

*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

UNIVERSITÉ de TLEMCEM



*Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers
Département de biologie*

Laboratoire : Antibiotiques, antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique

*Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master
Filière : Sciences biologiques
Option : Biochimie Appliquée*

Thème

**RECHERCHE DES EFFETS ANTIMICROBIENS ET ÉTUDE
DE LA CYTOTOXICITÉ DES EXTRAITS D'OLEA
EUROPAEA**

Présenté par : *Boutaayachet Soumicha Fairouz*

Soutenu le : 24/06/2020

Devant le jury composé de :

Président	Mr LAHFA F.B.	Professeur	Université de Tlemcen
Promotrice	Mlle MEZOUAR D.	Maître de conférences B	Université de Tlemcen
Examineur	Mr RAHMOUN M.N.	Maître de conférences A	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2019 – 2020



Remerciements

Je remercie ALLAH de m'avoir aidé et m'a ouvert les Portes du succès

Et m'a donné la force, la santé et la patience pour réussir avec succès

Après avoir terminé ce travail, je voudrais remercier :

Je commence la parole de remerciement à **MA MERE** celle qui a beaucoup sacrifié pour

Moi et a beaucoup souffert pour moi, elle m'a appris que rien n'est impossible, je la trouve, toujours me guidant dans ma vie, et je ne peux pas accomplir même de ses sacrifices et pour cela je lui donne de tout mon cœur la parole de remerciement, merci maman.

MON PERE, à celui qui a allumé ma première bougie au parfum de mon enfance, à la chaleur de ma vie, à celui qui m'a soutenu le jour de ma faiblesse, à celui qui m'a appris un succès précieux et à celui qui a tout fait en échange pour me voir mieux, merci beaucoup mon père.

Après mes parents, je veux remercier mon honorable professeur **MEZOUAR D.**, vous avez toute appréciation et respect par le nombre de goutte de pluie et les couleurs des fleurs merci pour vos précieux efforts, c'est vous qui a transformé l'échec en succès admirable monté aux sommets. Vous êtes des gens de distinction.

Du fond de mon cœur je remercie **MLLE BENARIBA N.** le symbole d'excellence et créativité où dame de la pensée profonde, j'ai appris de toi les secrets du succès et que l'impossible peut être atteint c'est toi qui tracé la carte du succès tout au long de l'étude.

Je veux remercier aussi **Mr LAHFA F. B., Mr RAHMOUN M. N. et Mr AZZI R.**, je suis fier d'avoir étudié chez vous, je vais sortir de cette université avec tête haute avec tous ce que vous m'avais appris ' j'ai été l'un des chanceux que j'ai étudié avec vous alors merci d'avoir anéanti l'ignorance et éclairé nos cœurs avec la lumière de la connaissance vous êtes les seuls à mériter merci et gratitude. les mots merci timides de vous car vous êtes plus grand

Sans oublier le mot de remerciement à Madame le doyen et madame le chef de département je vous offre les plus hautes expressions d'appréciation et de gratitude pour tout ce que vous nous avez fourni tout au long de la période où vous nous avez rendu service et votre soutien pour nous dans l'étude et la persévérance alors merci pour votre soutiens continue.

Soumicha.F



Dédicaces

Je voudrais commencer par dédier

Mon succès à :

Ceux qui ont tout le mérite de cette réussite, à ceux qui se sont

Tenus à mes côtés, à ceux qui m'ont rendu gloire, à

Ma source d'aide et de soutien, **Mes parents.**

A mon amour, ma sœur Asma

A mon cher frère, Ibrahim

A ma précieuse, grand-mère, mes tantes, mes oncles

A mes meilleurs amis, Hafsa et Hadjer

A mon ami d'enfance, Zahia

A la famille Boutaayachet et la famille Sadaallah

A tous mes professeurs, en particulier

Le professeur Mezouar D.

A toutes les personnes que j'aime

Enfin, merci à tous ceux qui ont

Contribué à ma réussite

ملخص

تنتمي *Olea europea* إلى عائلة الزيتونية، والمعروفة باسم شجرة الزيتون. تنتشر شجرة الزيتون على نطاق واسع في حوض البحر الأبيض المتوسط وفي الجزائر، خاصة في شمال البلاد.

يتم استخدام عدة أجزاء من شجرة الزيتون في الطب التقليدي، بما في ذلك الأوراق، والتي تستخدم لعلاج مرض السكري وارتفاع ضغط الدم. يستخدم زيت الزيتون أيضاً لعلاج مشاكل الحلق مثل السعال.

الهدف من دراستنا هو تقييم السمية الخلوية للمستخلصات الخامة من أوراق الزيتون على خلايا الدم الحمراء، والتحقق من نشاطها المضاد على الميكروبات.

تم الحصول على المستخلصات بالنقع لمدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة باستخدام ماء / ميثانول وماء / أسيتون، بنسبة (70/30) (ح/ح)، عائد الإخراج هو 15% و 18% على التوالي.

تم إجراء دراسة التأثير الانحلالي لمستخلصات الزيتون في المختبر على 2% من كريات الدم الحمراء المحضرة في محلول ملحي للفوسفات. تم تحضين المستخلصين مع كريات الدم الحمراء لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية. أظهرت النتائج عدم وجود سمية للمستخلصين عند التركيزات المختبرة.

تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصين بواسطة طريقة انتشار الأجار ضد بعض السلالات البكتيرية والخمائر المرجعية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها نشاطاً طفيفاً تجاه بعض البكتيريا وخميرة *Candida albicans*.

الكلمات المفتاحية : *Olea europea*، مستخلص هيدرومستأنول، مستخلص هيدروأسيتون، تأثير انحلاي للدم، نشاط مضاد للميكروبات.

Résumé

Olea europaea appartient à la famille des Oleaceae, connue sous le nom d'olivier. L'olivier est très répandu dans le bassin méditerranéen et en Algérie, notamment dans le nord du pays.

Plusieurs parties de l'olivier sont utilisées dans la médecine traditionnelle, dont les feuilles, qui sont utilisées pour traiter le diabète sucré et l'hypertension. L'huile d'olive est aussi utilisée pour traiter les problèmes de la gorge comme la toux.

L'objectif de notre étude est d'évaluer la cytotoxicité des extraits bruts des feuilles d'*Olea europaea* vis-à-vis des globules rouges, et de rechercher leurs activités antimicrobiennes.

Les extraits sont obtenus par macération pendant 24 heures à température ambiante en utilisant l'eau/méthanol et l'eau acétone, aux proportions (30/70) (v/v). Le taux de rendement des extraits est respectivement de 15 % et 18.5 %.

L'étude de l'effet hémolytique des extraits de l'olivier *in vitro*, est réalisée sur une suspension érythrocytaire à 2% préparée dans le tampon PBS 10 mM à pH 7,4. Les deux extraits sont incubés avec les érythrocytes pendant 60 minutes à 37°C. Les résultats n'ont montré aucune toxicité des deux extraits aux concentrations testées.

L'activité antimicrobienne des deux extraits est évaluée par la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis de quelques souches bactériennes et de levures de référence. Les résultats obtenus montrent une légère activité vis-à-vis de quelques bactéries et de la levure *Candida albicans*.

Mots clés : *Olea europaea*, extrait hydroacétonique, extrait hydrométhanolique, effet hémolytique, activité antimicrobienne.

Abstract

Olea europaea belongs to the Oleaceae family, known as the olive tree. The olive tree is very widespread in the Mediterranean basin and in Algeria, especially in the north of the country.

Several parts of the olive tree are used in traditional medicine, including the leaves, which are used to treat diabetes mellitus and hypertension. Olive oil is also used to treat throat problems like coughing.

The objective of our study is to assess the cytotoxicity of crude extracts of the olive leaves towards red blood cells, and to research their antimicrobial activities.

The extracts are obtained by maceration for 24 hours at room temperature using water / methanol and water / acetone in the proportions of (30/70) (v / v). The extraction yields are 15% and 18.5% respectively.

The *in vitro* study of the hemolytic effect of olive extracts was carried out on a 2 % erythrocyte suspension prepared in PBS buffer at pH 7.4. The two extracts are incubated with erythrocytes for 60 minutes at 37 ° C. The results showed no toxicity of the two extracts at the concentrations tested.

The antimicrobial activity of the two extracts is carried out by the agar diffusion method against some reference bacterial and yeast strains. The results obtained show a slight activity against some bacteria and the yeast *Candida albicans*.

