sub>, des LDC oxydé et des triglycérides. Elle permet également de limiter le développement de la stéatose et de la fibrose hépatique chez des rats nourris pendant 16 semaines avec un régime riche en carbohydrates et en lipide. D'autre par l'extrait de feuille d'olivier est actif in vitro contre certaine germe (*Staphylococcus*, *Pseudomonas*). (Lee *et al.*, 2010).

#### 5. Utilisations

Depuis longtemps, les feuilles d'olivier sont employées en phytothérapie. A l'époque, chez les grecques, les feuilles ont été utilisées pour désinfecter les blessures cutanées. Les anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toute sort d'infections. Au XIX siècles, on s'en servait pour combattre le paludisme. (Aouidi, 2012).

Ces usages sont tombés en désuétude pendant un certain temps en raison de l'omniprésent des antibiotiques. En 1995, les premiers résultats d'utilisation de l'olive furent très positifs. Depuis il a été démontré que la feuille d'olivier possède de nombreux avantages thérapeutiques contre de nombreuse maladies et des vertus dans le maintien de la santé globale. (Altiok *et al.*, 2008 ; Jemai *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2010). **Thèse doctorat Fathia Aouidi**

Par leur pouvoir antimicrobien et antiviral, les feuilles d'olivier peuvent être bénéfique dans le traitement des affections causées par ou associé à des virus, des bactéries, ou un protozoaire. (la grippe, le rhume, les infections dues aux condidas, la méningite, l'encéphalite, le VIH /ARC /SIDA, la fatigue chronique, l'hépatite B, la pneumonie, la tuberculose, la malaria, la diarrhée sévère, les infections des voies urinaire et les soins dentaires) (Markin *et al.*, 2003 ; Micol *et al.*, 2005 ; Pereira *et al.*, 2007 ; Korukluoglu *et al.*, 2008 ; Sudjana *et al.*, 2009 ; Lee *et al.*, 2010). **Thèse doctorat Fathia Aouidi**

Comme un effet anti oxydant l'extrait des feuilles d'olivier protège les vaisseaux sanguins. Il a été montré qu'il peut être efficace dans la protection du cœur lors d'une l'occlusion coronaire. Par leurs effets sur certain enzymes métaboliques. Les feuilles d'olivier possèdent des propriétés anti -lipidimique et son aussi indiquée pour le traitement de diabète. (Jemai *et al.*, 2008). **Thèse doctorat Fathia Aouidi**

En cosmétique, les feuilles d'olivier sont largement utilisées dans le secteur bio, dans la préparation de laits corporels, nettoyant pour le visage, crèmes de jour, soins pour le contour

des yeux ....elles constituent un actif de base dans divers soins, en vue de nourrir la peau et la protéger contre le vieillissement cutané.

Dans le domaine alimentaire on utilise beaucoup les olives et l'huile d'olive par exemple on en consomme le fruit en apéritif ou pour agrémenter nos pizza ; on en utilise l'huile au quotidien pour nos salade.

***Deuxième partie***  
***Matériel et méthodes***

## 1. Objectif

Nous avons traité 2 articles qui portent sur l'activité antibactérienne ; antibiofilm des feuilles d'*Olea europaea* vis-à-vis de quelques souches pathogènes (**Tableau 2**)

**Tableau 02** : les articles traités

Article	Auteur	Année	Pays
<b>Antimicrobial and antibiofilm activities of alcoholic extract of olive leave (olea europaea ) against pathogenic bacteria</b>	Sweedan <i>et al.</i> ,	2019	Iraq
<b>A comparative study on chemical composition , antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four tunisian olive cultivars</b>	Edziri <i>et al.</i> ,	2019	Tunisie

## 2. Préparation des extraits

### 2.1. Extraction par macération

Dans l'étude d'**Edziri *et al.* (2019)** 100 g de feuilles séchées est mis en contact avec 500 ml de méthanol. La préparation est laissée macérer à une température ambiante pendant 24 h. l'extraction a été répétée 3 fois, et les extraits obtenus ont été combinés et filtré à travers du papier filtre Wantan. Après filtration, le filtrat méthanolique est soumis à une évaporation à sec à l'aide d'un rota-vapeur. Le résidu sec est conservé jusqu'à utilisation. (**Sanchez *et al.*, 2007**)

### 2.2. Extraction par soxhlet

**Sweedan *et al.*, (2019)** ont utilisé la méthode de soxhlet (**Figure 4**) pour la préparation de leur extrait, pour cela 10 g de poudre des feuilles broyées d'olives est placée dans le corps de soxhlet qui est monté sur un ballon remplie par 200 ml d'éthanol. L'extraction a duré 8 h à l'aide d'une chauffe ballon, le solvant s'évapore puis se condense tout en restant en contact avec le matériel végétal, puis les extraits ont été séchés dans un four, et la poudre de la plante extraite a été conservée dans des tubes de verre fermés au réfrigérateur jusqu'à l'utilisation (**Altaf *et al.*, 2014**).

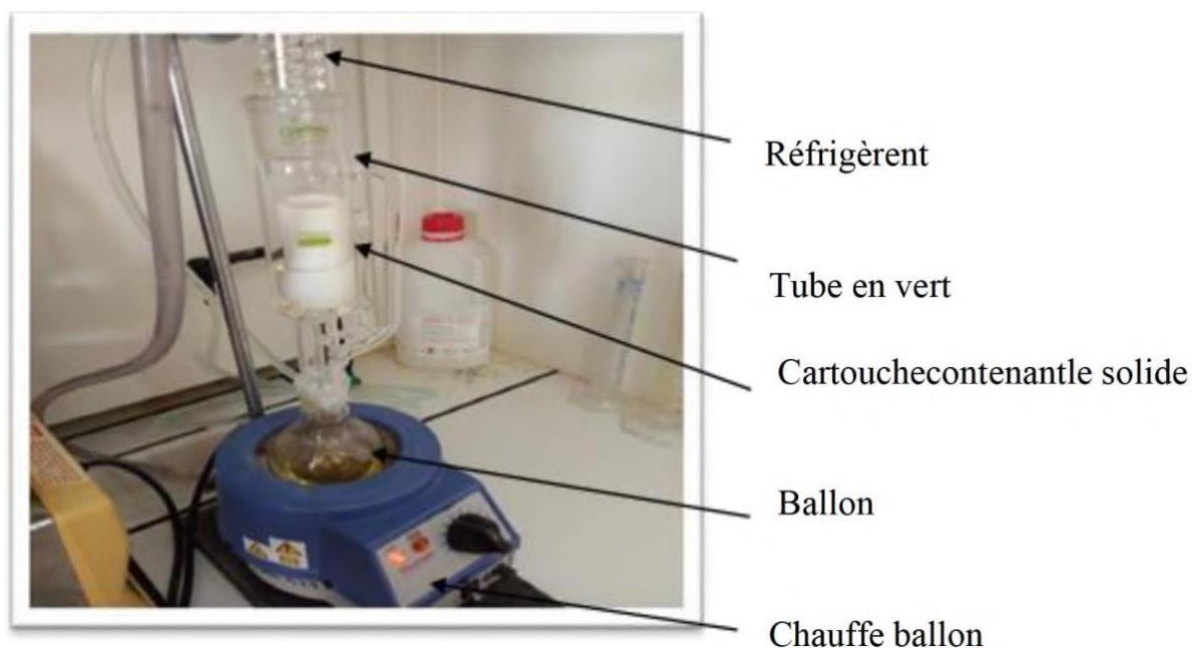


Figure 4 : Le montage soxhlet

### 3. Dosage des phénols totaux

**Edziri *et al.*, 2019** ont déterminé la quantité des phénols totaux dans l'extrait éthanolique selon la procédure de Folin-Ciocalteu (**Montedoro *et al.*, 1992**). Le Folin-Ciocalteu est un acide jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Le principe de cette méthode repose sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif (**Vermerris et Nicholson, 2006**). Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe bleu composé d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la teneur en composés phénoliques oxydés. (**Boizot et Charpentier, 2006**).

