

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

Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et
de l'Univers**

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master en biologie

Option : Biochimie



**Evaluation de l'effet antimicrobien et étude de la
cytotoxicité des extraits d'*Olea europaea var sylvestris***

Présenté par : Salah Meriem

Composition de jurys :

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

Année universitaire : 2019 – 2020

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect,
la reconnaissance...

Je dédie ce travail...

A ma chère maman Rabia qui a œuvré pour ma réussite, de par son
amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux
conseils, pour toute son assistance et présence dans ma vie. Merci
beaucoup Maman

A ma chère sœur

Ikram pour son soutien, ses sacrifices et son sentiment d'amour
pour moi aux moments les plus difficiles, tu es l'étoile de ma vie. Que
Dieu te garde et illumine ton chemin et protège ta petite famille

A mon frère Alae, que Dieu éclaire ta route

A mes grands-parents et surtout mon grand-père Idris. Que Dieu
leurs procurent une bonne santé et une longue vie

À mes chères cousines :

Wissam, Ahlam, Khadija, Souhila, Iman et Fatima

J'espère que je vous ai honoré, et que je vous ai rendue fière

Un remerciement particulier et sincère à ma belle Fatima Zohra
qui était toujours avec moi

A mes petites princesses : Wissam, Ranim Samar et Maram

A mes amies : Hafsa, Bouchra et Fatiha

Une dédicace spéciale pour mes chers amis Nabila et ouali. Merci
pour les moments inoubliables passés ensemble. Puisse Dieu
renforcer les liens d'amitié qui nous unissent

À mes collègues de la promotion de biochimie !

Remerciement

En préambule à ce mémoire, je remercie ALLAH le tout puissant, qui m'a donné le courage, la force et la foi de mener à terme ce modeste travail.

Je tiens d'abord à remercier très chaleureusement mon encadreur, Mlle Mezouar Dounia, Maitre de conférences classe B, au Département de Biologie, qui a accepté de suivre mon projet et pour son aide, ses conseils indispensables et sa disponibilité, malgré de tout ce qu'on vit en ce moment à cause de la crise sanitaire mondiale.

Mon vif et sincère remerciement vont également aux membres de jury : Mr Lahfa Farid, professeur au Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, et Mr Azzi Rachid, Maitre de conférences classe A au département de biologie université Abou Bekr Belkaïd

Qui ont bien voulu m'honorer par leur précieuse présence parmi nous, afin d'examiner et d'évaluer ce modeste travail.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire LapSab pour leur disponibilité et leur aide.

Merci à ma mère et ma sœur pour leur présence, leur soutien et leurs conseils.

Que toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail accepte mon grand et sincère remerciement.

Résumé

L'olivier sauvage est une plante médicinale appartenant à la famille des Oléacées. Cette espèce est connue sous le nom d'"Ezzeboudj", elle est reconnue par ses propriétés thérapeutiques, et est largement distribuée tout autour du bassin méditerranéen.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes et de rechercher le pouvoir antimicrobien des extraits bruts hydrométhanolique et hydroacétonique des feuilles d'*Olea europaea* var. *sylvestris*.

Les extraits bruts ont été préparés par macération en utilisant deux systèmes de solvants : eau/acétone et eau/méthanol aux proportions de (30/70) (v/v). Les rendements respectifs des deux extraits sont : 23.41 % et 24.01 %.

L'étude de la toxicité *in vitro* vis-à-vis des hématies a montré que nos extraits ne présentent aucun effet toxique à 2mg/ml, 1mg/ml et 0.5mg/ml.

La méthode de diffusion sur milieu agar a été utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne. Les résultats montrent que l'activité de l'extrait hydro-méthanolique est légèrement meilleure que l'extrait hydroacétonique. Le pouvoir antimicrobien a été remarqué sur *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* et *Citrobacter freundii*. La meilleure activité a été obtenue avec *Enterobacter cloacae* (9.33 mm). Aucune activité n'a été obtenue sur *Candida albicans*.

Mots clés : *Olea europea* var *sylvestris*, effet hémolytique, activité antimicrobienne, extraits bruts.

ملخص

شجرة الزيتون البرية هي نبات طبي ينتمي إلى عائلة Oleaceae. يعرف هذه النوع باسم الزبوج وهي معروفة بخصائصها العلاجية، وتنتشر على نطاق واسع في جميع أنحاء حوض البحر الأبيض المتوسط.

في هذا العمل، نحن مهتمون بتقييم التأثير السام لهذا النبات اتجاه الكريات الدم الحمراء وللبحث عن الطاقة المضادة للميكروبات للمستخلصات الهيدروميثانولية والهيدرواسيتونية لأوراق الزيتون البري.

تم تحضير المستخلصات الخام بالنقع باستخدام نظامي مذيب: ماء / أسيتون وماء / ميثانول بنسب (30/70) (v / v). العوائد لكل من المستخلصين هي: 23.41% و 24.01%.

أظهرت دراسة السمية في المختبر مع الخلايا الحمراء أن مستخلصاتنا ليس لها تأثير سام عند 2 ملغ / مل و 1 ملغ / مل و 0.5 ملغ / مل.

تم استخدام طريقة نشر الأجار لتحديد النشاط المضاد للميكروبات. أظهرت النتائج أن نشاط المستخلص المائي الميثانولي أفضل قليلاً من المستخلص الاسيتون. وقد لوحظت القوة المضادة للميكروبات في *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* و *Micrococcus luteus* و *Enterobacter cloacae* و *Salmonella typhimurium* و *Citrobacter freundii*. تم الحصول على أفضل نشاط مع *Enterobacter cloaca* (9.3 ملم). في حين لم يتم الحصول على أي نشاط على *Candida. albicans*.

الكلمات الرئيسية: *Olea europea var sylvestris*، تأثير انحلاي، نشاط مضاد للميكروبات، مستخلصات

Abstract

The wild olive tree is a medicinal plant belonging to the Oleaceae family. This species is known as Ezzeboudj, it is recognized for its therapeutic properties, and is widely distributed around the Mediterranean basin.

In this work, we were interested in evaluating the cytotoxicity towards erythrocytes and in investigating the antimicrobial power of the crude hydro-methanolic and hydro-acetonic extracts of the leaves of *Olea europaea* var. *sylvestris*.

The crude extracts were prepared by maceration using two solvent systems : water/acetone and water/methanol in proportions of (30/70) (v/v). The respective yields of the two extracts are : 23.41% and 24.01%.