Key words : *Olea europaea*, hydroacetic extract, hydromethanolic extract, hemolytic effect, antimicrobial activity

Liste des Figures

Figure 1 : <i>Olea europaea</i>	6
Figure 2 : Structures chimiques des principaux composés phénoliques retrouvés dans les feuilles d' <i>Olea europaea</i>	7
Figure 3 : Répartition des zones géographiques de l'oléiculture algérienne.....	8
Figure 4 : Feuilles d'olivier récoltées dans la région de l'Ourit.....	15
Figure 5 : Feuilles de l'olivier (a), extrait hydroalcoolique (b) et évaporation de l'extrait par un rotavapeur (c).....	17
Figure 6 : Extrait hydrométhanolique (a) et extrait hydroacétonique (b).....	17
Figure 7 : Schéma simplifié des étapes de l'extraction.....	18
Figure 8 : Taux d'hémolyse de l'extrait hydroacétonique des feuilles de l'olivier à différentes concentrations en fonction de temps.....	22
Figure 9 : Taux d'hémolyse de l'extrait hydrométhanolique des feuilles de l'olivier à différentes concentrations en fonction de temps.....	23

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales composés phénoliques des feuilles d'olivier.....	6
Tableau 2 : Utilisations traditionnelles et contemporaines d' <i>Olea europaea</i>	8
Tableau 3 : Quelques plantes à activités antimicrobiennes	13
Tableau 4 : Souches bactériennes et de levure utilisées au niveau du laboratoire LaPsab	16
Tableau 5 : Rendement d'extraction des feuilles d' <i>Olea europaea</i> var. <i>europaea</i>	22
Tableau 6 : Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des deux extraits des feuilles de l'olivier, de la gentamycine et de l'amphotéricine B.....	24

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : <i>Olea europaea</i>	4
1. Introduction :.....	4
2. Classification botanique :	4
3. Description botanique :.....	5
4. Composition chimique d' <i>Olea europaea</i>	6
5. Répartition géographique	7
6. Utilisations traditionnelles	8
Chapitre 2 : Hémolyse.....	10
1. Introduction	10
2. Globules rouges.....	11
3. Cytotoxicité et plantes médicinales	11
2.1. Toxicité aiguë	11
2.2. Toxicité subaiguë	12
2.3. Toxicité chronique.....	12
Chapitre 3 : Activité antimicrobienne	12
Matériel et méthodes	15
1. Matériel	15
1.1. Matériel végétal	15
1.2. Matériel biologique.....	15
1.2.1. Prélèvements sanguins	15
1.2.2. Souches bactériennes et fongiques	16
2. Méthodes	16
2.1. Préparation des extraits brut d' <i>Olea europaea</i>	16
2.2. Effet hémolytique des extraits d' <i>Olea europaea</i>	18
2.2.1. Préparation des extraits	19
2.2.2. Test d'hémolyse	19
2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	19
2.3.1. Préparation des extraits	20
2.3.2. Préparation de l'inoculum	20
2.3.3. Test de diffusion sur gélose.....	20
Résultats et interprétation	22
1. Rendement d'extraction :	22
2. Effet hémolytique des extraits de l'olivier	22

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	23
Discussion.....	26
Conclusion générale	29
Références bibliographiques.....	31

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

Introduction générale

Les champignons et les levures causent de graves pathologies atteignant l'homme (**Bisignano, 1999**) Plusieurs travaux dans le monde et en Algérie ont par ailleurs signalé l'apparition de nouvelles souches bactériennes multi résistances aux antibiotiques. La lutte contre les souches microbiennes est liée à leur pathogénicité et se fait principalement par l'usage d'antibiotiques (Bentley, 2003). En raison des effets secondaires des produits chimiques antimicrobiens et de la résistance que les micro-organismes pathogènes établissent contre les antibiotiques, beaucoup d'attention a été prêtée aux extraits bruts des plantes qui commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (**Barla, 2007 ; Özcan, 2004**).

En Afrique, le pouvoir thérapeutique des plantes était connu par nos ancêtres et nos parents de façon empirique (**Nacoulma, 1996**). Ainsi, on ignorait tout de la composition chimique des médicaments utilisés tous les jours par de nombreuses populations, pour les soins de santé.

Pour parvenir à une amélioration de cette médecine africaine, plusieurs investigations phytochimiques ont été faites, afin d'apporter une justification scientifique quant à l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales (**N'Guessan et al, 2009**).

Parmi ces plantes les plus connus et utilisées dans le bassin méditerranéenne, *Olea europaea* L. ou l'olivier. C'est une espèce largement cultivée dans le bassin méditerranéen depuis la plus haute antiquité. L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Par ailleurs, les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles qui font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches scientifiques (**Djenane, 2012**).

Les intoxications par les plantes peuvent apparaitre dans diverses circonstances, soit lors de l'ingestion de végétaux frais considérés comme comestibles, soit lors d'automédication par des drogues végétales ou par des médicaments en contenant (**Isabelle, 2000**).

Une plante traditionnelle peut être généralisée si elle obéit à plusieurs critères :

- Peu ou pas de toxicité ;
- Utilisation pour une indication donnée dans plusieurs pays du Sahel, Sénégal et Nord-Nigéria par exemple, parfois même utilisation aux Indes.
- Posologie précisée (**Jean-L, 1988**).

Plusieurs travaux réalisés précédemment sur *Olea europaea*, ont présenté son efficacité thérapeutique et ses activités biologiques : activité antimicrobienne (**Pereira, 2006 ; Sudjana, 2009**), activité anticancéreuse (**Goulas, 2009 ; kang, 2009**), activité antihypertensive (**Susalit, 20011**), activité antidiabétique (**Pereira, 2006 ; Eidi, 2009**), activité antioxydante (**Cumaoglu, 2011 ; Gonçalves, 2013 ; Malheiro, 2013**), activité gastroprotectrice (**Arsić, 2010**), et neuroprotectrices (**Diomedede, 2013**).

D'autres études ont été réalisées sur les propriétés de l'olivier sauvage au niveau du laboratoire LAPSAB, révélant des effets inhibiteurs de l'activité de l' α -amylase (activité antidiabétique) (**Benmessaoud, 2019**).

L'objectif de notre étude est réparti en trois parties :

- ✚ Préparation des extraits bruts hydrométhanolique et hydroacétonique des feuilles de l'olivier récoltées dans la région de l'Ourit ;
- ✚ Etudier la cytotoxicité *in vitro* des extraits vis-à-vis des globules rouges ;
- ✚ Rechercher les effets antimicrobiens des extraits vis-à-vis des souches de bactéries et de levure de référence par la méthode de diffusion sur gélose.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : *Olea europaea*

1. Introduction :

L'olivier occupe la 24^{ème} place des 35 espèces les plus cultivées dans le monde. La diversité phrénologique des cultivars est remarquable et l'intérêt économique de l'espèce est majeur. **(Catherine, 2006)** les olives sont une composante traditionnelle du régime méditerranéenne, les fruits et l'huile d'olive ont été utilisées en nutrition des 6000 J.C. sans effets secondaires connus, indiquant une longue histoire de consommation sûre de polyphénols d'olive chez l'homme **(Soni MG, 2006 ; Galili E, 1997)**.

Les olives ne sont pas utilisées comme fruit naturel en raison de leur goût extrêmement amer, mais sont plutôt consommées sous forme d'huile d'olive ou d'olives de table **(Kanakis, 2013)**. Le marché de l'huile d'olive est très important dans l'industrie oléicole, car environ 90% des olives produites annuellement sont destinées à la transformation de l'huile **(Sibbett, 2005)**.

Les utilités thérapeutiques d'*O. europaea* ont été indiquées en médecine traditionnelle. Il est connu pour réduire la glycémie, le cholestérol et l'acide urique. Il a également été utilisé pour traiter le diabète, l'hypertension, l'inflammation, la diarrhée, les infections des voies respiratoires et urinaires, les maladies de l'estomac et des intestins, l'asthme, les hémorroïdes, les rhumatismes, les laxatifs, les nettoyants pour la bouche et comme vasodilatateur. De nombreux composés phénoliques, en particulier les sécoiridoïdes et les iridoïdes **(Bendini, 2007)** et leurs activités pharmacologiques ont été au centre de l'attraction pour les scientifiques au cours de la dernière décennie **(Ryan, 1998 ; Ghisalberti, 1998)**.

2. Classification botanique :

Selon la classification classique **(Conquist, 1981)**, l'olivier appartient au :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta ou plantes vasculaires

Embranchement : Magnoliophyta, Angiospermes, Phanérogames

Classe : Magnoliopsida, dicotylédones

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre : *Olea*

Espèce : *Olea europaea*

Tableau 1 : Noms communs d'*Olea europaea* (Médail, 2001)

N°	Région	Noms
1	Monde arabe	Zaitoon
2	France	Oulivie, olive
3	Espagne	Aceituma, olivera, olivo, oliondo, oaster, oliba
4	Roumanie	Culoare masline, maslin, masliniu, oliva
5	Grèce	Elia
6	Allemagne	Olivenbaum, olbaum
7	Afrique du sud	Mohlware

3. Description botanique :

Olea europaea L. est un petit arbre appartenant à la famille des Oleaceae (Boskou, 1996). Généralement, c'est un arbre (Figure 1 (a)) ou un arbuste, dont la taille avoisine 10 m de long. Il se reconnaît facilement à l'aspect tortueux de son tronc. Il possède un grand diamètre généralement courbé et tordu.

Les feuilles (Figure 1 (b)), sont de forme oblongues à ovales-lancéolées. Les fleurs sont nombreuses, bisexuées ou fonctionnellement unisexuées, petites, sessiles, de couleur blanc crème. Elles sont regroupées en petites inflorescences en forme de grappe dressées. Le calice est tronqué à quatre petites dents et la corolle est courte à quatre lobes et mesure 1 à 2 mm de long.

L'olive est petit, dont une partie charnue externe ou peau entoure la coquille de noyau durci. Le fruit (Figure 1 (d)) est ovoïde, violet noirâtre à maturité, normalement de 1 à 2,5 cm de long. Il est petit chez les plantes sauvages que dans les vergers (d). L'écorce est de couleur gris pâle (Figure 1 (e)) (Ali, 1982 ; Shu, 1996 ; Sarwar et Karim, 2013).