- **Mode opératoire**

En bref, 0,125 ml de solution d'extrait ont été mélangés avec 0,5 ml d'eau distillée et 0,125 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, 1,25 ml de solution de carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  à 7% a été ajouté au mélange. Le volume final a été ajusté à 2,5 ml avec de l'eau distillée et soigneusement mélangé. L'absorbance du complexe bleu résultant a été mesurée à 760 nm (Spectromètre UV-VIS, Double Beam PC UVD-2950, Labomed) après incubation pendant 90 min à 23°C à l'obscurité.

La teneur totale en phénols a été exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme de poids sec (mg GAE/g DW). La plage de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique était de 0 à 400 µg/ml.

D'autre part, la présence et la quantité de composés phénoliques dans l'extrait a été étudiée par analyse HPLC en phase inverse au moyen d'une élution à gradient binaire en utilisant un chromatographe liquide Agilent Technologies (HPLC, Palo Alto, CA, USA) couplée à un détecteur UV-VIS multi-longueur d'onde. (Edziri *et al.*, 2019).

#### **4. Dosage des flavonoïdes totaux**

La teneur en flavonoïdes totaux dans l'étude (Edziri *et al.*, 2019) a été mesurée par le test colorimétrique développé par Zhishen *et al.* (1999). Une partie aliquote d'échantillons dilués appropriés ou de la solution standard de catéchine a été mélangée avec 0,075 ml de solution de NaNO<sub>2</sub> (5% p/v). NaNO<sub>2</sub>.

0,15 ml d'une solution fraîche de (10%) d'AlCl<sub>3</sub> frais a été ajouté au mélange, suivi de 0,5 ml de solution de NaOH (1M). Le volume final a été ajusté à 2,5 ml avec de l'eau distillée et mélangé soigneusement. L'absorbance du mélange a été déterminée à 510 nm (Spectromètre UV-VIS, Double Beam PC UVD-2950, Labomed) par rapport au même mélange sans l'échantillon (blanc). Les flavonoïdes totaux ont été exprimés en mg d'équivalents de catéchines/g de poids sec.

#### **5. Isolement et identification des bactéries**

Après lecture des deux articles, nous constatons que dans l'étude de Sweedan *et al.*, (2019) des échantillons ont été prélevés auprès de patients souffrant d'infections des voies urinaires. Ces différents prélèvements ont été mis en culture pour la recherche de bactéries à Gram positif et négatif. L'identification des isolats est basée sur l'étude des caractères biochimique par le système VITEK 2.

##### **5.1. Identification par VITEK 2**

Le VITEK 2 est un automate de microbiologie qui permet d'obtenir, rapidement, des résultats de l'identification bactérienne, par des tests de sensibilité biochimique et antibiotique (Wibisono *et al.*, 2020).

L'étape d'identification nécessite l'utilisation des cartes réactives. Celles-ci permettent de mesurer diverses activités métaboliques comme l'acidification, l'alcalinisation, l'hydrolyse enzymatique (**Eddayab, 2012**).

→ Une carte GN pour bacilles à Gram négatif fermentatifs et non fermentatifs : 47 tests biochimiques, 19 tests enzymatiques dont les identifications sont disponibles après 10 h d'incubation (**Funke et Funke-Kissling, 2004**)

→ Une carte GP pour Cocci à Gram positif : 43 tests biochimiques, 17 tests enzymatiques dont les identifications sont disponibles après 8h d'incubation (**Funke et Funke-Kissling, 2005**).

## **6. Souches de références utilisées**

*Pseudomonas aeruginosa* CI122, *Pseudomonas aeruginosa* CI311, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* MRSA112, *Staphylococcus aureus* MRSA126, *Staphylococcus aureus* MRSA234, *Staphylococcus aureus* MRSA675, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* CI29, *Escherichia coli* CI423, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Enterococcus faecium* CI234, étaient les souches de référence utilisées dans l'étude (**Edziri et al., 2019**).

## **7. Etude de la sensibilité aux antibiotiques**

Les géloses Mueller-Hinton ont étéensemencées, à l'aide d'un étaleur stérile, à partir d'une culture bactérienne jeune (18h à 24h) à 0.5 Mac Farland ( $\approx 10^8$  UFC/ml). Les disques d'antibiotiques ont été déposés à la surface des géloses. Les boîtes ont été ensuite incubées pendant 24 h à 37°C. À l'aide d'un pied à coulisse, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques ont été mesurés afin d'interpréter les bactéries en 3 catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante. Dans cette étude, huit disques d'antibiotiques ont été utilisés : (Cefoxitin (30µg), Augmentin (30 µg), Gentamicine (10µg), Amikacin (30 µg), Cefixim (10µg), Amoxicilline (10µg), Ciprofloxacine (5µg), Imipénème (10µg). (**Bauer et al., 1966**).

## 8. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits préparés

### 8.1. Méthode de diffusion en puits

L'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique préparé dans l'étude de **Sweedan *et al.*, (2019)** a été déterminée par la méthode de diffusion par puits d'agar (**Mounyr *et al.*, 2016**). L'inoculum standardisé (0,5 Mac-Farland) de chaque bactérie a été étalé sur boîte d'agar Muller-Hinton stérile. Une fois la surface des boîtes ensemencées séchées, des puits de 7 mm de diamètre ont été perforés dans les géloses à l'aide du bout de pipettes pasteur stériles.

Les extraits séchés ont été dissous dans du Diméthyle Sulfoxyde (DMSO) à différentes concentrations (5- 60 mg/ml), placés dans chaque puit. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant une nuit, et l'activité antibactérienne a été identifiée avec déterminant le diamètre de la zone inhibitrice mesuré en mm.

### 8.2. Evaluation des Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (CMB) a été déterminée par méthode de macro-dilution dans l'étude de **Sweedan *et al.* (2019)** et par la méthode de micro dilution dans l'étude d'**Edziri *et al.* (2019)**.

#### 8.2.1. Méthode de macro dilution

La méthode de macro-dilution était parmi les premières à être développée et sert toujours de méthode de référence. Le principe de base de ce dosage est le même que le dosage de la micro-dilution au bouillon. Mais le test est effectué dans des tubes à essai contenant des concentrations différentes de l'agent antimicrobien avec le même volume.

Dans cette méthode, une suspension bactérienne standard (0.1 ml) et 1 ml de différentes concentrations de l'extrait (0,93-60 mg/ml) ont été ajoutés dans des tubes contenant 1 ml de bouillon *de* Mueller Hinton. Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant la nuit. Après l'incubation, les tubes sont examinés pour détecter les changements de turbidité comme indicateur de croissance. La CMI de l'extrait de plante peut être déterminée par la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui inhibera la croissance visible du microorganisme testé.

Les valeurs de la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été déterminées à partir des tubes clairs du test des concentrations minimales inhibitrices (CMI), ces tubes ont été ré inoculés sur une gélose Mueller-Hinton agar (MHA). Après 24h d'incubation à 37°C, le nombre d'organismes survivants a été déterminé en UFC/ml. Les valeurs CMB ont été



définies comme la concentration la plus faible de l'échantillon qui a entraîné une destruction  $\geq 99,9\%$  de l'inoculum initial. (Berghe et Vlietinck, 1991)

### 8.2.2. Méthode de micro dilution

La CMI (concentration minimale inhibitrice) et la CMB (concentration minimale bactéricide) ont été déterminées par une méthode de micro dilution en bouillon proposée par Novy *et al.* (2015) avec des modifications mineures.