The study of the in vitro toxicity towards red blood cells showed that our extracts do not present any toxic effect at 2mg/ml, 1mg/ml and 0.5mg/ml.

The method of diffusion on agar medium was used to determine the antimicrobial activity. The results show that the activity of the hydro-methanolic extract is slightly better than the hydro-acetone extract. Antimicrobial power was observed on *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* and *Citrobacter freundii*. The best activity was obtained with *Enterobacter cloacae* (9.33 mm). No activity was obtained on *C. albicans*.

Key words : *Olea europea* var *sylvetris*, hemolytic effect, antimicrobial activity, crude extracts.

Listes des Figures

Figure 1 : Les cibles des antibiotiques
05

Figure 2 : Mécanisme d'action des antifongiques
08

Figure 3 : Formes des fruits, feuilles, inflorescence et arbre de l'oléastre
19

Figure 4 : Evolution des taux d'hémolyse obtenus pour l'extrait brut eau-acétonique du
feuille d'*Olea europea* var *sylvestris*
30

Figure 5 : Evolution des taux d'hémolyse obtenus pour l'extrait brut eau-méthanolique du
feuille d'*Olea europea* var *sylvestris*
30

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Classe d'antibiotique et leurs mécanismes d'action
06

Tableau 02 : Exemples des plantes ayant une activité antimicrobienne
09

Tableau 03 : Exemples de quelques plantes médicinales avec un effet toxique 13

Tableau 04 : Noms scientifique et vernaculaire de l'olivier sauvage
17

Tableau 05 : Rendement des extraits
29

Tableau 06 : Activité antibactérienne de l'extrait hydro-acétonique et hydro-méthanolique des feuilles de l'olivier sauvage et de l'antibiotique de référence gentamicine
31

Tableau 07 : Activité antifongique de nos deux extraits et de l'antifongique de référence amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans*
32

Table des matières

<u>Introduction générale</u>	1
<u>Chapitre 1 : activité antimicrobienne</u>	4
<u>1. Antibiotiques</u>	4
<u>2. Antifongiques</u>	7
<u>3. Plantes à activités antimicrobiennes</u>	9
<u>Chapitre 2 : Plantes médicinales et étude de la cytotoxicité</u>	10
<u>1. Généralité</u>	10
<u>2. Cytotoxicité des plantes</u>	11
<u>2.1. Toxicité aiguë</u>	12
<u>2.2. Toxicité subaiguë</u>	12
<u>2.3. Toxicité chronique</u>	12
<u>3. Hémyolyse</u>	15
<u>3.1. Hémyolyse physiologique</u>	16
<u>3.2. Hémyolyse pathologique</u>	16
<u>3.2.1. Hémyolyse intravasculaire</u>	16
<u>3.2.2. Hémyolyse extravasculaire</u>	16

<u>Chapitre 3 : Plante étudiée : <i>Olea europea</i> var <i>sylvestris</i></u>	17
<u>1. Introduction</u>	17
<u>2. Classification taxonomique</u>	18
<u>3. Description morphologique</u>	18
<u>4. Répartition géographique</u>	19
<u>5. Composition chimique</u>	20
<u>5.1. Huile d'oléastre</u>	20
<u>5.1.1. Acides gras</u>	20
<u>5.1.2. Triglycérides</u>	20
<u>5.2. Feuilles</u>	20
<u>6. Intérêt thérapeutique</u>	21
<u>Partie expérimentale</u>	24
<u>1. Préparation des extraits bruts</u>	24
<u>1.1. Matériel végétal</u>	24
<u>1.2. Préparation des extraits bruts</u>	24
<u>2. Activités biologiques</u>	24
<u>2.1. Evaluation de l'effet hémolytique</u>	24
<u>2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne</u>	25
<u>2.2.1. Microorganismes</u>	25
<u>2.2.2. Activité antibactérienne</u>	25
<u>a. Préparation de l'inoculum</u>	26
<u>b. Technique de diffusion sur gélose</u>	26
<u>c. Lecture</u>	26
<u>2.2.3. Activité antifongique</u>	27
<u>a. Préparation de l'inoculum</u>	27
<u>b. Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton supplémentée.</u>	27
<u>c. Lecture</u>	27
<u>Résultats et interprétation</u>	29

<u>1. Rendement des extraits bruts préparés</u>	29
<u>2. Effet hémolytique</u>	29
<u>3. Activité antimicrobienne</u>	31
<u>Discussion</u>	35
<u>Conclusion et perspectives</u>	39
<u>Référence bibliographique</u>	41

Introduction générale

Introduction générale

Dans la nature, il existe de nombreuses ressources aux vertus bénéfiques pour l'homme. En plus de son alimentation, l'homme y trouve des substances actives qui lui procurent un bienfait à son organisme (Rebbas *et al.*, 2012). Dans le monde entier, les plantes ont toujours été utilisées traditionnellement comme des remèdes vis-à-vis de différentes maladies. Les médicaments à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques, et leur utilisation peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de synthèse. C'est ainsi, que leur industrie est de plus en plus développée, grâce aux diverses études ethnobotaniques des plantes et études expérimentales spécialisées dans la recherche de leurs activités. (Dibong *et al.*, 2011 ; Mouas *et al.*, 2017).

Malgré que les plantes aient une importance dans la médecine traditionnelle, plusieurs espèces sont à l'origine d'intoxications, constituant un problème de santé publique assez sérieux. (Najem *et al.*, 2018). Pour cela, il est nécessaire de toujours vérifier la toxicité des plantes employées par des tests avant de rechercher ou d'évaluer leurs activités biologiques (Arab *et al.*, 2013).

Le test d'hémolyse vis-à-vis des globules rouges est un bon indicateur de cytotoxicité de toute substance ingérée car leurs membranes sont très fragiles et leurs propriétés sont bien étudiées (Fouché *et al.*, 2000).

Les produits naturels parmi lesquels les essences végétales issues de plantes médicinales sont une source prometteuse et un moyen efficace pour l'éradication des germes résistants aux antibiotiques puisqu'elles possèdent un réservoir de molécules anti-infectieuses importantes ayant des propriétés vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Buchbauer,2011).

Dans la culture arabo-musulmane, l'olivier est un arbre sacré et particulier. Il fait partie des arbres cités dans le Coran : Sourate El-Noor aya 35. *Olea europea* ou Olivier est un petit arbre, appartenant à la famille des Oléacées, et est considéré, comme une source naturelle de polyphénols. L'olivier sauvage ou oléastre et l'olivier cultivé constituent les deux variétés botaniques d'*Olea europea* (Hannachi *et al.*, 2013). L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est plus propice à la culture de ces espèces (Himouret Yahia 2018).