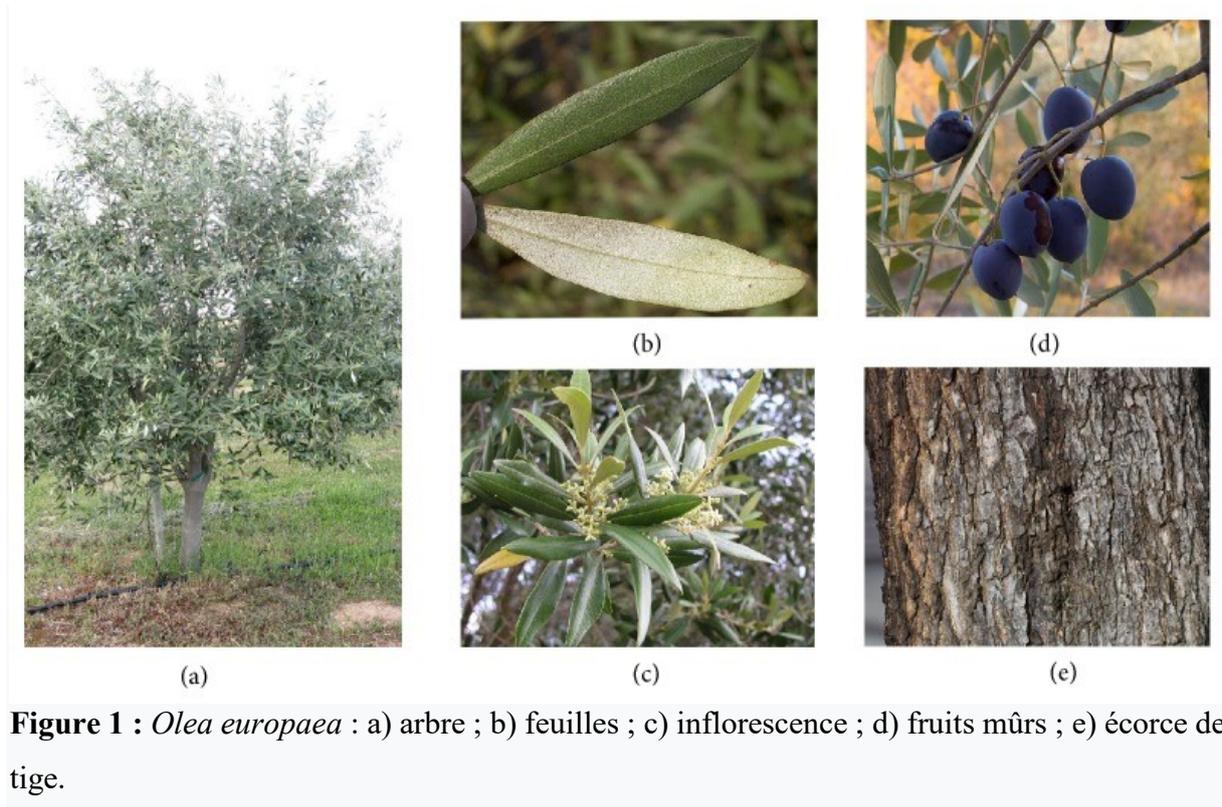


Figure 1 : *Olea europaea* : a) arbre ; b) feuilles ; c) inflorescence ; d) fruits mûrs ; e) écorce de tige.

4. Composition chimique d'*Olea europaea*

Il existe des différences de niveau et type de composé phénolique chez *Olea europaea* L. la composition chimique feuille, fleur et grain varie selon plusieurs conditions telle que l'origine, les conditions de stockage, les conditions climatiques, l'humidité et degré de contamination par le sol (Boskou, 1996 ; Goldsmith, 2014 ; Talhaoui, 2015).

Cinq groupes de composés phénoliques sont principalement retrouvés dans les feuilles d'olivier (Tableau 1, Figure 2).

Tableau 1 : Principales composés phénoliques des feuilles d'olivier (Pereira, 2006 ; Ferreira, 2007)

Composés phénoliques des feuilles d' <i>Olea europaea</i>
Oleuropéosides (oleuropéine et verbascoside)
Flavones (lutéoline-7-glucoside, apigénine-7-glucoside, dioméstine et lutéoline)
Flavonols (rutine)
Flavon-3-ols (catéchine)
Substitués (tyrosol, hydroxytyrosol, vanilline, acide vanillique et acide caféique)

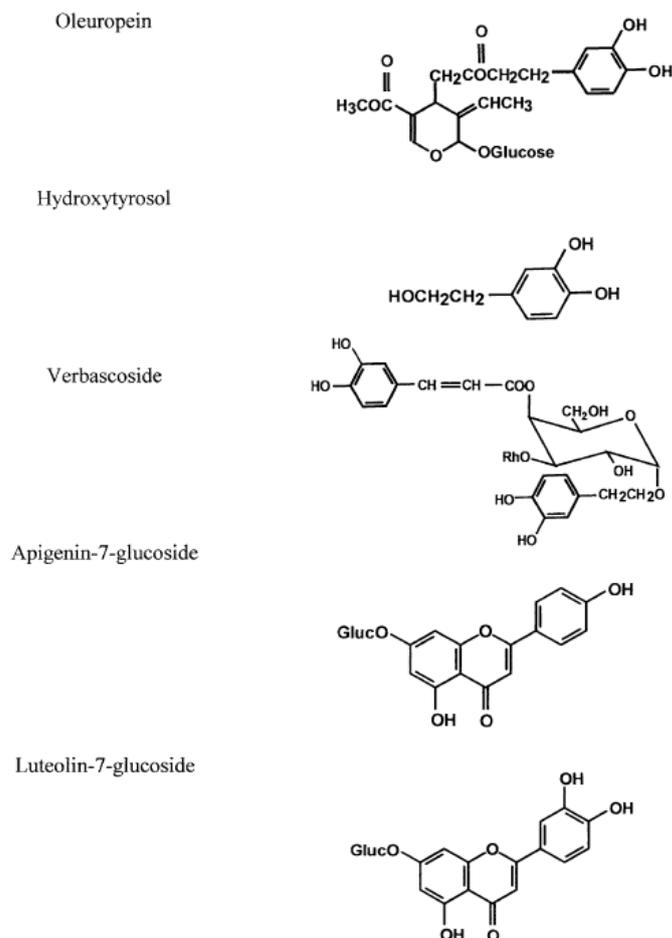


Figure 2 : Structures chimiques des principaux composés phénoliques retrouvés dans les feuilles d'*Olea europaea* (El et Karakaya, 2009)

De plus, l'olivier est riche en divers composés phénoliques : des polyphénols solubles, des polyphénols attachés aux parois cellulaires, des flavonoïdes, les tanins (hydrolysables et condensés) (Zaidi, 2009).

5. Répartition géographique

L'olivier est réparti dans les zones côtières du bassin méditerranéen oriental, les zones côtières contiguës du Sud-Est de l'Europe, du Nord de l'Iran à l'extrémité Sud de la mer Caspienne, en Asie occidentale et en Afrique du Nord (Ryan, 1998).

En Algérie, l'olivier est distribué de manière irrégulière. Il se retrouve abondamment dans le Nord du pays, et il est concentré exclusivement au niveau de six principales wilayas. Trois wilayas du centre du pays, qui représente plus de 50 % de la surface oléicole nationale (Béjaia, Tizi Ouzou et Bouira) et trois régions de l'Est du pays (Bordj Bou Arreridj, Sétif et Jijel). Quant au reste du verger oléicole, plutôt consacré à la production d'olives de table, il se retrouve

essentiellement dans trois autres wilayas (Tlemcen, Mascara et Relizane) (**Ministère de l'agriculture algérienne, 2006**).

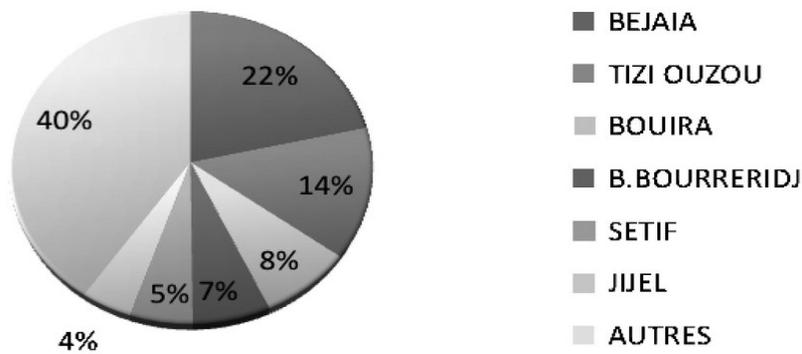


Figure 3 : Répartition des zones géographiques de l'oléiculture algérienne (Ministère de l'agriculture algérienne, 2006)

6. Utilisations traditionnelles

O. europaea est largement utilisé en médecine traditionnelle pour un large éventail de maladies dans divers pays. Le tableau 2 résumé les différentes utilisations traditionnelles de l'olivier.

Tableau 2 : Utilisations traditionnelles et contemporaines d'*Olea europaea* (Al-Khalil, 1995)

N	Pièce/préparation utilisée	Maladie/utilisation	Référence
1	Feuilles et fruits/infusion et macération	Hypoglycémique, Hypertensive	Amel B, 2013
2	Décoction ou infusion des fruits et feuilles	Antidiabétique	Ali-Shtayeh, 2012
3	Huile olive jus de citron	Pour traiter les calculs biliaires	Sheth, 2005
4	Huile de graine /prise par voie oral	Laxatifs	Al-Khalil, 1995
5	Décoction des feuilles séchés et de fruits/ usage orale	Infection diarrhéique,	Bellakhdar, 1991

		respiratoire et urinaire	
6	Huile d'olive/appliqué sur le cuir chevelu	Pour prévenir la chute de cheveux	Zargari, 1997
7	<i>Extrait bouilli de feuille fraîche</i> <i>/prise orale</i>	Pour traiter l'asthme	Lawrendiadis, 1961
8	Extrait bouilli de feuille séché/prise orale	Pour traiter hypertension	Ribeiro, 1988, Ribeiro, 1986

7. Activités biologiques

7.1. Activité antidiabétique et antioxydante :

L'utilisation d'*O.europaea* dans le traitement du diabète a été validée dans plusieurs études expérimentales. Selon l'étude d'**Eidi** en **2009**, l'extrait éthanolique des feuilles testées sur les rats Wistar mâles adultes, a montré une bonne activité antidiabétique avec une dose efficace de 0.5g/kg.