100µl de bouillon Mueller -Hinton plus différentes concentrations d'extraits de plantes ont été préparés et transférés dans chaque puits de microplaque pour obtenir des dilutions en série de l'extrait actif, allant de 4 à 512 mg /ml. Ensuite 10 µl d'une culture fraîche (concentration finale de  $1.10^6$  UFC /ml) d'organisme testé ont été ajoutés. Les microplaques ont été incubées à 37 C° pendant 24 h. Des puits sans bactéries ajoutée ont été utilisés comme témoin de croissance négatif.

Les valeurs de la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été déterminées à partir des puits clairs du test des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

100µL ont été placés sur une gélose Mueller-Hinton agar (MHA). Après 24h d'incubation à 37°C, le nombre d'organismes survivants a été déterminé en UFC/ml. Les valeurs CMB ont été définies comme la concentration la plus faible de l'échantillon qui a entraîné une destruction  $\geq 99,9\%$  de l'inoculum initial.

## 9. Capacité des bactéries isolées à former un biofilm

Sweedan *et al.* (2019) ont essayé d'étudier la capacité des souches isolées à former un biofilm selon la méthode décrite par Steven et Timothy, (2010). Les suspensions bactériennes ajustées (200 µL), ont été déposées dans une plaque de micro titration préalablement rincée avec de l'éthanol à 80 %.

Après incubation le milieu a été retiré, et la plaque a été lavée cinq fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les bactéries non fixées. La plaque a été colorée avec le Crystal Violet (0,1%) pendant 15 minutes, et lavée cinq fois avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, 200µl de méthanol à 95% a été ajouté à chaque puits pendant 10 minutes. Le biofilm formé a été quantifié à 580 nm en utilisant un lecteur de microplaques spécifique.

## 10. Evaluation de l'activité anti biofilms

Les effets anti biofilms des extraits alcooliques préparés par macération ((**Edziri et al., 2019**) et soxhlet (**Sweedan et al., 2019**) ont été déterminés par la technique de cristal violet. Une suspension bactérienne était distribuée dans chaque puits de plaque en présence de milieu de culture (BHI), l'extrait méthanolique étaient ajoutés à des différentes concentrations. Après l'incubation pendant 24h à 37°C. Les cellules planctoniques ont été retirées et chaque puits de la microplaque est lavé et coloré par le cristal violet. Les biofilms colorés ont été solubilisés par l'éthanol absolu et les valeurs de densité optique (DO) ont été mesurées. Chaque essai a été effectué en trois exemplaires et le contrôle négatif était les bactéries dans le milieu de culture sans l'extrait. Le pourcentage d'inhibition du biofilm a été calculé en utilisant l'équation suivante :

(**Edziri et al., 2019**) : % Inhibition = [(contrôle de la croissance DO – échantillon de DO)/contrôle de croissance de la DO] × 100.

Dans l'étude de (**Sweedan et al., 2019**) , les résultats sont significatifs Lorsque la valeur p ( $\leq 0,05$ ) (**Steven et Timothy , 2010**).

***Troisième partie***  
***Résultats et discussion***

## 1. Teneur totale en phénols et flavonoïdes

Les analyses de l'extrait méthanolique dans les études d'**Edzir et al. (2019)** ont démontré que la teneur totale en phénols est de (47.47 mg GAE/g), et celle de flavonoïdes est de (7.29 mg CE/g). La composition en acides gras et la teneur en phénols des feuilles d'olive présentent des différences selon la variété d'olive. (**Ozcan et al., 2019**). **Akbas, et al. (2017)** ont rapporté que les teneurs totales en phénols les plus élevées ont été trouvées dans les feuilles d'olivier chauffées dans un four à micro-ondes (540 W).

Les analyses par HPLC des extraits de feuilles d'olivier a permis d'identifier neuf composés phénoliques à savoir l'Hydroxytyrosol, tyrosol, l'acide 4-hydroxybenzoïque, rutine, lutéoline-7-O-glucoside, apigénine-7-O-glucoside, oleuropéine, apigénine et catéchine hydrate. Tous ces composés ont été précédemment caractérisés dans les feuilles d'olives (**Meirinhos et al., 2005 ; Sahin et Bilgin, 2012 ; Benavente-Garcia et al., 2000**).

**Rocchetti et al. (2019)** ont rapporté que l'extraction assistée par un homogénéisateur en utilisant du méthanol à 100 % a produit un extrait de feuilles de *M. oleifera* avec les plus grandes quantités de composés phénoliques.

Ces résultats démontrent que chaque méthode d'extraction favorise la récupération de sous-classes phénoliques spécifiques avec des efficacités différentes. De plus, les conditions d'extraction (solvant, temps, température, ...) influencent le type de composés phénoliques des extraits de feuilles.

## 2. Identification bactérienne

Dans le but d'identification des souches présentes dans les urines de patients atteints d'infections urinaires, des tests ont été effectués par **Sweedan et al. (2019)**, les résultats démontrent la présence de bactéries à gram négatives (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *E. coli*) ; et une seule bactérie à gram positive *S.aureus* (SARM).

*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* et *E. coli* ont été identifiés principalement par leur croissance sur la gélose Mac Conkey. Les colonies d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* sont apparus sous forme de colonies roses car ils fermentent le lactose et l'indole positif pour *E. coli* tandis que le citrate de cimmon est positif pour *K. pneumoniae*.

Les colonies de *P. aeruginosa* sont apparues pâles sur le test de MacConkey car elle ne fermente pas le lactose. Les colonies de *P. aeruginosa* ont été testées pour leur capacité à produire une enzyme oxydase en utilisant le test de l'oxydase, ce test a donné un résultat positif.

*S.aureus* (MRSA) a été identifié principalement sur la gélose au sang, et sur gélose au sel de mannitol, ils se sont développés et ont donné des colonies jaunes en raison de leur capacité à fermenter le mannitol.

Tous les tests ont été confirmés par le système compact VITEK 2.

### 3. La sensibilité aux antibiotiques

Après identification des bactéries, **Sweedan et al., (2019)** ont réalisé un antibiogramme sur les quatre souches isolées vis-à-vis de huit antibiotiques à savoir Cefoxitin , Augmentin , Gentamicine , Amikacine , Cefixim , Amoxicilline , Ciprofloxacine , Imipenème .

Les résultats (**tableau 3**) démontrent que *Pneumoniae* n'était sensible qu'à deux antibiotiques (ciprofloxacine, amikacine) et résistante aux autres antibiotiques .En outre l'isolat de *E. Coli* était résistant à ciprofloxacine, Cefixim, Augmentin, amoxicilline, imipenème, gentamicine ; tandis qu'elle apparaît sensible à cefotaxim et Augmentin. *P. aeruginosa* était sensible à amikacine et imipenème et résistante à cefotaxim, ciprofloxacine, Augmentin, amoxicilline, imipenème et la gentamicine.

La bactérie *S.aureus* était résistant à Cefixim, Augmentin, amoxicilline, imipenème, et gentamicine) et sensible à cefotaxim et ciprofloxacine.

Par conséquent les bactéries de cette étude étaient multi résistantes aux antibiotiques, ces résultats concordent avec d'autres résultats selon lesquels les bactéries isolées auprès des malades souffrant des infections des voies urinaires (UTI) étaient résistantes à la plupart des antibiotiques utilisés par (**Richards et al., 1999**).