L'oléastre est largement utilisé par les populations locales en médecine traditionnelle dans le traitement de diverses maladies. Les propriétés médicinales de l'olivier sauvage sont principalement attribuées aux feuilles utilisées en infusion ou en décoction (Arab *et al.*, 2013).

L'oléastre a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines de la médecine et de la pharmacologie. Il possède des propriétés antidiabétiques (Bechiri-Abbes, 2016 ; Tayeb-Dermel, 2019), ainsi que plusieurs études ont indiqué ses activités antioxydantes (Bouabdallah, 2014 ; Bouarroudj *et al.*, 2016 ; Sghir, 2019), et antitumorales (Zerouh *et al.*, 2017).

Dans notre travail, nous nous intéressons à étudier les effets biologiques des extraits bruts hydro-acétonique et hydro-méthanolique macérés des feuilles de l'oléastre récoltés dans la région de l'Ouerit. Cette étude se divise à :

- ✓ Evaluer d'une part, l'effet hémolytique des deux extraits bruts pour rechercher une éventuelle cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes humains ;
- ✓ Et, d'autre part, rechercher les activités antibactérienne et antifongique des extraits bruts vis-à-vis de souches bactériennes et de levures de référence par la technique de diffusion sur agar.

Partie bibliographique

Chapitre 1 : activité antimicrobienne

1. Antibiotiques

Les bactéries sont des organismes procaryotes, qui ne contiennent pas de noyau. Leur matériel génétique est localisé dans le cytoplasme sous forme d'un chromosome unique circulaire. Dans le cytoplasme se trouve d'autres éléments, comme les ribosomes qui sont indispensables à la synthèse de protéines et aussi des organites responsables du fonctionnement métabolique (Bianchi, 2013). Les bactéries ne sont pas toutes néfastes au corps humain, il y a plusieurs bactéries qui vivent avec nous et qui ont un rôle de protection. C'est le cas des bactéries du tube digestif, on parle alors de microbiote ou flore intestinale. Ce dernier est très utile à la digestion. Aussi, la peau est également recouverte d'un microbiote empêchant les bactéries pathogènes de venir prendre leur place, et provoque une infection cutanée (Batraud, 2017).

Les antibiotiques sont des agents thérapeutiques utilisés dans le traitement des infections bactériennes. Ils ont révolutionné la médecine dès la découverte de la pénicilline en 1928, (WHO, 2014).

Ces agents sont obtenus à partir de bactéries, ou de champignons, ou par synthèse *de novo*. Techniquement, le terme " antibiotiques " ne correspond qu'aux antimicrobiens produits par des bactéries ou des champignons, mais il est utilisé comme synonyme de tous les médicaments antibactériens (Brian, 2018).

D'après Gaudy en 2005, les antibiotiques bloquent de manière spécifique, les processus métaboliques vitaux des bactéries sensibles et arrêtent ainsi leur développement : soit temporairement (effet bactériostatique) ou définitivement (effet bactéricide).

Il y a plusieurs types d'antibiotiques (Tableau 1) susceptibles d'agir sur les bactéries par différents mécanismes :

- Antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne ;
- Antibiotiques qui altèrent la perméabilité de la membrane plasmique ;
- Antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique ;
- Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs.

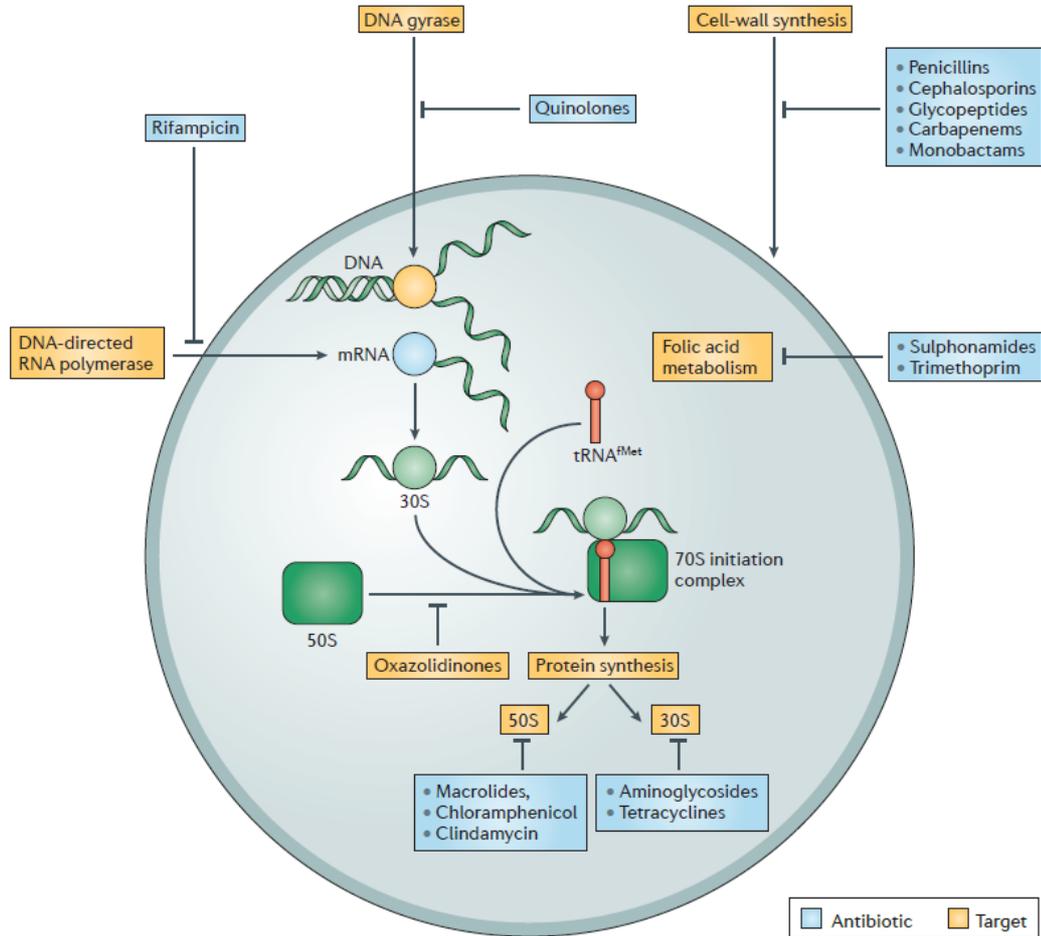


Figure 1 : Les cibles des antibiotiques (Lewis, 2013)

La résistance aux antibiotiques constitue un problème majeur pour la santé publique (Guillard *et al.*, 2019). Les bactéries pathogènes, grâce à leur flexibilité et plasticité génétique, sont capables de mettre en place un programme de résistance spécifique contre un antibiotique particulier. En effet, certaines souches ont une multirésistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques à la fois, ce qu'on appelle les bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Parmi les bactéries pathogènes qui sont devenues un vrai problème pour la santé humaine, on trouve des espèces appartenant aux familles des Entérobactéries, des Pseudomonadacés et des bactéries de la famille des Acinetobacter qui sont quasiment résistantes à tous les antibiotiques prescrits en thérapeutique (Chaudhary, 2016).