Dans une autre étude, des lapins rendus diabétiques par l'alloxane, ont reçu 20 mg/kg poids corporel d'oleuropéine pendant 16 semaines. Le traitement à base d'oleuropéine, composé phénolique actif de l'olivier, a amélioré le niveau de la glycémie et de la plupart des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques de ces lapins en comparaison aux lapins normaux (**Al-Azzawie et Alhamdani, 2006**).

7.2. Activité anticancéreuse

Les constituants d'*O. europaea* ont montré de très bonnes activités anticancéreuses sur différents types de cancers (**Casaburi, 2013**). Selon l'étude de **Fares et al** en **2011**, l'extrait éthanolique à 80 % des feuilles de l'olivier a exhibé un effet anti-prolifératif vis-à-vis une lignée cellulaire leucémique humaine Jurkat avec une CI₅₀ de 4 mg/ml et 3 mg/ml après une incubation de 48 et 96 heures, respectivement (**Fares et al, 2011**).

7.3. Activité antimicrobienne

O. europaea a été utilisé comme remède populaire pour la guérison de nombreux troubles infectieux d'origine bactérienne, fongique et virale. Plusieurs études ont été menées dans le passé pour valider le potentiel antimicrobien et antiviral d'*O. europaea* (**Adnan M, 2014**).

Korukluoglu, 2010 à montrer une activité antibactérienne remarquable de l'extrait acétonique des feuilles par l'utilisation de la méthode de diffusion sur disque. De même, **Kubo et al, 2014**, ont caractérisé une série d'aldéhydes α , β - insaturés à longue chaîne de fruits d'*O. europaea* et sa saveur d'huile pour leurs activités antimicrobiennes et les a trouvés actifs contre un large spectre de microbes (**Kubo, 1995**).

7.4. Activités anti hypertensive et cardioprotectrice

De nombreux produits naturels se sont révélés efficaces contre l'hypertension. L'huile d'olive a été suggérée comme une source naturelle pour un bon contrôle de l'hypertension (**Somova, 2004**). Deux essais ont été réalisés par **Somova en 2004** et **Sasulit, 2011** sur l'extrait des feuilles de l'olivier, et ont montré une activité cardiotonique et anti-hypertensive. **Sarwar en 2013** a constaté que l'huile d'olive peut réduire considérablement le risque d'accident vasculaire cérébral AVC, de crises cardiaques, de cancer de l'estomac et d'autres maladies cardiaques.

Chapitre 2 : Hémolyse

1. Introduction

L'hémolyse (hém : sang ; lyse : perturbation) est un phénomène de toxicité irréversible par lequel les hématies sont détruites en libèrent leur contenu hémoglobinique (**Aguilar-Martinez, 2007**).

Les anémies hémolytiques immunologiques regroupent trois variétés d'accidents. Les hémolyses auto-immunes résultent d'un conflit endogène entre les propres hématies du patient et des autoanticorps actifs tantôt à 37 °C (anticorps dits chauds) tantôt à des températures inférieures à 37 °C (anticorps froids) (**Leporrier, 2011**).

Deux types d'hémolyse peuvent résulter du conflit entre l'anticorps, le complément et les hématies. Dans le premier, la phagocytose des complexes membrane-anticorps par les macrophages entraîne une réduction progressive de la surface membranaire des hématies, (**Leporrier, 2011**). et l'apparition de sphéricités à la déformabilité réduite qui sont voués à l'hémolyse principalement dans la rate (hémolyse dite « tissulaire »). (Produit de digestion de l'hémoglobine par les macrophages).

Le deuxième mécanisme résulte d'une activation majeure du système complément et notamment d'un complexe lytique C5-C9 capable de détruire la membrane de l'hématie directement (**Da Costa, 2001**).

Plusieurs substances sont synthétisées par un pouvoir anti hémolytique en réduisant l'hémolyse, en effet le choix de traitement insiste sur la prescription de fer, acide folique B9 et de vitamine B12 (**Federici et al, 2007 ; Leporrier, 2007**).

2. Globules rouges

Ils sont appelés aussi, les hématies ou les érythrocytes. Ils occupent 98 % des éléments figurés. Ce sont des cellules anucléées où le noyau a disparu. Ils ont la forme d'un disque biconcave. Leur demi de vie est de 120 jours et la biosynthèse a lieu dans la moelle osseuse et aboutit à la formation de 100 milliards des érythrocytes par jour. Les érythrocytes sont formés à partir de cellules souches multipotentes.

Leur rôle principal est d'assurer le transport d'oxygène et du gaz carbonique entre les alvéoles pulmonaires et les tissus et ils sont responsable aussi, de groupes sanguins ABO (**Courtois et al, 2007**).

3. Cytotoxicité et plantes médicinales

La phytothérapie peut être dangereuse selon les plantes et les doses administrées, et l'on parlera plutôt de « médecine issue de la tradition ». La médecine traditionnelle est définie comme la somme totale des connaissances, compétences et pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour garder les êtres humains en bonne santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer et traiter (**OMS, 2000**).

Cette médecine utilise les plantes médicinales qui sont des mélanges complexes de molécules diverses. Leur composition, souvent mal définie à un certain degré de concentration, peut présenter une toxicité et la teneur de ces constituants peut naturellement varier d'une préparation à une autre, ou peut-être peuvent contenir des contaminants toxiques (**Borkou, 1996**).

La toxicité est donc, la capacité intrinsèque d'un agent chimique à avoir un effet nocif sur un organisme. Elle varie selon la dose, la fréquence, la durée d'exposition, et le temps d'apparition des signes cliniques (**Ellen, 2000**).

2.1. Toxicité aiguë

La DL50 a été déterminée suivant la ligne directrice de l'Organisation de coopération et de développement économique (OCDE), numéro 423 (Ligne directrice de L'OCDE pour les essais

de produits chimiques, 17 décembre 2001) pour déterminer l'effet toxique suite à une exposition à un agent toxique ne dépassant pas 24 heures (**Lipniak-Gawlik, 1998**).

2.2. Toxicité subaiguë

C'est une toxicité à court terme ou subaiguë ou encore sub-chronique, et correspond à l'administration quotidienne du produit est également une ou deux fois par jour durant environ 3 mois (**Montgomery, 1990 ; Laroche, 2001**).

2.3. Toxicité chronique

Elle correspond à la caractérisation de l'effet toxique d'une substance suite à une exposition répétée et prolongée (18 à 24 mois) (**Laroche, 2001**).

Chapitre 3 : Activité antimicrobienne

En Algérie comme dans les autres pays en voie de développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité (**Bendahou, 2007**). La situation est plus préoccupante à cause de l'apparition des souches de micro-organismes résistants aux antibiotiques et l'émergence des infections non communes (**OMS, 2002**) qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants. Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action. Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle (**Omolo, 2004**).

En effet, en 2002, l'OMS estime que, pour se soigner, 80% de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales.

Les maladies infectieuses constituent un sérieux problème de santé publique (**OMS, 1999**), où elles sont la principale cause de taux de mortalité élevés. Les agents responsables de ces infections sont divers et variés comprenant aussi bien les champignons, les bactéries, les protozoaires que des virus. Pour lutter contre ces agressions microbiennes, le monde scientifique a découvert de nombreux traitements pour soulager les patients (**Traoré et al, 2012**).

Les médicaments à base de plantes sont préparés à partir d'un nombre limité de solvants parmi lesquels, on trouve l'alcool, le méthanol, plus rarement l'acétone, l'acétate d'éthyle, le n-butanol, l'hexane et l'heptane. (**Jean-Yves Chabrier, 2010**).

Tableau 3 : Quelques plantes à activités antimicrobiennes

<i>Espèces végétales</i>	<i>Extrait /partie utilisé</i>	<i>Test antimicrobien réalisé</i>	<i>Références</i>
<i>Micromeria cristata subsp. phrygia</i>	Huile essentielle /matériel végétales séchés	CMI	Tabanca, 2001
<i>Micromeria cristata</i>	Huile essentielle /partie aérienne	Technique de diffusion agar	Stojanović, 2006
<i>Eucalyptus gomphocephala</i>	Extrait méthanolique /extrait éthanolique	CMI ; CMB ; teste de sensibilité aromatoigramme	Bouharb, 2014
<i>Pergularia tomentosa L.</i>	Extrait phénolique/feuilles	CMI	Bouhmama, 2013
<i>Caryophyllus aromaticus</i>	Extrait méthanolique/éthanolique : fleurs	Méthode de diffusion sur disque	Chandoria, 2011
<i>Rauwolfia tetraphylla /Jatropha curcas</i>	Feuilles /extrait méthanolique	CMI	Patel, 2013

MATÉRIEL ET
MÉTHODES

Matériel et méthodes

Cette étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire : Antibiotiques, antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, du département de biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Nous avons choisi *Olea europaea*, car il est connu pour sa large utilisation dans de nombreux domaines scientifique, médicale, cosmétique, alimentaire...etc. Ainsi que pour ses innombrables propriétés thérapeutique et médicinale.