La résistance aux antibiotiques s'explique par l'acquisition et à l'expression des gènes de résistance, ces gènes sont partagés avec d'autres bactéries (**Collignon et al., 2018**). Ce problème est directement associé à la capacité des bactéries à survivre dans l'environnement hospitalier en raison de la présence d'une couche de biofilm par laquelle elles peuvent résister à l'entrée d'antibiotiques (**Qi et al. , 2016**).

Tableau 3 : résultats de l'antibiogramme

Les antibiotiques	<i>K. pneumoniae</i>		<i>E.coli</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>S.aureus</i>	
<b>Cefotaxim</b>	10 mm	R	26 mm	S	8 mm	R	28 mm	S
<b>Ciprofloxacine</b>	30 mm	S	11 mm	R	4 mm	R	26 mm	S
<b>Cefixim</b>	12 mm	R	10 mm	R	8 mm	R	0 mm	R
<b>Augmenten</b>	9 mm	R	27 mm	S	10 mm	R	7 mm	R
<b>Amoxicilline</b>	5 mm	R	0 mm	R	0 mm	R	0 mm	R
<b>Amikacine</b>	26 mm	S	10 mm	R	27 mm	S	25 mm	S
<b>Imipenem</b>	8 mm	R	5 mm	R	20 mm	S	0 mm	R
<b>Gentamicine</b>	10 mm	R	2 mm	R	6 mm	R	2 mm	R

S : sensible ; R : résistante

#### 4. Activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne de l'extrait alcoolique de feuilles d'olivier contre certaines bactéries pathogènes dans l'article de **Sweedan et al.(2019)** a été déterminée par la technique de diffusion par puits d'agar. L'extrait d'olivier a montré de bons effets inhibiteurs sur les bactéries pathogènes, comme le montre le **tableau 4**.

**Tableau 4 :** activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles d'olives (Sweedan et al., 2019)

Extrait éthanolique (mg/ml)	diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
5	-	-	-	-
10	-	-	-	-
15	-	-	5	-
20	6	8	10	10
25	10	11	16	15
30	13	14	20	18
35	15	15	22	20
40	16	17	25	21
45	17	18	27	23
50	19	20	30	25
55	21	25	33	26
60	22	27	35	28

De nombreuses études confirment le rôle positif de l'extrait de feuille d'olivier dans l'inhibition de bactéries pathogènes, **Zahra et al. (2016)** a montré que l'extrait de feuille d'olive n'avait pas un large spectre d'action contre tous les micro-organismes mais pourrait être une source utile d'agent antibactérien contre des bactéries particulières. De plus, l'effet antimicrobien de l'extrait varie selon le solvant utilisé, l'extrait aqueux d'huile d'olive (0,5, 1, 3 et 6 %) a une activité d'inhibition contre les pathogènes, bactéries *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus mutans* (**Buthina et al., 2018**).

La détermination des CMI/CMB, par le test de macro dilution dans l'étude de **Sweedan et al. (2019)** a montré que l'extrait alcoolique avait une meilleure CMI et une meilleure CMB de 15 mg/ml et 30 mg/ml sur *K. pneumoniae*, et *E. coli* respectivement. La CMI la plus élevée est celle de *P. aeruginosa* était de 30mg/ml et la MBC est de 60mg/ml. L'extrait a eu des activités inhibitrices contre *S. aureus* (MRSA) à des concentrations plus faibles que d'autres bactéries ont été utilisées dans ce travail, la valeur CMI était de 7,5 mg/ml et la MBC de 15 mg/ml. (**Tableau 5**).

**Tableau 5 :** CMI et CMB (mg/ml) de l'extrait éthanolique des feuilles d'olives  
(Sweedan *et al.*,2019)

Bactérie	CMI	MBC
<i>K.pneumonia</i>	15	30
<i>E.coli</i>	15	30
<i>P.aeruginosa</i>	30	60
<i>S.aureus</i>	7,5	15

Le **tableau 6** montre les valeurs de CMI pour l'extrait éthanolique des feuilles d'olives collectées de la région de Chetoui, obtenues par la méthode de micro dilution dans l'étude réalisée par **Edziri et al.**,(2019).

Les valeurs varient entre 32 et 64 µg/ml, L'extrait méthanolique a eu la meilleure activité antibactérienne contre toutes les bactéries à gram négatives et contre toutes les bactéries de l'espèce, et contre toutes les souches de *S. aureus*, avec des valeurs de CMI 64 et CMB de 32 µg/ml.

L'extrait méthanolique d'*Olea africana* a une bonne activité antibactérienne contre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *S. aureus*, avec des valeurs CMI comprises entre 0,24 et 0,63 mg/ml. Les différences de valeurs de CMI observées dans les différentes études sont probablement dues à des différences entre les espèces d'olives, mais aussi à la méthode d'extraction utilisée, et l'affinité des composés au solvant utilisé.

Plusieurs travaux ont démontré que les bactéries à Gram positives comme les staphylocoques sont généralement plus sensibles aux molécules bioactives que les bactéries à Gram négatives, et ceci pourrait être attribuée aux différences dans les constitutions morphologiques de ces microorganismes (**Pitchamuthu et al.**, 2012).

**Tableau 6 :** CMI et CMB (µg/ml) de l'extrait éthanolique des feuilles d'olives (**Edziri et al.**,2019)

Souche	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
--------	-------------	-------------



<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C1122	64	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C1311	64	64
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	64	32
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA112	64	32
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA126		32
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA234	64	32
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA675	64	32
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	64	64
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14679	64	64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	64	32
<i>klebsiella pneumoniae</i> C129	32	32
<i>Escherichia coli</i> C1423	64	32
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	32	32
<i>Enterococcus faecium</i> C1234	32	32

Les bactéries Gram négatives sont moins sensibles aux polyphénols que les bactéries Gram positives (Seow *et al.*, 2014). Les bactéries Gram-positives sont plus sensibles aux polyphénols car leur membrane interagit avec les composés hydrophobes des polyphénols. De même, les bactéries Gram-négatives sont plus résistantes aux polyphénols car leur paroi cellulaire possède des composants hydrophiles (Calo *et al.*, 2015). Selon Edzir *et al.* (2019), l'activité antibactérienne des olives pourrait être attribuée à l'oleuropéine, qui est le composé majeur identifié dans les polyphénols ou cela peut être dû à la différence climatique entre les variétés d'olives.

Selon Pereira *et al.* (2007), le mécanisme antimicrobien de l'extrait consiste en la dénaturation de l'ADN de la plante et des protéines et l'augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire. De même, Lee et Lee (2010) ont rapporté que le mélange de phénols combinés préparé à partir d'un extrait de feuilles d'olivier a montré des effets d'inhibition contre *B. cereus* et *S. enteritidis*.