Tableau 1 : Classe d'antibiotique et leurs mécanismes d'action

Antibiotiques à activité bactéricide			Antibiotiques à activité bactériostatique		
Classe	Exemple	Cible bactérienne d'action	Classe	Exemple	Cible bactérienne d'action
Betalactamines	Pénicillines Céphalosporines	Paroi (peptidoglycane)	Phénicoles	Chloramphénicol Thiophénicoles	Ribosome
Polymixines	Colimycine	Membrane plasmique	Cyclines	Tétracyclines	Ribosome
Aminosides	Streptomycines Gentamycines	Ribosome	Macrolides	Erythromycine pristinamycine	Ribosome
Quinolones	Ciprofloxacine	ADN gyrase	Sulfamides	Cotrimoxazole	Synthèse des acides nucléiques
Rifamycine	Rifampicines	ARN polymérase	Nitroimidazoles	Métronodazole	Acides nucléiques

Selon Brian en, 2018, la résistance à un antibiotique peut être inhérente à une espèce bactérienne particulière ou acquise à la suite de mutations ou de l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques obtenus à partir d'autres espèces.

Les gènes de résistance peuvent être transmis entre deux cellules bactériennes par les mécanismes suivants :

- Transformation : absorption d'ADN nu d'un autre microorganisme ;
- Transduction : infection par un bactériophage ;

- Conjugaison : échange de matériel génétique soit sous forme de plasmides, soit sous forme de transposons.

Les bactéries ont des mécanismes de résistance variés qui leur permet :

- D'expulser l'antibiotique ATB ou d'empêcher son entrée ;
- Dégrader l'ATB ou le modifier afin de le rendre inactif ;
- Déloger ou transformer la cible de l'antibiotique, de sorte que celui-ci ne puisse plus agir ;
- De redémarrer la synthèse protéique : grâce au gène *hlfX* (est un facteur de fractionnement des ribosomes induit par choc thermique).Ce gène est exprimé en présence d'antibiotique et donne FLX comme une protéine(c'est une GTPase),cette dernière dissocie les ribosomes qui ont été bloqués par un choc thermique en deux sous unités libres qui peuvent se réassembler et réamorcer la synthèse protéique (Zhang *et al.*,2015 ; Coatham *et al.*,2016).

2. Antifongiques

Les micromycètes sont des eucaryotes caractérisés par la présence d'une paroi riche en polysaccharides qui entoure la membrane plasmique. Cette dernière, son principal composant est l'ergostérol (Garnaud et Cornet, 2020).

Les infections fongiques sont dues à des levures et des champignons filamenteux qui sont capable de vivre et se développer à la température du corps humain. Une trentaine d'espèces de micromycètes sont fréquemment isolées en pathologie humaine, responsables d'allergies ou d'infections superficielles bénignes, d'infections sévères invasives ou chroniques chez des patients sévèrement immunodéprimés ou suite à une pathologie (infection par le VIH, hémopathie) ou un traitement (corticothérapie prolongée, allogreffe). Le taux de mortalité associée à ces infections est supérieur à 40 %. Parmi les agents pathogènes, on trouve, *Cryptococcus*, *Aspergillus* et *Candida* (Garnaud et Cornet, 2020).

Pour la prévention et la prise en charge des infections fongiques invasives ou chroniques, il existe quatre classes d'antifongiques : les échinocandines, les azolés, les polyènes et les pyrimidines (Maubon *et al.*, 2014). La cible majoritaire des antifongiques est l'ergostérol présente à la membrane. Les antifongiques agissent soit sur sa biosynthèse, soit sur la synthèse du (1,3)- β -D-glucane qui est un composant majeur de la paroi cellulaire fongique (Robbins *et al.*, 2016).

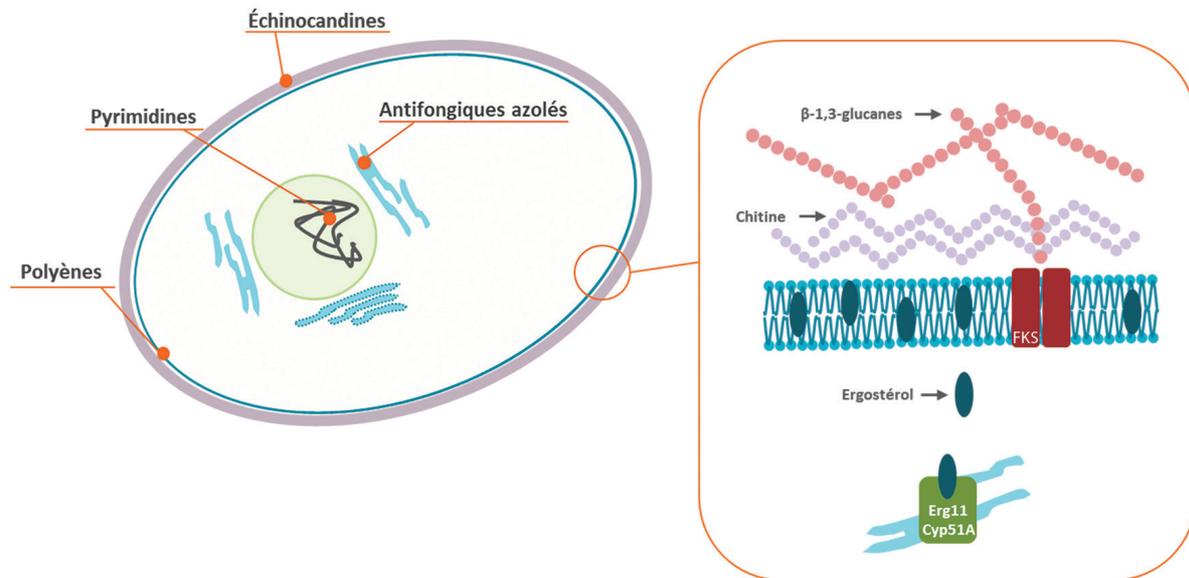


Figure 2 : Mécanisme d'action des antifongiques (Garnaud et Cornet, 2020)