La récolte des feuilles de l'olivier était faite le 04 Janvier 2020, hors la période de floraison et de fructification, dans les hautes montagnes d'El-Ourit (figure 4).

Les feuilles de l'olivier sont séparées, puis, mises à l'obscurité, à une température ambiante. Après le séchage, les feuilles de l'olivier sont broyées le jour de l'expérimentation, à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine et qui sera utilisée pour la préparation des extraits.



Figure 4 : Feuilles d'olivier récoltées dans la région de l'Ourit

1.2. Matériel biologique

1.2.1. Prélèvements sanguins

Les échantillons de sang sont prélevés chez des humains sains. Les prélèvements sont réalisés dans des tubes héparine, puis, centrifugés à 2500 tours par minute pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et les érythrocytes sont lavés deux fois avec le tampon PBS à 10 mM et à pH 7.4 Après lavage, la suspension est préparée dans le tampon PBS à 2 % pour réaliser le test de l'effet hémolytique.

1.2.2. Souches bactériennes et fongiques

Nous avons utilisé 11 souches bactériennes et une souche de levure pour évaluer l'activité antibactérienne et antifongique par la méthode de diffusion sur gélose. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 et la levure *Candida albicans* ATCC 10231.

Tableau 4 : Souches bactériennes et de levure utilisées au niveau du laboratoire LaPsab

Types	Souche	Gram	Famille	Référence
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif	<i>Pseudomonadaceae</i>	ATCC 27853
	<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>	ATCC 25922
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Gram négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>	ATCC 13311
	<i>Micrococcus luteus</i>	Gram positif	<i>Micrococcaceae</i>	ATCC 9341
Bactéries	<i>Enterobacter cloacae</i>	Gram négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>	ATCC 13047
	<i>Citrobacter freundii</i>	Gram négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>	ATCC 8090
	<i>Proteus mirabilis</i>	Gram négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>	ATCC 35659
	<i>Bacillus cereus</i>	Gram positif	<i>Bacillaceae</i>	ATCC 10876
	<i>Bacillus subtilis</i>	Gram positif	<i>Bacillaceae</i>	ATCC 6633
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram positif	<i>Enterococcaceae</i>	ATCC 49452
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram positif	<i>Listeriaceae</i>	ATCC 15313
Levures	<i>Candida albicans</i>		<i>Saccharomycetaceae</i>	ATCC 10231

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits bruts d'*Olea europaea*

L'extraction est réalisée avec 20 g de la poudre végétale (figure 5 (a)) qui sont mélangés avec 200 ml d'un mélange de solvants : eau/acétone (30/70) (v/v) et eau/méthanol (30/70) (v/v). Les

deux solutions sont enveloppées avec un papier aluminium et laissées macérer pendant 24 heures à température ambiante (figure 5 (b)).

Après 24 heures, les deux extraits sont filtrés sur papier filtre Wattman, puis, évaporés avec un rotavapeur pour enlever les solvants organiques (figure 5 (c)).

Les phases aqueuses des deux extraits sont évaporées dans des boîtes de Pétri dans une étuve à 35 °C et les extraits secs (figure 6 (a, b)) sont récupérés dans des tubes eppendorfs et conservés à + 4°C.



Figure 5 : Feuilles de l’olivier (a), extrait hydroalcoolique (b) et évaporation de l’extract par un rotavapeur (c)



Figure 6 : Extrait hydrométhanolique (a) et extrait hydroacétonique (b)

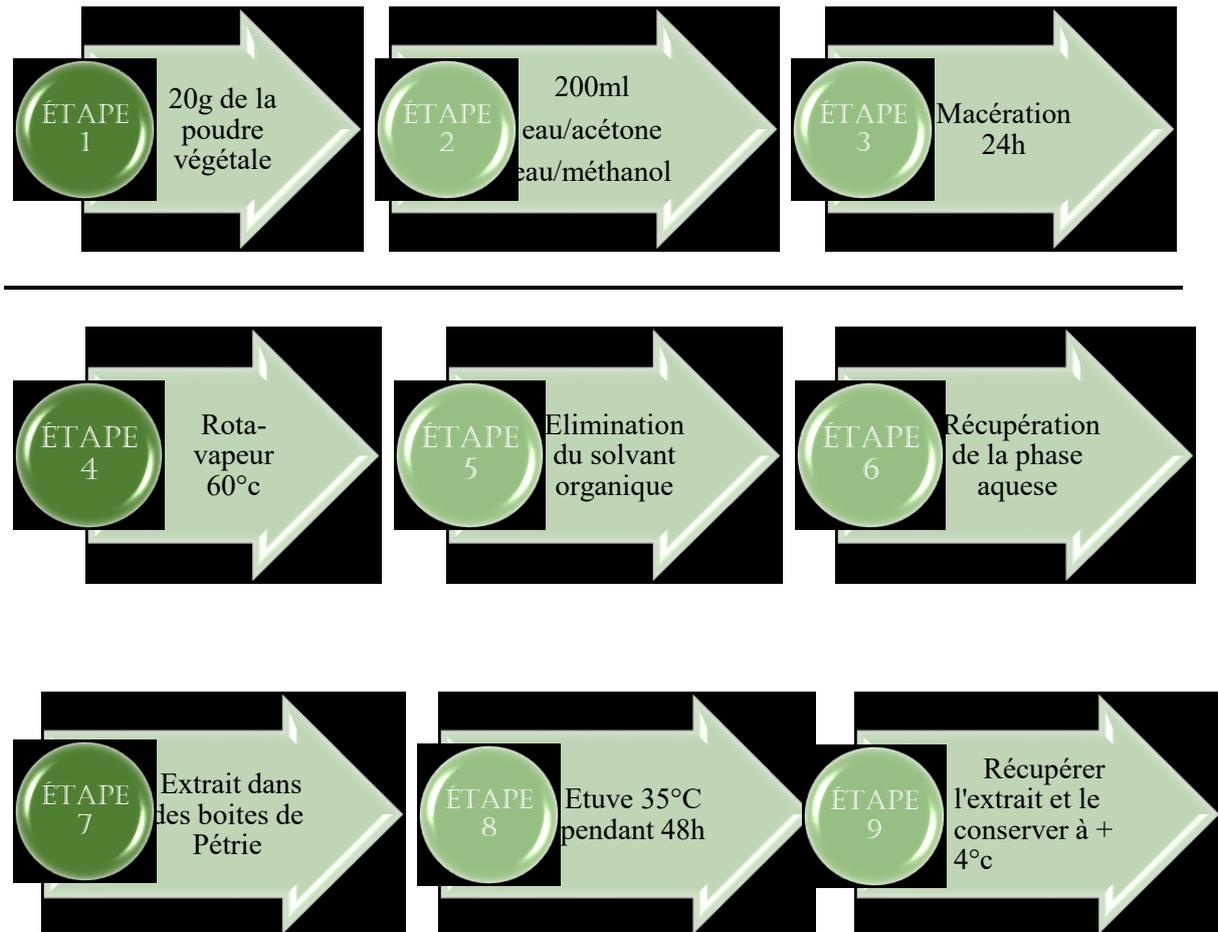


Figure 7 : Schéma simplifié des étapes de l'extraction

Le rendement a été obtenu pour chaque extrait et il est exprimé en pourcentage. Il est calculé selon la formule suivant décrite par **Mahmoudi et al. 2013**.

$$\text{Rendement (\%)} = \{M_0 / M_f\} \times 100$$

Où,

M₀ : La masse de l'extrait après évaporation du solvant en gramme ;

M_f : La masse de la matière sèche en gramme.

2.2. Effet hémolytique des extraits d'*Olea europaea*

La cytotoxicité des extraits de l'olivier est évaluée *in vitro*, vis-à-vis de la suspension érythrocytaire préparée à 2 % dans le tampon phosphate 10 mM à pH 7,4.

2.2.1. Préparation des extraits

Les extraits sont préparés dans le tampon phosphate 10 mM à pH 7,4. Nous avons testé trois concentrations pour chaque extrait : 1 mg/ml, 0.5 mg/ml et 0.25 mg/ml (concentrations finales).

2.2.2. Test d'hémolyse

Le test de l'effet hémolytique de la plante étudié est réalisé selon la méthode de **(Guo-Xiang et Zai-Qun, 2008)**.

Un volume de 8910 µl de la suspension érythrocytaire est mélangé avec 90 µl de l'extrait à différentes concentrations (2mg/ml, 1mg/ml, 0.5mg/ml). Les tubes sont incubés dans un incubateur agitateur à 37°C pendant 60 minutes.

Un volume de 500µl est prélevé aux temps 0, 30 et 60 minutes, et mélangé délicatement avec 1,5 ml de PBS. Les tubes sont centrifugés à 2500 tours par minute pendant 5minutes.

Ensuite, le surnageant est récupéré pour mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible à une longueur d'onde de 548 nm contre un blanc contenant du PBS.

Un témoin négatif est préparé selon la même procédure du test contenant 90 µl de tampon PBS et 8910 µl de suspension érythrocytaire.

De plus, et dans les mêmes conditions et démarches expérimentales, nous avons préparé un tube d'hémolyse totale qui contient 2970 µl de la suspension érythrocytaire avec 30 µl de triton X-100 à 1% et 1.5 ml de PBS.