## 5. Activité antibiofilm

Sweedan *et al.* (2019) ont essayé d'étudier la capacité des souches isolées à former un biofilm par la méthode de microplaque de titration, et Les résultats obtenus ont montré que toutes les bactéries utilisées dans cette étude étaient fortement productrices de biofilms. Selon la même

étude, l'extrait éthanolique d'*Olea europea* présente une bonne activité antibiofilm contre toutes les bactéries sélectionnées dans leur travail, à l'exception d'*E. Coli*. (Tableau 7)

**Tableau 7 :** activité antibiofilm de l'extrait éthanolique des feuilles d'olives

(OLE)	<i>E.coli</i>		<i>K.pneumoniae</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>S.aureus</i>	
	sans OLE	avec OLE	sans OLE	avec OLE	sans OLE	avec OLE	sans OLE	avec OLE
7,5mg/ml	0,0665 +/- 0,7169	0,061 +/- 0,601	0,251 +/- 0,601	0,2855+/- -0,0031	0,236+/- 0,0820	0,161+/- 0,0007	0,3555+/- -0,1060	0,0815+/- -0,0141

Dans l'article d'Edzir *et al.* (2019) a montré des effets variables sur le développement d'un biofilm préformé. L'extrait méthanolique a présenté une bonne activité antibiofilm contre *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. aureus MRS*, avec des valeurs d'inhibition de >50 % aux doses CMI. Cet extrait a montré d'importantes activités anti-biofilm contre *P.Aeruginosa*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis* et *E. coli*, avec des pourcentages de se situait entre 83 et 93 % aux valeurs 2 CMI. (Tableau 8)

**Tableau 8 :** Activité antibiofilm de l'extrait méthanolique des feuilles d'olives

Bactérie / CMI (µg/ml)	CMI	2MIC	4MIC
<i>P.aeruginosa</i>	65%	82%	88%
<i>S. aureus</i>	55%	68%	73%
<i>S. aureus</i>	56%	79%	90%
<i>B.cereus</i>	56%	85%	85%
<i>E. coli</i>	57%	84%	88%
<i>E. faecalis</i>	68%	86%	91%

--	--	--	--

L'activité antibiofilm observée est généralement attribuable aux concentrations élevées de composés phénoliques, tels que les acides gras polyinsaturés, concentrations élevées de composés phénoliques, tels que l'oleuropéine, qui ont la capacité d'augmenter la perméabilité des membranes cellulaires, facilitant ainsi leur rupture (**Tawechaisupapong et al., 2012**). **Casas-Sanchez et al. (2007)** ont rapporté l'interaction de l'oleuropéine avec le phosphatidyl glycérol à la surface de la membrane cellulaire bactérienne, provoquant des modifications qui conduisent à la rupture de l'enveloppe cellulaire. Les activités antimicrobiennes observées.

La bactérie *E. Coli* apparait sensible à l'extrait méthanolique, et résistante à l'extrait éthanolique, de plus résultat obtenu dans le travail de **Sweedan et al. (2019)** concernant cette bactérie est en désaccord avec les résultats obtenus par (**Carraro et al., 2014**), ces résultats peuvent être dus au fait que dans cette étude, la bactérie *E. coli* a été isolée des infections urinaires, tandis que dans l'autre étude ont été isolées de de patients souffrant de diarrhée.

# ***Conclusion***

L'objectif de ce travail était de déterminer l'activité anti biofilm de quelques extraits de graines de lin vis-à-vis de quelques bactéries pathogènes à travers une synthèse de deux articles.

Toutes les bactéries ont montré une sensibilité à l'extrait éthanolique de feuilles d'olivier dans l'étude de **Sweedan et al. (2019)**, *S. aureus* (MRSA) était la bactérie la plus sensible à l'extrait alcoolique. Selon la même étude, l'extrait éthanolique d'*Olea europea* présente une bonne activité antibiofilm contre toutes les bactéries sélectionnées dans leur travail, à l'exception d'*E. Coli*.

L'extrait méthanolique d'*Olea europea* a une bonne activité antibactérienne contre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* et *S. aureus* dans l'article d'**Edziri et al., 2019**. Ce même extrait a montré d'importante activité anti-biofilm contre *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis* et *E. coli*, avec des pourcentages de se situait entre 83 et 93 % aux valeurs 2 CMI.

Les travaux réalisés par ces deux auteurs confirment de plus en plus notre besoin au développement rapide de solutions basées sur l'utilisation des molécules bioactives.

Comme perspectives, il serait souhaitable de réaliser les mêmes travaux en utilisant des extraits de feuilles d'olive utilisées localement en Algérie sur des souches isolées du milieu hospitalier.

## ***Références bibliographiques***

- **Akbas , U. G., Uslu , N ., Juhaimi , F.A ., Ozcan , M . M , Ghafoor , K ., Babiker , E.E.,...Preservation .(2018).** The effect of drying on phenolic compound , antioxidant activity , and mineral contents of leaves of different olive varieties .42 (5), e13606.
- **Arslan , A., Mc Carthy , N., Lipper , l ., Asfaw ,S., Cattaneo , A., & Kokwe , M.(2014).** Food security and adaptation impacts of potential climate smart agricultural practices in zambia .
- **Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., & Ülkü, S. (2008).** Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 342-348.
- **Ali Amechrouq ,MohammedElhourı ,Yasmine Ghouati ,Said Chakir ,Adraelemrhari.2018.**Comparative Study Of The Chemical Composition Of Essential Oils OfCuminum Cyminum Seeds Of The Mediterranean ,Rhazes :Green And Applied Chemist.
- **Altaf, S., Meraj, G., & Romshoo, S. A. (2014).** Morphometry and land cover based multi-criteria analysis for assessing the soil erosion susceptibility of the western Himalayan watershed. *Environmental monitoring and assessment*, 186(12), 8391-84
- **Anthony S. J., et al. (2015).** &#39;Non-random patterns in viral diversity&#39;; *Nature Communications*, 6: 8147.
- **Anthony S. J., et al. (2015).** &#39;Non-random patterns in viral diversity&#39;; *Nature Communications*, 6: 8147.
- **Aouidi, F., Dupuy, N., Artaud, J., Roussos, S., Msallem, M., Gaime, I. P., & Hamdi, M. (2012).** Rapid quantitative determination of oleuropein in olive leaves (*Olea europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 292-297.
- **Balouiri,M., Sadiki, M., & Ibnsouda , S. K.J.J.o.p.a .(2016).** Methodes for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review .6(2),71-79.
- **Bauer, A.J.A.J.c.p.(1996).**Antibiotic susceptibility testing by a standadized single disc method .45,149-158 .
- **Belo, Y. N., Al-Hamimi, S., Chimuka, L., & Turner, C. (2019).** Ultrahigh-pressure supercritical fluid extraction and chromatography of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* seed lipids. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(16), 3685-3693

- **Beloin C., Roux A., Ghigo J.M. 2008.** Escherichia coli biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322, pp249-289.
- **Benavente , G.O., Castillo, J., Lorente , J., Ortuno, A.,& Del Rio , J.J.F.C.(2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from olea europaeae L.leaves .68(1),457-462.
- **Bensemmane ,A.J.F.i.(2009).** Développons le secteur de l’huile d’olive en Algérie . (4),7.
- **Bergé ,Virginie ,Vlientinel.(1991).**Dépistage méthode pour antibactérien et agents antiv
- **BirmpaA,Sfika V, Vantarakis A.2013 .**Ultraviolet light and ultrasond as non-thermal treatments forthe inactivation of microorganisms in ready –to-eat foods.*International Journal of food Microbiology*167 :96-102.
- **Biozot,N.,&Charpentier ,J.P.J.C.d .T.d.1.I.(2006).** Méthode rapide d’évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d’un arbre forestier .79-82 .
- **BirmpaA,Sfika V, Vantarakis A.2013 .**Ultraviolet light and ultrasond as non-thermal treatments forthe inactivation of microorganisms in ready –to-eat foods.*International Journal of food Microbiology*167 :96-102.
- **Brackman, G., and Coenye, T. (2015).** Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr. Pharm.Des.* 21, 5–11. doi: 10.2174/1381612820666140905114627
- **Burall, L. S., Grim, C. J., and Datta, A. R.(2017).** A clade of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains linked to recent listeriosisoutbreaks associated with produce from a defined geographic region in the US. *PLoS One*12:e0176912. doi:10.1371/journal.pone.0176912.
- **Buthina ,A.A., Husamuldeen , S .M. S., Noor ,A.A.(2018).** Antimicrobial activity and evaluation of genetic effects of olives leaves using molecular technique . *Journal of Entomology and zoologie studies* .6 (1) :1493-1495.
- **Carraro , L., Fasolato , L., Montemurro ,F., Martino , M. E.,Balzan , S., Servili , M....Cardazzo , B . J.M .b (2014).** Polyphenols from olive mille waste affect biofilm formation llland motility in *Escherichia coli* K-12.7(3),265-275.
- **Casas – Sanchez , J., Alsina , M . A ., Herrlein , M.K ., mestres ,C.J.,& Science ,P. (2007).**interaction between the antibacterial coumpound , oleuropein , and model membranes .285 (12) ;1351-1360
- **Cronquist, A., & Takhtadzhian, A. L. (1981).** *An integrated system of classification of flowering plants.* Columbia university press.