En mycologie médicale et vétérinaire, on distingue deux types de résistance :

- La résistance intrinsèque : présente naturellement chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre. Elle est due à une absence de concentration de l'antifongique dans la cellule ou à une faible affinité de l'antifongique pour sa cible. Ce processus est bien connu pour la levure *Candida krusei* qui est naturellement résistante au fluconazole. L'utilisation fréquente de cet antifongique en médecine humaine, en prophylaxie ou en traitement curatif lors des candidoses a eu pour conséquence le remplacement progressif de l'espèce endogène sensible, *Candida albicans*, par d'autres espèces du genre *Candida* (*C. krusei*, *C. glabrata* ou *C. parapsilosis*) (Guinea, 2014). Il est mentionné aussi qu'une résistance naturelle de la moisissure *Aspergillus terreus* à l'amphotéricine B. Et plus récemment, la moindre sensibilité du dermatophyte géophile *Microsporium gypseum* vis-à-vis de la griséofulvine a été rapportée (Nardoni et al. 2013).
- La résistance acquise : résulte par un processus de sélection génétique sous l'effet de la répétition de l'administration de l'antifongique. C'est un processus dynamique qui peut être observé chez n'importe quelle espèce fongique. Il se passe par différents mécanismes : soit par la modification de la cible de l'antifongique, soit par la surexpression de la cible de l'antifongique ou enfin par la surexpression de pompes

membranaires d'efflux (qui réduisent rapidement la concentration d'antifongiques dans la cellule fongique) (Cuenca-Estrella, 2014).

3. Plantes à activités antimicrobiennes

Les échecs du traitement causés par la résistance aux antibiotiques ont obligé la communauté scientifique à chercher d'autres substances actives douées d'activité antimicrobienne pour remédier à ce problème de santé publique (Shin et Lim, 2004). Les propriétés antimicrobiennes des plantes médicinales sont connues depuis l'antiquité. Cependant, les scientifiques commencent à s'y intéresser jusqu'au début de 20^{ème} siècle (Yano et al., 2006).

Les produits naturels issus de plantes médicinales sont considérés comme un moyen efficace pour l'élimination des microorganismes résistants aux antibiotiques car elles contiennent un réservoir de molécules anti-infectieuses important (Buchbauer, 2011). En effet, plusieurs travaux s'intéressent à l'évaluation de pouvoir antimicrobien des plantes.

Tableau 2 : Exemples des plantes ayant une activité antimicrobienne

FAMILLE	Espèces (Parties de plantes)	Méthode d'extraction	Nature des extraits	Souches microbiennes utilisées	Inhibition en mm	CMI (mg/mL)	CMB/CMF (mg/mL)	CMB ou CMF/CMI	Référence
Acanthacées	<i>Acanthus pubescens</i> (Fleurs)	Acétate d'éthyle/ Macération	Extrait total	<i>Staphylococcus aureus</i>	16	0,05	ND	ND	Krief, 2003
Amaryllidacées	<i>Allium cepa</i>	Compression	Extrait frais	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	ND	ND	ND	Benzeggouta, 2005
Amaranthacées	<i>Pupalia lappacea</i> (Feuilles)	Eau-éthanol 3 :7/Macération	Extrait total	<i>Salmonella typhi</i>	100%	1	1.5	1.5	Hoekou et al., 2012
Apiacées	<i>Cuminum Cuminum L</i> (Graine)	Méthanol-eau 7 :3/Macération	Extrait total	<i>Staphylococcus aureus</i>	16.33	ND	ND	ND	Athamena et al., 2010

	<i>Petroselinum crispum</i> (Graine)	Hydrodistillation	Huile essentielle	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	25	ND	ND	ND	Ouis, 2015
Annonacées	<i>Xylopia aethiopica</i> (Fruits)	Hydrodistillation	Huile essentielle	<i>Escherichia coli</i>	32	ND	ND	ND	Tatsadjieua et <i>al.</i> , 2003 ; Fleischer et <i>al.</i> , 2008
Rutacées	<i>Ruta montana</i>	Soxhlet	Huile essentielle	<i>Staphylococcus aureus</i> CLIN	32,6	ND	ND	ND	Daoudi et <i>al.</i> , 2016
Sapotacées	<i>Gambeya africana</i>	Extraction par épuisement	Extrait aqueux	<i>Salmonella enterica</i> CLIN	40	50	50	1	Obame et Engonga, 2009

Chapitre 2 : Plantes médicinales et étude de la cytotoxicité

1. Généralité

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement qui en dépendent, pour assurer leurs soins de santé primaire et leur subsistance. Ces communautés utilisent la plupart des espèces végétales, tant ligneuses qu'herbacées, comme médicaments (Bouزيد, 2016).

Une plante médicinale est une plante qui possède dans un ou plusieurs de ses organes des substances ayant des propriétés médicamenteuses (Sofowora et *al.*, 2013).

Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont nécessaires à leur survie (protéines, lipides, acides nucléiques et glucides (Small, Catling, 2000). Ces derniers ont un rôle important dans plusieurs processus physiologiques (germination des graines, maturation des fruits, croissance cellulaire (Sarni-Manchado et *al.*, 2006). En plus de métabolites primaires, les plantes possèdent d'autres composés qui sont des dérivés de ces métabolites, appelés métabolites secondaires (Paul, 2015). Ils jouent un rôle dans la limitation des dommages dus aux radiations ultra-violet, protection contre les pathogènes, et aussi dans son interaction avec son environnement biologique et physique (El Hadrami et *al.*, 1997). Ces derniers sont produits en très faible quantité, et présentent une

grande variété structurale (plus de 200 000 structures définies) (Hartmann, 2007). Parmi les métabolites secondaires bioactifs présents dans la plante :

- Les composés phénoliques : tanins, quinones, coumarines, flavonoïdes... ;
- Les composés azotés : alcaloïdes ;
- Les terpènes.