Ce test a été répété trois fois pour chaque concentration de chaque extrait.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, après 60 minutes d'incubation, selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{DO (\text{extrait 60 minutes}) - DO (\text{témoin négatif 60 minutes})}{DO (\text{hémolyse totale 60 minutes}) - DO (\text{témoin négatif 60 minutes})}$$

2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique est réalisé avec la méthode de diffusion des disques sur gélose selon les recommandations de CLSI, où, des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre sont imprégnés des différentes extraits d'*Olea europaea* et sont déposés dans des boites de Pétri sur la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones d'inhibition autour des disques **(Biyiti et al, 2004)**.

2.3.1. Préparation des extraits

Les extraits hydrométhanolique et hydroacétoniques sont préparés dans l'eau physiologique stérile à une concentration de 50 mg/ml.

2.3.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 24 heures sur une gélose nutritive non sélectif. Dans 5 ml d'eau physiologique 0.9%, 5 colonies sont suspendues, et à l'aide d'un spectrophotomètre cette suspension est ajustée au standard McFarland 0.5 équivalent à une densité optique entre 0.08 à 0.13 à une longueur d'onde de 625 nm.

Pour les levures, la préparation de l'inoculum est réalisée selon la même procédure que pour les bactéries. Les seules différences sont le milieu de culture utilisé pour la culture qui est le bouillon sabouraud et l'absorbance est de l'ordre de 0.12 à 0.15 à une longueur d'onde de 530 nm.

2.3.3. Test de diffusion sur gélose

C'est le même principe de l'antibiogramme. Le milieu de culture utilisé pour les bactéries est la gélose de Mueller Hinton. Le milieu de culture des levures est le Muller Hinton supplémenté de 2 % de glucose et 0,5 µg/ml de bleu de méthylène. L'ensemencement des souches est réalisé par écouvillonnage de l'inoculum sur la gélose coulée dans les boites de Pétri.

Des disques en papier filtre stérile de 6 mm de diamètre sont imprégnés par 10µl de chaque extrait (hydroacétonique et hydrométhanolique) au moment de l'expérimentation. Ensuite, à l'aide d'une pince stérile 2 disques représentant les deux extraits sont placés sur les géloses inoculées. Les boites sont transférées dans l'étuve pour une incubation de 24 heures à 37°C pour les bactéries et à 35 °C pour les levures.

Les zones d'inhibition sont mesurées en centimètre par une règle graduée et comparées avec un antibiotique qu'est la gentamycine (pour les bactéries) et l'amphotéricine B (pour les levures).

Ces tests sont réalisés en triplicate pour chaque extrait et vis-à-vis de chaque souche microbienne.

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

Résultats et interprétation

1. Rendement d'extraction :

D'après les calculs et les résultats présentés dans le tableau 5 ci-dessous, le rendement de l'extrait hydroacétonique est élevé par rapport à celui de l'extrait hydrométhanolique.

Tableau 5 : Rendement d'extraction des feuilles d'*Olea europae*

<i>Olea europae</i>	Extrait brut hydroacétonique	Extrait brut hydrométhanolique
Rendement (%)	18.5	15

2. Effet hémolytique des extraits de l'olivier

Les résultats d'évaluation de taux d'hémolyse obtenus pour les extraits hydroacétonique et hydrométhanolique des feuilles de l'olivier sont présentés sous forme d'histogrammes (figures 8 et 9). Les tests sont effectués avec trois concentrations différentes : 2mg/ml ; 1mg/ml et 0.5mg/ml en fonction de temps 0, 30 et 60 minutes. L'hémolyse totale est réalisée en utilisant le Triton X-100 en contact avec la suspension érythrocytaire.

A travers les résultats obtenus ci-dessous, nous n'avons noté aucune cytotoxicité des extraits vis-à-vis des globules rouges aux différentes concentrations testées et à différents temps d'incubation.

En général, les extraits de l'olivier ne présentent aucun effet hémolytique aux concentrations choisis dans notre expérimentation.

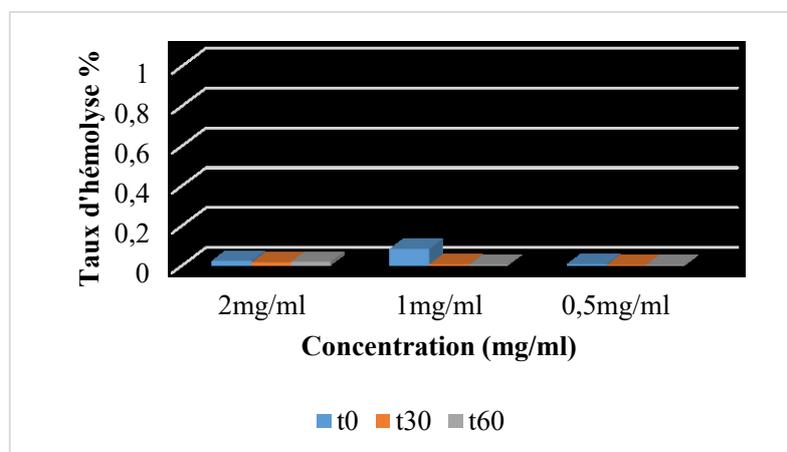


Figure 8 : Taux d'hémolyse de l'extrait hydroacétonique des feuilles de l'olivier à différentes concentrations en fonction de temps

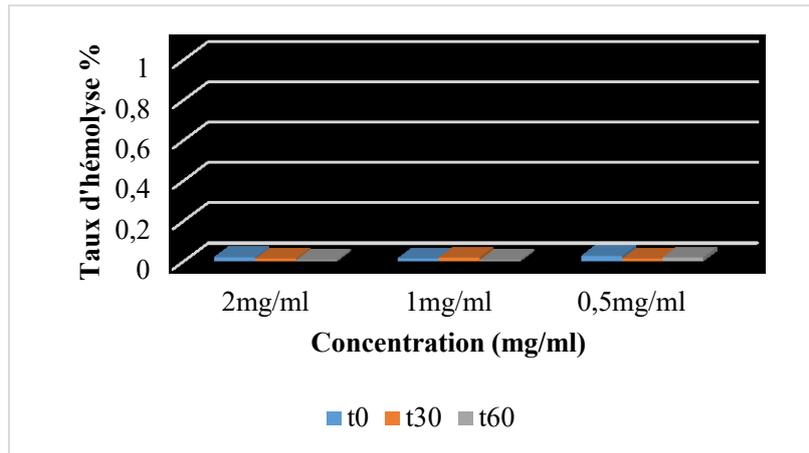


Figure 9 : Taux d'hémolyse de l'extrait hydrométhanolique des feuilles de l'olivier à différentes concentrations en fonction de temps

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

La méthode de diffusion sur gélose a été utilisée dans notre expérimentation pour évaluer les activités antibactérienne et antifongique des extraits hydrométhanolique et hydroacétonique des feuilles d'*Olea europaea*.

Cette méthode nous permet la mesure des diamètres des zones d'inhibition pour déterminer l'extrait ayant une activité antimicrobienne et la souche sensible à son effet.

A travers les résultats mentionnés dans le tableau 6, les deux extraits hydroacétonique et hydrométhanolique présentent une faible activité antibactérienne pour la plupart des souches bactériennes testés et une légère activité antifongique.

L'activité antibactérienne est observée sur *Bcillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Pseudomonas aeruginosa* ATTCC 27853, *Citrobacter freundii* ATTCC 8090, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 avec un diamètre compris entre 7 à 9 mm pour les deux extraits.

Les deux extraits hydroacétonique et hydrométhanolique ont exhibé un effet antifongique moyen vis-à-vis de la souche *Candida albicans* ATCC 10231 avec des diamètres de 11.6 et 12.3, respectivement.

Tableau 6 : Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de deux extraits des feuilles de l'olivier, de la gentamycine et de l'amphotéricine B

	Extrait hydro- acétonique	Extrait hydro- méthanolique	Gentamycine	Amphotéricine B
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	7±0.5	7 ±1	23	/
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	7± 1	7.6 ±0.5	28	/
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	7 ±0.5	7 ±1	30	/
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	8± 2	7.6± 1.15	30	/
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	7 ±1	7.3±1.15	30	/
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	7 ± 0.5	8 ±0.5	23	/
<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> ATCC 13311	6 ± 0.5	6 ±0.5	24	/
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	8.3 ± 0.5	9.6± 0.5	28	/
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	7 ±1.7	7.6±2.08	32	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	6 ± 0.5	7 ± 1	26	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	6 ±0.5	6± 0.5	26	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	11.6±3.05	12.3±4.93		26

DISCUSSION

Discussion

Les feuilles de l'olivier sont connues par leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine, dues à leurs richesses en composés phénoliques (**Aouidi, 2012**).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à étudier les activités des extraits bruts des feuilles d'*Olea europaea* obtenus de la région de l'Ourit à Tlemcen.

Nous avons préparé des extraits bruts hydrométhanolique et hydroacétonique à partir des feuilles de l'olivier. Les résultats des rendements obtenus montrent une petite différence (aux environs de 3%) entre l'extrait hydrométhanolique et l'extrait hydroacétonique.

Selon l'étude de **Selaimia** en **2019**, les rendements obtenus des extraits hydrométhanoliques des feuilles d'olivier cultivé provenant de la région d'El Attaf, wilaya d'Ain Defla, sont de l'ordre de 48,91 %, ce qui montre une différence significative par rapport à nos résultats.

Cette différence confirme qu'il y a des facteurs qui influencent sur le taux de rendement d'extraction, comme le choix de solvant d'extraction et sa polarité et la méthode d'extraction.

Pour rechercher et évaluer les activités de l'olivier, il faudrait en premier lieu vérifier sa toxicité. Dans notre travail, la toxicité a été étudiée *in vitro*, en évaluant l'effet hémolytique de nos extraits vis-à-vis des globules rouges.