- Cuevas, J., & Polito, V. S. (1997).** Compatibility relationships in Manzanillo olive. *HortScience*, 32(6), 1056-1058.
- Casas – Sanchez, J., Alsina, M. A., Herrlein, M.K., mestres, C.J., & Science, P. (2007).** Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *285 (12)*; 1351-1360.
- Edziri, H., Jaziri, R., Chehab, H., Verschaeve, L., Flamini, G., Boujnah, D., ... Mastouri, M. J.H. (2019).** A comparative study of chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves, exudates and combined extracts of four Tunisian olive cultivars. *5(5)*, e01604.
- C.M. Saviuc, V. Drumea, L. Olariu, M.C. Chifiriuc, E. Bezirtzoglou, V. Lazăr. (2015).** Huiles essentielles à activité microbicide et antibiofilm. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 16, p. 137-151.
- Charaklis, W. G. Marshall, K.C. (1990).** Biofilms. New York: Wiley.
- **Chung, J., Goo, E., Yu, S., Choi, O., Lee, J., Kim, J., et al. (2011).** Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12089–12094. doi:10.1073/pnas.1103165108.
  - **Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine, *121*, 1–17.
  - **Characklis, W G. & Wenden, E. (1990).** Biofilms in potable water distribution systems. In *Drinking water microbiology* (pp. 249-268). Springer, New York, NY.
  - **Costerton, J., Chan, R., Lam, K., & Lam, J. (1980).** Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infection and immunity*, 28(2), 546-556.
  - **Costerton J. 1999.** Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11 : 217–221.
  - **Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Álvarez-Ordóñez, A. (2016).** New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.* 7:1641. doi: 10.3389/fmicb.2016. 01641.

- **Da Silva FR, et al. (2011).**Oroidin inhibits the activity of the multidrug resistance target Pdr5p from yeast plasma membranes. *J Nat Prod* 74(2):279-82.
  - **Da Silva, E. P., and De Martinis, E. C. (2013).**Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 957–968. doi:10.1007/s00253-012-4611.
  - **Daniel fong et Prabjit Bran.2012.**Cleaning ,disinfection and sterilization in personal service settings,national collaborating center for environmental health.
  - **Dong, Y.-H., Wang, L.-H., Xu, J.-L., Zhang, H.-B., Zhang, X.-F., and Zhang, L.-H. (2001).** Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411,813–817. doi: 10.1038/35081101.
- Donlan R.M. (2002).**Biofilms:Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases.* 8 : 881–890.
- **Dosti B., Guzel-Seydim Z., Greene A. K. (2005).** Efficacité de l’ozone, de la chaleur et du chlore pour détruire les bactéries courantes de détérioration des aliments dans les milieux synthétiques et les biofilms. *Int. J. Dairy Technol.* 58 19-24. 10.1111/j.14710307.2005.00176.x.
  - **Eddayab, Y. (2012).** *Détection des bactéries multirésistantes au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges* (Doctoral dissertation).
  - **FAOSTAT., 2013.** Site web : <http://faostat.fao.org/>
  - **Fromantin, I. (2012).** Etude de la flore bactérienne dans les plaies tumorales du sein: incidence des biofilms bactériens sur l'évolution des plaies et le développement d'odeurs (Doctoral dissertation, Cergy-Pontoise).
  - **Funke , G.,& Funke , P.J.J.o.c .m.(2005).** Performance of the new VITEK2 card for identification of medically relevant gram negative rods .42(9),4067-4071
  - **Funk , G .,&Funke -kissling , P.J.J.o.c.m.(2005).** Performance of the new VITEK 2.Gp card for identification of medically relevant gram positive cocci in a routine clinical laboratory .43(1),,84-88 .
  - **Filloux, A., & Vallet, I. (2003).** Biofilm: mise en place et organisation d’une communauté bactérienne *Biofilm: positioning and organisation of bacterial communities. Medecine/Sciences,* 19, 77-83.

- **Galie S., Garcia-Gutierrez C., Miguez E. M., Villar C. J., Lombo F. (2018).** Biofilms dans l'industrie alimentaire: aspects sanitaires et méthodes de contrôle. *Devantmicrobiol.* 9:898 10.3389/fmicb.00898.
- **Gomes , S., Martins -lopes , P. , &Guedes -Pinto , H .(2012).**olive tree genetic resources characterization through molecular markers .
- **Gupta P., Sarkar S., Das B., Bhattacharjee S., Tribedi P. (2015).** Biofilm,pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review.*Archives ofMicrobiology.* 198 : 1–15.
- **HALL-Stoodley.L.Stoodley,P\_Kathju,S,Hoiby.NMoser,C,William Costerton.J...**  
**Microbiology,M(2012).**Towards diagnostics guidelines for biofilm- associated infections .65(2).127-145
- **Halli,K &Khaldi S.(2019)** .caracterisation des olives et de l'huile d'olive de la variété chemlal dans la regions de Bénie Zmenzer et Freha UMMTO.
- **Harper DR Parracho HMR Walker J et coll. 2014.**Bactériophages et biofilms Antibiotiques 3 270 84.
- **Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. and Bjarnsholt, T. 2011.** Theclinical impact of bacterial biofilms. *Intern J of Oral Sci.* 3(2), pp 55-65.
- **Huang, C., Yang, L., Homer, C. G., Wylie, B. K., & Coan, M. J. (2003).** An approach for mapping large-area impervious surfaces: synergistic use of Landsat-7 ETM+ and high spatial resolution imagery. *Canadian journal of remote sensing*, 29(2), 230-240.
- **Ivashko, D. G., Prilutsky, B. I., Markin, S. N., Chapin, J. K., & Rybak, I. A. (2003).** Modeling the spinal cord neural circuitry controlling cat hindlimb movement during locomotion. *Neurocomputing*, 52, 621-629.
- **Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. (2008).** Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-biological interactions*, 176(2-3), 88-98.
- **Kasraoui,F-M,(2010)**-l'olivier ,le site officiel de l'ing Med-P,2-5.
- **Korukluoglu, M., Sahan, Y. A. S. E. M. İ. N., & Yigit, A. (2008).** Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of food safety*, 28(1), 76-87.
- **Kavanaugh NL, Ribbeck K.(2012).** Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* sppand *Staphylococcus aureus* biofilms. *ApplEnvirMicrobiol.* ;78(11):4057-61.