2. Cytotoxicité des plantes

Depuis les années 80, dans tout le monde, le recours aux plantes médicinales a connu un regain d'intérêt sans précédent. L'organisation mondiale de la santé OMS estime que la médecine traditionnelle, notamment par les plantes, couvre les besoins en soins de santé de 80% de la population des pays en voie de développement (Bousta et Ennabili, 2011). Mais l'usage abusif de ces plantes les expose à divers accidents parce qu'en plus des principes actifs, les médicaments traditionnels contiennent d'autres molécules dont certaines ont des effets toxiques (Ambe et *al*, 2016). Certaines plantes médicinales peuvent, à fortes doses, présenter une menace pour la santé de l'homme (Haddouchi et *al*, 2016).

Les plantes toxiques sont des plantes qui contiennent des composés chimiques puissants, responsable d'effets indésirables et de toxicité (Khattabi et *al.*, 2010). Ce sont des espèces végétales qui contiennent dans certaines ou toutes de leurs parties, des substances toxiques pour l'homme ou les animaux domestiques. Ces substances toxiques sont généralement des composés organiques, plus rarement minéraux. La toxicité se manifeste le plus souvent par l'ingestion de certains organes, mais aussi par contact (Georges Becker, 1984).

Les substances toxiques des plantes sont nombreuses et leurs effets sont de nature diverse. Parmi ces substances on trouve :

- Les hétérosides : Substances naturelles organiques. Cette classe est caractérisée par l'association d'un sucre et d'une molécule non osidique. Ils possèdent des propriétés pharmacologiques marquées (Dauvin , 2009). On distingue surtout les cyanogénétiques et les sulfurés. Ces derniers, sont présents dans plus de 2500 espèces végétales et sont capable de libérer du cyanure d'hydrogène ; un gaz hautement toxique ;
- Les alcaloïdes : C'est des molécules organiques mono ou polycycliques d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et plus spécifiquement de l'azote. Ils

sont plus ou moins basique (Bruneton, 2009). Ils sont considérés parmi les toxiques les plus puissants ;

- Les substances qui sont connu par leur effet hémolytique sont les saponines et les résines (Bruneton, 2008).

La toxicité d'une plante dépend de plusieurs facteurs : (Becker, 1984)

- La façon dont l'organisme est entré en contact avec cette plante ;
- La partie de la plante incriminée : le principe actif d'une plante toxique peut être dans toute la plante ou juste dans une ou plusieurs de ses parties : la racine, les baies, ou les feuilles ;

•La dose administrée à l'organisme : certaines plantes médicinales peuvent, à fortes doses, présenter une menace pour la santé de l'homme ;

- L'état général de l'organisme.

Il y a trois types de toxicité en fonction de sa durée : aiguë, subaiguë et chronique (Bismuth *et al.*, 1987).

2.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est les manifestations pathologiques consécutives à une exposition unique de courte durée (24-48h) à une substance toxique (produits chimiques, médicaments...) qui se comporte comme un poison dans l'organisme et provoque des troubles biologiques graves ou mortels (Généstal et Cabot, 2009).

2.2. Toxicité subaiguë

Une intoxication subaiguë concerne les conséquences nocives dues à la répétition de doses dans une période inférieure à 1 mois et ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. Le produit est administré quotidiennement (Montgomery, 1990 ; Laroche, 2001).

2.3. Toxicité chronique

Elle résulte de l'exposition prolongée à de faibles doses d'un toxique entraînant ainsi des lésions insidieuses apparaissant à long terme, réversibles ou non et qui sont dues à l'accumulation du toxique ou de son effet (Généstal et Cabot, 2009).

Tableau 3 : Exemples de quelques plantes médicinales avec un effet toxique (Najem et al., 2018)

Famille	Nom vernauculaire	Nom scientifique	Nom commun	Partie étudié	Maladie traitée	Dose	Duré de traitement	Posologie
Apiaceae (umbelliferae)	Bachnikha	<i>Ammi visnaga</i> (L.) Lam	L'acanthé	Fr, Gr	Den	Pin	G	1 f/j
Aristolochiaceae	Berztem	<i>Aristolochia paucinervis</i> Pomel=A.longa subsp paucinervis (Pomel) batt	L'Aristoloché	Ra	Mét, Der, Gas, Rhu	Poi,cui	G	1 f/j
Apocynaceae	Defla	<i>Nerium oleander</i> L	Le laurier rose	Fl, Fe	Der, Rhu, Abcès	Poi, Cui	G	1 f/j
Asteraceae = Compositae	Dad ; addâd	<i>Atractylis gummifera</i> L.	Le Chardon à glu	Pl.En	Der, Rhu, Abcès	Poi, Cuil	G	1 f/j
Capparaceae	Kebbar ; Taglulut , Afsas	<i>Capparis spinosa</i> L	Le Câprier commun	Fr, Gr	Ost, Rhu	Poi, Cuil	G	1 f/j
Chénopodiaceae	Mkhinza	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	L'Ambrosine	Fe, Pl.En	Den, Der, Gas, Fvr, maux de tête	Poi	G	1 f/j
Lamiaceae	Kohila	<i>Lavandula multifida</i> L	La lavande multifide	Fe, Pl. En	ORL, Gas, Rhu, Re	Poi	G	2 f/j
	Halhal	<i>Lavandula stoechas</i> L	La lavande stéchade; Lavande papillon	Fe, Pl. En	Uro, Der, Gas, Res, Rhu	Poi,Cuil	G	1 f/j
	Salmia	<i>Salvia officinalis</i> L.	La sauge officinale (cultivée)	Fe, Pl. En	Uro, Mét, Gas, Rhu, S. Chv, calmant	Poi,Cuil	G	2 f/j

Liliaceae	Sekkoum; Tazzût	<i>Asparagus officinalis</i> L.	L'Asperge officinale	Ra, Fe, Bou	Gas, Rhu,	Poi	G	1 f/j
	Bassila; Ansal; Bssel eddib	<i>Urginea maritima</i> (L.)	L'Urginée	Ra	ORL, Gas	Cru, Cui	S	1 f/j
Oleaceae	Azzaytoun el berri; zebbouj	<i>Olea europea subsp oleaster</i>	L'Oléastre ; L'Olivier sauvage	Fe	Mét, Den, Gas, Rhu	Pin	G	1 f/j
Plumbaginaceae	Swake raayan	<i>Plumbago europea</i> L	La Dentellai re;	Ra, Fe, Pl. En	Ost, Der, Rhu	Pin	G	1 f/j
Solanaceae	Bed l-ghul; Taryâla	<i>Mandragora autumnalis</i>	La Mandragore	Ra, Fe	Ost, Mét, Rhu	Cuil	J, S	1 f/j

Fe : Feuille, Fr : Fruit, Fl : Fleur, Ra : Racine, Gr : Graine, Bou : Bourgeon, Pl. En : Plante entière, Cui : Cuit, Der : Dermatologiques, Res : Respiratoires, Uro : Urogénitales, Gas : Gastriques, Den : Bucco-dentaires, Mét : Métaboliques, Ost : Ostéo-articulaire, Rhu : Rhumatologie, S. Chv : Soins de cheveux, Fvr : Fièvre, Pin : Pincée, Cuil : Cuillerée, Poi : Poignée, J : Jour, S : Semaine, G : Jusqu'à la guérison

3. Hémostase

Les érythrocytes sont la principale composante cellulaire du sang. Ils sont le produit d'un processus de différenciation qui commence dans la moelle osseuse où les cellules souches hématopoïétiques se différencient en globules rouges. Ils sont biconcaves de 8 µm et d'une durée de vie de 120 jours (Pasini, 2008).