D'après les résultats obtenus, les extraits hydrométhanolique et hydroacétonique ne présentent aucun effet hémolytique vis-à-vis des érythrocytes aux concentrations testées : 0.5, 1 et 2 mg/ml.

Dans une étude réalisée chez l'homme, une administration orale d'une dose de 1000 mg/jour (500 mg deux fois par jour) d'un extrait éthanolique des feuilles d'olivier contenant 20 % d'oleuropéine, pendant 8 semaines, n'a induit aucun changement des paramètres hématologiques, des électrolytes ou des paramètres liés à la fonction rénale et hépatique (**Susalit et al, 2011**).

Selon l'étude de **Omer et al** en **2012**, l'extrait aqueux macéré administré aux rats males Wistar à des concentrations croissantes (0.2 à 0.9 % d'extrait) par gavage gastrique, a induit une diminution du nombre des érythrocytes et des altérations dans le foie et les reins. Ces effets ont été observés avec l'augmentation de la concentration en extrait et plus spécifiquement à la concentration de 0.9 %.

Avec ces différents résultats obtenus, il est nécessaire que des travaux toxicologiques supplémentaires devraient être réalisés pour déterminer la concentration ou la dose à tester.

Les recherches de l'activité antimicrobienne réalisées *in vitro* par plusieurs auteurs (**Sudjana, 2009**) ont démontré que les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis de nombreux microorganismes.

Dans notre étude, nous avons remarqué une légère activité de nos extraits et spécifiquement, l'extrait hydrométhanolique, vis-à-vis des souches bactériennes et de levure de référence utilisées dans le test de diffusion sur gélose.

Nos résultats sont en concordance avec ceux de **Djenane** en **2011**, qui a testé l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles d'olivier vis-à-vis de trois souches pathogènes. Les résultats obtenus montrent un effet inhibiteur des polyphénols et de l'extrait brut aqueux vis-à-vis de *P. aeruginosa* avec des diamètres d'inhibition de $15,57 \pm 2,15$ mm et $15,29 \pm 1,90$ mm, respectivement. Ces extraits ont présenté une forte activité antibactérienne, et l'auteur a mentionné que le spectre d'activité antimicrobienne varie selon le type d'extrait et le Gram des bactéries. Cependant, les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits poly-phénoliques

Dans une étude récente, **Pereira et al** en **2007**, ont montré que les extraits aqueux de feuilles d'olivier présentent une large activité antimicrobienne vis-à-vis de *B. cereus*, *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. neoformans*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis* d'une manière dépendante de la concentration. Selon ces mêmes auteurs, *B. cereus* (Gram positif) et *C. albicans* (champignons) étaient les micro-organismes les plus sensibles à l'extrait de l'olivier présentant des valeurs de CI_{25} inférieures à 1 mg / ml.

D'après **Sudjana et al** en **2009**, l'extrait des feuilles d'olivier commercialisé en Australie, a présenté une activité antibactérienne vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes et plus spécifiquement, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* et *Staphylococcus aureus* avec des concentrations minimales inhibitrices CMI entre 0.31 et 0.78 % (v/v).

CONCLUSION

GÉNÉRALE

Conclusion générale

Notre objectif dans cette étude est d'évaluer la cytotoxicité des extraits hydrométhanolique et hydroacétonique des feuilles d'*Olea europaea* vis-à-vis des globules rouges et de rechercher l'effet antimicrobien de ces extraits vis-à-vis de bactéries et de levures causant des pathologies chez l'homme.

Les résultats de rendements d'extraction montrent que la méthode et le choix de solvant sont deux facteurs qui influencent sur le rendement.

Les deux extraits des feuilles de l'olivier n'ont montré aucune cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes aux concentrations testées.

Nous avons testé l'activité antimicrobienne par l'utilisation de la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats obtenus ont montré que les deux extraits exhibent une légère activité antifongique, ainsi qu'une activité antibactérienne vis-à-vis de quelques souches de bactéries de référence testées.

Ces résultats montrent que l'olivier a une activité antimicrobienne. Cette étude devrait être complétée par d'autres tests :

- ✓ Réaliser la technique de microdilution en milieu liquide pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices, bactéricides et fongicides : CMI, CMB et CMF ;
- ✓ Réaliser une étude phytochimique qualitative et quantitative ;
- ✓ Identification de la toxicité des feuilles de l'olivier, notamment par la détermination de la DL50 et la DL100 sur des animaux d'expérimentation ;
- ✓ Identifier l'effet thérapeutique des autres composés phénoliques des feuilles de l'olivier.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Adnan M., Bibi R., Mussarat S., Tariq A., Shinwari ZK Revue ethnomédecine et phytochimique des plantes médicinales pakistanaises utilisées comme agents antibactériens contre *Escherichia coli*. *Annales de microbiologie clinique et antimicrobiens*. 2014; 13 (1, article 40) doi: 10.1186 / s12941-014-0040-6.

Al-Azzawie HF, Alhamdani M.-SS Effet hypoglycémiant et antioxydant de l'oleuropéine chez les lapins diabétiques alloxan. *Sciences de la vie*. 2006; 78 (12): 1371–1377. doi: 10.1016 / j.lfs.2005.07.029.

Ali SI, Conseil de recherches agricoles. Flore du Pakistan . Conseil de recherche agricole du Pakistan; 1982

Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Jamous RM. Utilisation complémentaire et alternative de la médecine chez les patients diabétiques palestiniens. *Thérapies complémentaires en pratique clinique*. 2012; 18 (1): 16-21. doi: 10.1016 / j.ctcp.2011.09.001.

Al-Khalil S. Une enquête sur les plantes utilisées en médecine traditionnelle jordanienne. *Biologie pharmaceutique*. 1995; 33 (4): 317–323. doi: 10.3109 / 13880209509065385.

Allouche Y., Warleta F., Campos M., et al. Capacités antioxydantes, antiprolifératives et proapoptotiques des triterpènes pentacycliques trouvés dans la peau des olives sur les cellules cancéreuses du sein humain MCF-7 et leurs effets sur les dommages à l'ADN. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59 (1): 121-130. doi: 10.1021 / jf102319y.

Amel B. Traitement traditionnel de l'hypertension artérielle et du diabète dans le quartier de Souk Ahras. *Journal de pharmacognosie et de phytothérapie*. 2013; 5 (1): 12-20. doi: 10.5897 / jpp11.065.

Arsić I., Žugić A., Antić DR, et al. *Hypericum perforatum* L. Hypericaceae / Guttiferae Les extraits de tournesol, d'olive et d'huile de palme atténuent les lésions gastriques induites par le stress lié au froid. *Molécules*. 2010; 15 (10): 6688–6698. doi: 10,3390 / molécules15106688.

Barla A, Topçu G, Öksüz S, et al. (2007) Identification of cytotoxic Sesquiterpènes from *Laurus nobilis* I. *Food Chem* 104: 1487–4.

- Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J., Younos C.** Répertoire des médicaments à base de plantes standard dans la pharmacopée marocaine. *Journal of Ethnopharmacology* . 1991; 35 (2): 123-143. doi: 10.1016 / 0378-8741 (91) 90064-K.
- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J. M., Bernardini, A. F., & Costa, J.** (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106(1), 132-139.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.-M., Segura, Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. & Lercker, G.** (2007) Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Review Molecules*, **12**: 1679-1719.
- Bentley R, Bennett JW** (2003) What is an Antibiotic? Revisited. *Adv Appl Microbiol* 52: 303–31 (spec. 304, 312 et 330)
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A** (1999). On the invitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol*. Vol. 51. pp. 971-4
- Boskou D** (1996) Olive oil: chemistry and technology. AOCS Press, Champaign
- Bruneton J.** (1999). *Pharmacognosie - Phytochimie – Plantes médicinales*. 3e édition. Ed.
- Casaburi I., Puoci F., Chimento A., et al.** Potentiel des phénols de l'huile d'olive comme agents chimiopréventifs et thérapeutiques contre le cancer: une revue des études in vitro . *Nutrition moléculaire et recherche alimentaire* . 2013; 57 (1): 71–83. doi: 10.1002 / mnfr.201200503.
- Catherine Breton, Frédéric Médail, Christian Pinatel, André Bervillé,** De l'olivier à l'oléastre : origine et domestication de l'*Olea europaea* L. dans le Bassin méditerranéen *Cahiers Agricultures* vol. 15, n° 4, juillet-août 2006
- Courtois, G., Vandekerckhove, J., Dussiot, M., Kersual, J., Coulon, S., Belaid, Z., ... & Hermine, O.** (2007). L'érythroïde tardive: une mort avortée?. *Hématologie*, 13(6), 400-408.
- Cronquist, A.** (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia niversity Press.

Cumaoğlu A., Rackova L., Stefek M., Kartal M., Maechler P., Karasu Ç. Effets des polyphénols des feuilles d'olivier contre la toxicité du H₂O₂ dans les cellules β sécrétant de l'insuline . *Acta Biochimica Polonica* . 2011; 58 (1): 45–50

Da Costa L, Mohandas N, Sorette M, Grange MJ, Tchernia G, Cynober T. Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia. *Blood* 2001;98:2894-9

Diomede L., Rigacci S., Romeo M., Stefani M., Salmona M. Oleuropein aglycone protège les souches transgéniques de *C. elegans* exprimant A β 42 en réduisant la charge en plaques et le déficit moteur. *PLoS ONE* . 2013; 8 (3) doi: 10.1371 / journal.pone.0058893. e58893

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. *Phytothérapie*, 10(1), 10-18.