- **Khan, F., Oloketuyi, S. F., et Kim, Y. M. (2019).**Diversité des bactéries et des produits bactériens comme anti-biofilm et anti-quorum sensing des médicaments contre les bactéries pathogènes. *Curr. Drug Targets* 20, 1156-1179. doi: 10.2174/1389450120666190423161249.
- **Korukluoglu, M., Sahan, Y. A. S. E. M. İ. N., & Yigit, A. (2008).** Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. *Journal of food safety*, 28(1), 76-87.
- **Kolter, R., Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R. (2008).** Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & development*, 22(7), 945-953.
- **Lagrange-Pugct M, Duric I, Ecochard R, Abbas – Chorfa F, Draï J, Steghens JP, Pacheco Y, Vital-Durand D, Bellon G .2004.** Longitudinal study of oxidative status in 312 cystic fibrosis patients in stable state and during bronchial exacerbation. *Pediatr Pulmonol* 38 :43-49.
- **Lee, O-H, Lee, B-Y, (2010).** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract *Bioresource Technology*, 101(10), 3751-3754.
- **Loussert R. Brousse G. , 1978.** L'olivier . Techniques agricoles et productions méditerranéennes . ( Eds . ) Maisonneuve et Larousse , Paris , France , 480
  - **Markin, S. N., Ivashko, D. G., Prilutsky, B. I., Chapin, J. K., & Rybak, I. A. (2003).** Modeling the spinal cord neural circuitry controlling cat hindlimb movement during locomotion. *Neurocomputing*, 52, 621-629.
  - **Maillard J. Sattar SA. 2013 .**Principles and Practice of disinfection. Preservation and sterilization ,5th edn. Hoboken, NJ :Wiley-Blackwell.
  - **Mattick, A. T., and Hirsch, A. (1947).** Further observations on an inhibitory substance (NISIN) from lactic streptococci. *Lancet* 4:3. doi: 10.1016/S0140- 6736(47)90004-4.
  - **(Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., & Hollingsworth, M. A. (1999).** Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276(4), G941-G950.
  - **Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Más, V., Pérez, L., & Estepa, A. (2005).** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral research*, 66(2-3), 129-136
  - **Mendil, D., Sari, A., Tuzen, M., & Soylak, M. (2009).** Biosorption of palladium (II) from aqueous solution by moss (*Racomitrium lanuginosum*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of hazardous materials*, 162(2-3), 874-879.

- **Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., & Miniati, E. (1992).** Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Initial characterization of the hydrolyzable fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1577-1580.
- **Mounyr, B., Smahane, B., Faisl, B., Stephane, M., Sghir, M., & Dalila, B. (2016).** Antimicrobial activities of essential oil of five plant species from Morocco against some microbial strains. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(11), 1901-1906.
- **Montville TJ, Matthews KR, Kniel KE .2012 .**Food Microbiology :An Introduction, 3rd edn .NewYork :ASM PressFraise AP.
- **Muzzalupo, I., Vendramin, G. G., & Chiappetta, A. (2014).** Genetic biodiversity of Italian olives (*Olea europaea*) germplasm analyzed by SSR markers. *The Scientific World Journal*, 2014.
- **Novy, P., Davidova, H., Serrano-Rojero, C. S., Rondevaldova, J., Pulkrabek, J., & Kokoska, L. (2015).** Composition and antimicrobial activity of *Euphrasia rostkoviana* Hayne essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- **Nostro, A, R.A. Sudano, G. Bisignano, A. Marino, M.A. Cannatelli, F.C. Pizzimenti. (2007).** Effets de l'origan, du carvacrol et du thymol sur les biofilms de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.*, 56 , p. 519-523.
- **N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., ... & Hammer, K. A. (2009).** Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 461-463.
- **O'TOOLE GA, KOLTER R .1998.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.*, 30, 295-304.
- **Özcan, M.M, Matthäus, B.J.E.F.R., & Technology .(2017).** A review. Benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves .243(1), 89-99.
- **Ozdemir, C. E., HSU, T-J, & Balachandar, S. 2010.** Simulation of fine sediment transport in oscillatory boundary layer, *Journal of Hydro-environment Research*, 4, doi:10.1016/j.jher.
- **Pereira, A. C., Huddleston, D. E., Brickman, A. M., Sosunov, A. A., Hen, R., McKhann, G. M., ... & Small, S. A. (2007).** An in vivo correlate of exercise-induced

neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5638-5643.

- **Pereira RN, Vicente AA. 2010.** Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International* 43 :1936-1943.
- **Perez-Martinez, I., and Haas, D. (2011).** Azithromycin inhibits expression of the GacA-dependent small RNAs RsmY and RsmZ in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55,3399–3405. doi: 10.1128/AAC.01801-10.
- **Phillips P.I., Wolcott R.D., Fletcher J., Schultz G.S. (2010).** Biofilms made easy. *Wounds International*, 1(3): 012.
- **Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H. & Gaynes, R.P. J.C.C.M (1999).** Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *JAMA* 27(5).887-892.
- **R. Kolter, K.P. Citron, A.M. Earl, H.C. Vlamakis, C. Aguilar. 2008.** Développement de biofilms avec un accent sur *Bacillus subtilis*, Fait partie de la série de livres *Current Topics in Microbiology and Immunology (CT MICROBIOLOGY)*, volume 322.
- **Roux A., Ghigo J.-M. (2006).** Les biofilms bactériens. *Bul. del'Ac. Vét. de France*
- **Rochetti, G., Blasi F., Montesano, D., Ghisoni, S., Marcotullio, M., C. Sabatini, S., ... Lucini, L.J.F. (2019).** Impact of conventional /non – conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of moringa oleifera leaves. *Food Chemistry* 115,319-327.
- **Rubiés, J. P. (2006).** Theology, ethnography, and the historicization of idolatry. *Journal of the History of Ideas*, 67(4), 571-596.
- **Rubio de Casas, R., Besnard, G., Schonswetter, P., Balguer, L., Vargas, P.J.T. & Gentic A. (2006).** Extensive gene flow blurs phylogeogenetic signal in *Olea europaea* L. *Journal of Heredity* 113(4), 575-583.
- **Sahin, S., Bilgin, M.J.S.S., & Technoligy. (2012).** Study on oleuropein extraction from olive tree (*Olea europaea*) leaves by means of SFE: comparison of water and ethanol as co-solvent. *Journal of Food Processing and Preservation*, 47(16), 2391-2398.
- **Sánchez, M., Ca'Zorzi, M., Hahn, E. (2007).** Exchange rate pass-through in emerging markets
- **Sauer, K., Camper, A.K., 2001.** Characterization of Phenotypic Changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in Response to Surface-Associated Growth

- **Steven , M., Kawasny ,M., Timothé,J. Opporum.(2010).** Actuel protocol Pharmaciaacol(50):13 A.8-1.13A.8-23.
- **Strepel, N., Strehmel, J., and Overhage, J. (2015).** Potential application of antimicrobialpeptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Curr. Pharm. Des.* 21, 67–84doi:10.2174/1381612820666140905124312.
- **Sudjana, A. Strepel, N., Strehmel, J., and Overhage, J. (2015).** Potential application of antimicrobialpeptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Curr. Pharm. Des.* 21, 67–84doi:10.2174/1381612820666140905124312.
- **Sutherland I.W .2001.**biofilm exopolysaccharides :a strong and stickyframework.*Microbiology*,147,3-9.
- **Suzuki Y., Kaji S., Nisjiyama M., Iguchi A.( 2015).** Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolatescollected from river water in Japan to antipseudomonal agents. *Science of the Total Environment*,450-451: 148-154, doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.02.011.
- **Taweekhaisupapong, S.,Ngaonee,P., Pstuk ,P., Pitiphat, W., &Kunkinkitti ,W.J.S.A.J.o.B.(2012).**Antibiofilm activity and postantifungal effect of lemongrassoil on clinical candida dubliniensis isolate .78,37-43.
- **Thierry J. (2008).** Biofilms bactériens. *Techniques de l&#39;Ingénieur*,TowardsAntimicrobial Peptides. PLoS ONE, 3 : 1-4.
- **Tote K, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. (2010).** Un nouveau modèle colorimétrique de microtitrage pour la détection des biofilms de *Staphylococcus aureus*. *LettApplMicrobiol* 46:249-254. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02298.x.
- **Toty, A. A., Guessennd, N., Bahi, C., KRA, A. K. M., Tokore, D. A., & Dosso, M. (2013).** Évaluation in-vitro de l’activité antibactérienne de l’extrait aqueux de l’écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la société royale des sciences de Liège*.
- **Tubiello, F. N., Salvatore, M., Rossi, S., Ferrara, A., Fitton, N., & Smith, P. (2013).** The FAOSTAT database of greenhouse gas emissions from agriculture. *Environmental Research Letters*, 8(1), 015009.