L'érythrocyte est une cellule non nucléée dont la membrane plasmique est son seul composant structural qui explique toutes ses diverses caractéristiques antigéniques, de transport et mécaniques (Mohandas et Gallagher, 2008).

Les globules rouges assument leur principale fonction qui est de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus grâce à l'hémoglobine. La réaction chimique fixant l'oxygène à l'atome de fer contenu dans l'hème est appelée oxydation (Lewis *et al.*, 2011).

La membrane érythrocytaire est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle s'insère un nombre important des protéines reliées au cytosquelette sous-membranaire. Le contenu de la membrane érythrocytaire est similaire à la plupart des membranes animales et elle est composée de 19.5% d'eau, 39.5% des protéines, 35.1% des lipides et 5.8% des glucides (Yawata, 2003). Le cytosquelette comprend plusieurs protéines dont la spectrine, l'ankyrine et l'actine (Manaargadoo-catin *et al.*, 2016).

L'organisation structurelle de la membrane des globules rouges humains lui permet de subir de grandes déformations réversibles tout en conservant son intégrité structurelle pendant son séjour de 4 mois dans la circulation. Sa membrane présente un comportement matériel unique. Il est très élastique (100 fois plus souple qu'une membrane en latex d'épaisseur comparable), réagit rapidement aux contraintes de fluide appliquées et est plus résistant que l'acier en termes de résistance structurelle (Mohandas et Gallagher, 2008).

L'hémolyse est un phénomène physiologique irréversible où l'hémoglobine est libérée suite à une perturbation de la membrane cellulaire des érythrocytes après une durée de vie de 120 jours qui est un laps de temps normal (Thomas *et al.*, 2013).

La libération de l'hémoglobine lors cette destruction colore le sérum ou le plasma plus ou moins fortement selon le degré en rouge orangé (Lippi *et al.*, 2011). On distingue deux types d'hémolyse : physiologique et pathologique.

3.1. Hémostase physiologique

L'hémolyse physiologique est un phénomène essentiellement intra-tissulaire, mais une faible partie de l'hémolyse physiologique se déroule dans la circulation sanguine. Les hématies âgées, sont phagocytées par les macrophages du système des phagocytes mononuclés. Chez le sujet normal, la majorité des globules rouges GR sont détruits dans les macrophages de la moelle osseuse. Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie. Cette phagocytose porte sur les GR dont le vieillissement s'est traduit par :

- Des modifications biochimiques : ralentissement métabolique, perte des lipides membranaires, phénomènes oxydatifs, diminution du contenu enzymatique ;
- Des modifications morphologiques (tendance à la sphéricité par réduction de la surface membranaire et/ou hyperhydratation) ;
- Trouble des échanges ioniques : augmentation du flux de Na⁺ dans la cellule et diminution de la concentration de K⁺ intracellulaire ;
- Des modifications de la plasticité (diminution de la déformabilité des GR entraînant une stagnation dans les capillaires) (Beaumont et Hergaux, 2005).

3.2. Hémolyse pathologique

C'est la destruction précoce et exagérée des hématies circulantes sous l'effet d'un processus hémolytique qui peut être soit intrinsèque (hémolyse corpusculaire) ou extrinsèque (hémolyse extra-corpusculaire). L'hémolyse pathologique peut être congénitale ou acquise. Un des constituants vitaux du GR (membrane, enzyme, hémoglobine) sont toujours affectés par ce processus (Beaumont et Hergaux, 2005). Dans ce phénomène, on distingue deux types d'hémolyse :

3.2.1. Hémolyse intravasculaire

Elle se passe à l'intérieur des vaisseaux et libère de l'hémoglobine directement dans le plasma. La partie protéique de l'hémoglobine se fixe sur l'haptoglobine et forme un complexe. Ce dernier est capté par les cellules du foie où l'hémoglobine est dégradée. (Bossyt et Boeynaems, 2001 ; Aguillar-Martinez, 2007).

3.2.2. Hémolyse extravasculaire

C'est un processus prédominant, qui se produit lorsque les globules rouges lésés ou anormaux sont éliminés de la circulation par la rate et le foie. L'hémolyse extravasculaire est

typique de la sphérocytose héréditaire et aussi l'anémie hémolytique auto-immune. (Aguilar-Martinez, 2007).

Chapitre 3 : Plante étudiée : *Olea europea* var *sylvestris*

1. Introduction

L'oléastre est un arbre très épineux et rameux, à des feuilles très petites (Beddiar et al, 2007). Il est présent sous deux formes non distinguables morphologiquement : soit indigène, soit dérivant de descendants ensauvagés d'oliviers ou « féral » (Besnard et Bervillé, 2000).

Olea europea ou olivier appartient à la famille des oléacées (Hannachi et al, 2013). Elle comporte deux formes différentes : la forme sauvage « variété *sylvestris* » et la forme cultivé « variété *europea sativa* » (Chiappetta et Muzzalpo, 2012 ; Kailis, 2017).

L'oléastre se diffère de l'olivier sauvage dans la taille de fruit où elle est 1.2 à 4 cm pour la forme cultivé et inférieur à 1.5 cm pour la forme sauvage. En plus, la teneur en huile n'est pas la même pour les deux formes et chacune des deux espèces a son écosystème (Hannachi et al., 2013).

Les noms scientifiques et vernaculaires de l'espèce de l'olivier sauvage sont mentionnés dans le tableau 1.