Eidi A., Eidi M., Darzi R. Effet antidiabétique d' *Olea europaea* L. chez des rats normaux et diabétiques. *Recherche en phytothérapie* . 2009; 23 (3): 347-350. doi: 10.1002 / ptr.2629.

Eidi A., Moghadam-Kia S., Moghadam JZ, Eidi M., Rezazadeh S. Effets antinociceptifs et anti-inflammatoires de l'huile d'olive (*Olea europaea* L.) chez la souris. *Biologie pharmaceutique* . 2012; 50 (3): 332–337. doi: 10.3109 / 13880209.2011.600318

El SN, Karakaya S (2009). Olive tree (*Olea europaea*) leaves : potential beneficial effects on human health. *Nutrition reviews*, 67 (11) : 632 – 638.

Fares R., Bazzi S., Baydoun SE, Abdel-Massih RM L'activité antioxydante et anti-proliférative de l'extrait libanais *Olea europaea* . *Aliments végétaux pour la nutrition humaine* . 2011; 66 (1): 58–63. doi: 10.1007 / s11130-011-0213-9.

Federici L. N. H., Loukili J., Zimmer S., Affenberger F., Maloisel E., Andrés. (2007). Manifestations hématologiques de la carence en vitamine B12: données personnelles et revue de la littérature. *La Revue de médecine interne*, 28: 225-231.

Ferreira ICFR, Barros L, Soares ME, Bastos ML, Pereira JA (2007) Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea*L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chem* 103:188–195

Galili E. Evidence for earliest olive-oil production in submerged settlements off the Carmel coast, Israel. *J Archaeol Sci.* 1997; 24(12):1141-1150.

Ghisalberti EL *Phytomédecine*. 1998 Apr; 5 (2): 147-63.

Goldsmith CD, Vuong QV, Stathopoulos CE, Roach PD, Scarlett CJ (2014) Optimization of the aqueous extraction of phenolic compounds from olive leaves. *Antioxidant* 3:700–712

Gonçalves S., Gomes D., Costa P., Romano A. Le contenu phénolique et l'activité antioxydante des infusions de plantes médicinales méditerranéennes. *Cultures et produits industriels* . 2013; 43 (1): 465–471. doi: 10.1016 / j.indcrop.2012.07.066.

Goulas V., Exarchou V., Troganis AN, et al. Phytochimie dans les extraits de feuilles d'olivier et leur activité antiproliférative contre le cancer et les cellules endothéliales. *Nutrition moléculaire et recherche alimentaire* . 2009; 53 (5): 600–608. doi: 10.1002 / mnfr.200800204.

Haddouchi F, Chaouche TM, N Halla, (2016) Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie

Jean-Yves Chabrier. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. *Sciences pharmaceutiques*. 2010. hal-01739123

Kanakis P, Termentzi A, Michel T, Gikas E, Halabalaki M, Skaltsounis AL *Planta Med*. 2013 Nov; 79 (16): 1576-87.

Ko K.-W., Kang HJ, Lee BY Activités antioxydantes, antimicrobiennes et antiprolifératives des extraits de feuilles d'olivier (*Olea europaea* L.). *Science alimentaire et biotechnologie* . 2009; 18 (3): 818–821.

Kubo A., Lunde CS, Kubo I. Activité antimicrobienne des composés d'arôme d'huile d'olive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . 1995; 43 (6): 1629-1633. doi: 10.1021 / jf00054a040.

Laroche L. H. (2001). Toxicologie générale: p25.

Lawrendiadis G. Contribution à la connaissance des plantes médicinales de Grèce. *Planta Medica* . 1961; 9 (2): 164-169. doi: 10.1055 / s-0028-1100338.

leaves. *Molecules* 2007;12:1153–62.

Leporrier M. 2008 "Anémies hémolytiques auto-immunes." *Hématologie*, 14: 432-441.

Ligne directrice de L'OCDE pour les essais de produits chimiques, 17 décembre 2001, 423.
Toxicité orale aiguë : méthode par classe de toxicité aiguë

- LipniakGawlik M.** (1998). Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the elimination Kinetics of pyrene and the urinary excretion profile of 1-hydroxypyrene in the rat. *Journal of toxicology and Environmental Health*, 55: 503-516.
- Malheiro R., Rodrigues N., Manzke G., Bento A., Pereira JA, Casal S.** L'utilisation de feuilles d'olivier et d'extraits de thé comme antioxydants efficaces contre l'oxydation de l'huile de soja sous chauffage par micro-ondes. *Cultures et produits industriels* . 2013; 44 : 37–43. doi: 10.1016 / j.indcrop.2012.10.023
- Médail F., Quézel P., Besnard G., Khadari B.** Systématique, écologie et signification phylogéographique d' *Olea europaea* L. ssp. *maroccana* (Greuter & Burdet) P. Vargas et al ., un olivier relictuel dans le sud-ouest du Maroc. *Journal botanique de la Linnean Society* . 2001; 137 (3): 249-266. doi: 10.1006 / bojl.2001.0477
- Montgomery C. A. (1990).** Oncological and toxicological research: Alleviation and control of pain and distress in laboratory animals. *Cancer Bulletin*, 42: 230-237.
- Nacoulma-Ouédraogo O.,** 1996, *Plantes médicinales et pratiques médicales*
- Obied H.K., Bedgood Jr. D.R., Prenzler P.D., Robards K.** (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chemical Toxicol* **45**: 1238-1248.
- Omer, S. A., Elobeid, M. A., Elamin, M. H., Hassan, Z. K., Virk, P., Daghestani, M. H., ... & Almarhoon, Z. (2012).** Toxicity of olive leaves (*Olea europaea* L.) in Wistar albino rats. *Asian J Anim Vet Adv*, 7(11), 1175-1182.
- Omolo OM, Okinyo D, Ndiege OI (2004)** Répulsivité de l'huile essentielle de certaines plantes du Kenya contre *Anopheles gambiae*. *Phytochimie* 65: 2797-2802
- Organisation mondiale de la santé (2000)** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. WHO_EDM_TRM_2000.1
- Özcan M, Chalchat JC (2004)** Aroma profile of *Thymus vulgaris* L.
- Pereira JA, Pereira APG, Ferreira ICFR, et al.** Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *J Agric Food Chem*. 2006;54:8425– 8431.
- Ribeiro de RA, de Barros F., Margarida M., et al.** Effets diurétiques aigus sur des rats conscients produits par certaines plantes médicinales utilisées dans l'État de Sao Paulo,

Brésil. Journal of Ethnopharmacology . 1988; 24 (1): 19-29. doi: 10.1016 / 0378-8741 (88) 90136-5

Ribeiro RDA, de Melo MMRF, de Barros F., Gomes C., Trolin G. Effet antihypertenseur aigu chez des rats conscients produits par certaines plantes médicinales utilisées dans l'État de São Paulo. Journal of Ethnopharmacology . 1986; 15 (3): 261-269. doi: 10.1016 / 0378-8741 (86) 90164-9.

Ruckebusch Y. (1981). Physiologie pharmacologie, thérapeutique animale, Ed Maloine. Paris: pp 611.

Ryan D., Robards K. Composés phénoliques dans les olives. Analyste . 1998; 123 (5): 31R – 44R. doi: 10.1039 / a708920a Activité biologique et pharmacologique des iridoïdes et des secoiridoïdes naturels.

Sarwar M. L'utilité théâtrale de la nutrition d'olive *Olea europaea* L. (famille des Oleaceae) en santé humaine: une revue. Sky Journal of Medicinal Plant Research . 2013; 2 (1): 1–4

Shakraborty D., Shah B. (2011). Antimicrobial, antioxidative and hemolytic activity of *Piper betel* leaf extracts. International Journal of pharmacy and Pharmaceutical sciences, 3: 192-199.

Sheth A., Mitaliya K., Joshi S. Les herbes de l'Ayurveda . Shet; 2005.

Shu MXL Olea. Flore de Chine . 1996; 15 : 295-298.

Sibbett GS, Ferguson L., Lindstrand M. Olive Production Manual . Université de Californie, Département d'agriculture et des ressources naturelles; 2005.

SILBERGELD, Ellen K. Chapitre 33-La toxicologie

Somova LI, Shode FO, Mipando M. Effets cardiotoniques et antidysrhythmiques des acides oléanolique et ursolique, méthyl maslinate et uvaol. Phytomédecine . 2004; 11 (2-3): 121-129. doi: 10.1078 / 0944-7113-00329

Soni MG, Burdock GA, Christian MS, Bitler CM, Crea R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. Food Chem Toxicol. 2006;44(7): 903-915.

Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley TV et Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. I. J. Antimicrob. Agents. Vol. 33.(2009). pp. 461-463.

Sudjana AN, D’Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley TV et Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. I. J. Antimicrob. Agents. Vol. 33.(2009). pp. 461-463.

Susalit, E., Agus, N., Effendi, I., Tjandrawinata, R. R., Nofiarny, D., Perrinjaquet-Mocetti, T., & Verbruggen, M. (2011). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18(4), 251-258.

Tabanca, N., Kırimer, N., Demirci, B., Demirci, F., & Başer, K. H. C. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(9), 4300-4303.

Talhaoui N, Taamalli A, Gomez-Caravaca AM, Fernandez- Gutierrez A, Segura-Carretero A (2015) Phenolic compounds in olive leaves: analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Res Int* 7:92–108

Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., & Coulibaly, A. (2012). Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d’*Annona senegalensis* Pers.(Annonaceae). *Journal of Applied biosciences*, 58, 4234-4242.

Zargari A (1997). Plantes médicinales iraniennes. Publications de l’Université de Téhéran, 3 : p. 392.