- **Van Houdt R., Michiels C. W. (2010).** Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* 109 1117–1131. 10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x.
- **Vermerris ,W.,Nicholson ,R.(2006).**Phenolic compound .USA springer Nueva york EEUV.3(16):151-153.
- **Villemur , P., Mshou ,S., Delmas, J.M.Maamar , M., Ouksili, A.(1994).**contribution a l'étude la biologie finale de l'olivier(olea europeae)stérilité male,flux poulinique.
- **Waqas, S., Bilad, M. R., Man, Z., Wibisono, Y., Jaafar, J., Mahlia, T. M. I., ... & Aslam, M. (2020).** Recent progress in integrated fixed-film activated sludge process for wastewater treatment: A review. *Journal of environmental management*, 268, 110718.
- **Yang, X., Wang, S., Zhang, W., Li, J., Zou, Y., 2016b.** Impacts of energy consumption, energy structure, and treatment technology on SO<sub>2</sub> emissions: A multi-scale LMDI decomposition analysis in China. *Applied Energy* 184, 714-726.
- **Yin W., Wang Y., Liu L., He J. (2019).** Biofilms: The Microbial —Protective Clothing in Extreme Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 :3423.
- **Yin, W., Wang, Y., Liu, L., et He, J. (2019).** Biofilms : les « vêtements de protection » microbiens dans des environnements extrêmes. *Int. J. Mol. Sci.*
- **Zhao, C., B. Liu, S. Piao, X. Wang, D.B. Lobell, Y. Huang, M. Huang, Y. Yao, S. Bassu, P. Ciaï, J.-L. Durand, J. Elliott, F. Ewert, I.A. Janssens, T. Li, E. Lin, Q. Liu, P. Martre, C. Müller, S. Peng, J. Peñuelas, A.C. Ruane, D. Wallach, T. Wang, D. Wu, Z. Liu, Y. Zhu, Z. Zhu, and S. Asseng, 2017.** Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- **Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. J. F. C. (1999).** the determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. 64(4), 555-559.





# Annexes



Available online freely at [www.isisn.org](http://www.isisn.org)

## Bioscience Research

Print ISSN: 1811-9506 Online ISSN: 2218-3973

Journal by Innovative Scientific Information & Services Network



RESEARCH ARTICLE

BIOSCIENCE RESEARCH, 2019 16(1):367-374.

OPEN ACCESS

### Antimicrobial and antibiofilm activities of alcoholic extract of olive leaves (*olea europaea*) against pathogenic bacteria

<sup>1</sup>Enass Ghassan Sweedan\*, <sup>2</sup>Alaa M. Dh. Al-haidari, <sup>3</sup>Ali Muayyed Magemand and <sup>4</sup>Mostafa Abed almohsen

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

<sup>4</sup>Department of Biology, Faculty of Science, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

\*Correspondence: [enass\\_ghassan@yahoo.com](mailto:enass_ghassan@yahoo.com) Accepted: 01 Feb.2019 Published online: 25 Feb. 2019

A long time ago the importance of olive leaf extract was proven in the treatment of many cases that can be caused by viruses, bacteria, fungi and others organisms. And in this study results showed that, all bacteria were resisted to almost antibiotics which used in this study. The antibacterial activity of alcoholic olive leaf extract (OLE) was confirmed with agar well diffusion method and the OLE was had a good antibacterial activity with low concentrations against pathogenic bacteria were used in this study. And MIC, MBC concentrations were showed that OLE had higher concentrations of MIC 30 mg/ml and MBC of 60 mg/ml respectively against *Pseudomonas aeruginosa*. And lower concentrations of MBC *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolate was sensitive to (OLE) in 15 mg/ml, while MIC was 7.5 mg/ml. The results were showed that all bacteria were used in this study were strong biofilm production, and (OLE) can inhibit biofilm formation in pathogenic bacteria were selected in this study, ( $p \leq 0.05$ ) .except *Escherichia coli* the OLE did not have activity against biofilm which produced by this bacteria, p value = (0.2).

**Keywords:** Olive leaves extract, antimicrobial activity, biofilm formation.

#### INTRODUCTION

The olive tree known as *Olea europaea*, and its herbal product famous as olive leaf extract. It was shown a good activity against many diseases (Huang et al., 2003). Much research was mentioned there is an antimicrobial activity of olive oil, and was tested against phytopathogenic microorganisms. It was found that several salt-free solutions from olive oil production processes are rich in antimicrobial compounds, and they have bactericidal and antifungal activity against these microorganisms; and diseases causing them like: influenza, Epstein-Barr virus (EBV), HIV/AIDS, chronic fatigue, hepatitis B, Candida infections, meningitis, pneumonia,

tuberculosis, gonorrhoea, malaria, dengue, severe diarrhoea, and dental, ear, and urinary tract infections (Eduardo et al., 2013). Polyphenols of olive leaf, especially oleuropein, have interesting effects on the human body such as antioxidant capability, antihypertensive, hypoglycemic, hypocholesterolemic (Patrícia et al., 2015). Antibiotics are important biochemical produced by microorganisms and widely used. Unfortunately, wrong use of antibiotics from either patients or physicians increased resistance of bacteria; therefore caused an increasing interest in antimicrobial plant extracts (Freidman, 2007). Antimicrobial effect of OLE was improved against food borne pathogens, like *Listeria*

Heliyon 5 (2019) e01604



Contents lists available at ScienceDirect

Heliyon

Heliyon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/heliyon](http://www.elsevier.com/locate/heliyon)

A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars

Hayet Edziri<sup>a</sup>, Raouf Jaziri<sup>b,d</sup>, Hechmi Chehab<sup>e</sup>, Luc Verschaeve<sup>e,d</sup>, Guido Flamini<sup>d,g,h</sup>, Dalenda Boujnah<sup>e</sup>, Mohamed Hammami<sup>f</sup>, Mahjoub Aouni<sup>a</sup>, Maha Mastouri<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Transmissible Diseases and Biologically Active Substances, Faculty of Pharmacy, 5000, Monastir, Tunisia

<sup>b</sup> Department of Healthcare Services and Hospital Management, University of Jeddah, Saudi Arabia

<sup>c</sup> Scienzano, Risk and Health Impact Assessment Service, Brussels, Belgium

<sup>d</sup> Department of Biomedical Sciences, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

<sup>e</sup> Institut of Olive Sousse, B.P.40 Ibn Khaldoun, 4061, Sousse, Tunisia

<sup>f</sup> Laboratory of Biochemistry, USCR Mass Spectrometry, UR Nutrition and Metabolic Disorders, Faculty of Medicine, University of Monastir, 5000, Monastir, Tunisia

<sup>g</sup> Dipartimento di Farmacia, Via Bonanno 6, 56126, Pisa, Italy

<sup>h</sup> Centro Interdipartimentale di Ricerca "Nutraceutica e Alimentazione per la Salute" (NUTRAFOOD), Università di Pisa, Via del Borghetto 80, 56124, Pisa, Italy