Tableau 4 : Noms scientifique et vernaculaire de l'olivier sauvage

Sous-espèce de l'olivier	Nom scientifique	Noms vernaculaires
Olivier sauvage	<i>Olea europaea</i> var <i>sylvestris</i>	Français : Oléastre ; Arabe : Zebbouje (Jacques-Meunié, 1982) ; Kabyle : Tazebboujt (De Candolle, 1883) ; Le haut Atlas au Maroc : <i>Azzemmour</i> , (Boudribila, 2004).

2. Classification taxonomique

La taxonomie de l'olivier sauvage est la suivante : (Cronquist, 1981 ; Bardoulat, 2013).

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre : *Olea*

Espèces : *Olea europaea* L.

Sous-espèces : *Olea europaea* L. ssp. *Sativa* Hoffm. et Link (= *O. europaea* L. ssp. *Europaea*) ;

Olea europaea L. ssp. *Oleaster* Hoffm. et Link (= *O. europaea* L. ssp. *sylvestris*).

3. Description morphologique

Olea europea var *sylvestris* est la forme sauvage de l'espèce (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sativa*) (Breton et Berville, 2012) qui croît dans les régions méditerranéennes. Les feuilles sont simples, et elles ont une forme ovale, persistantes et opposées. La face inférieure est de couleur blanc argentée et vert grisâtre à la face supérieure. Généralement, elles sont plus petites que celles de l'olivier cultivé. Les rameaux sont épineux et de section presque carrée (Gherib, 2014). Les fleurs de l'oléastre sont petites et blanches avec quatre pétales. Elles sont réunies en grappes dressées. Les fruits sont des drupes ovoïdes, vertes, puis, ils prennent une couleur noire à maturité, à noyau dur fusiforme (Brunton, 1999 ; Ghedira, 2008). L'olivier sauvage donne des rendements en huiles beaucoup plus faible par rapport à l'olive cultivé (Djenane et al., 2018).

Olea europea var *sylvestris* se reproduit sexuellement, où le pollen peut être distribué par le vent et les oiseaux (Baldoni et al., 2006).

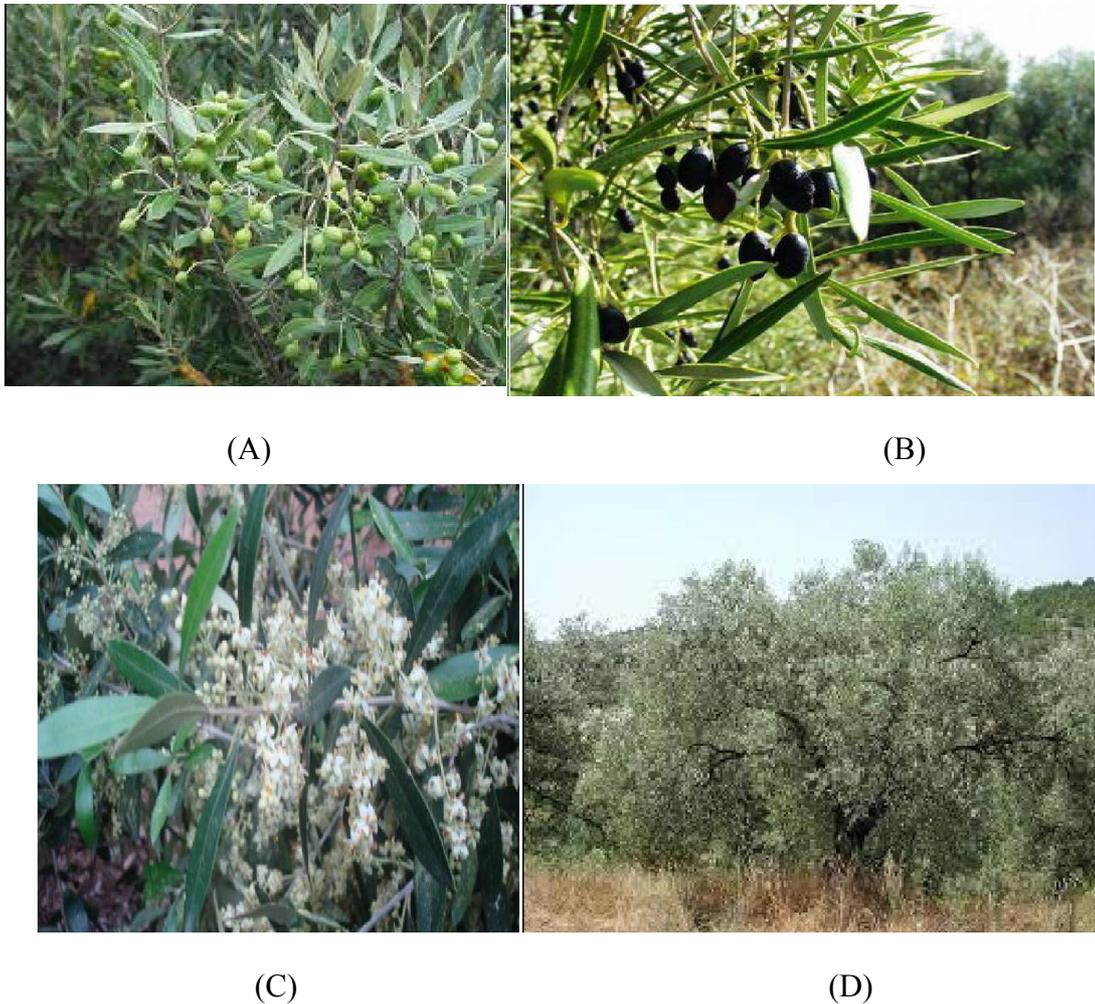


Figure 3 : Formes des fruits, feuilles, inflorescence et arbre de l'oléastre.

(A) : Fruits verts, (B) : Fruits murs, (C) : inflorescence, (D) : Arbre. (Gherib, 2014).

4. Répartition géographique

L'olivier a été domestiqué au début de Néolithique au Proche-Orient, et ils ont identifiés plus de 1000 cultivars différents. Cependant, l'oléastre se trouve dans le bassin méditerranéen occidentale tel que Maroc, Algérie, France, Espagne, Tunisie, et orientale : Chypre, Turquie et Palestine (Belarbi et *al.*, 2011).

Les populations d'oliviers sauvages sont distribuées dans différents environnements, avec des altitudes différentes et des sols qui sont considérés comme une source très importante de sa résistance aux stress abiotiques tels que la sécheresse, le vent, la baisse de température et le sel (Aranda et *al.*, 2011).

5. Composition chimique

5.1. Huile d'oléastre

5.1.1. Acides gras (Grumezescu, 2017)

- ✓ **Acides gras saturés (AGS)** : l'huile contient environ 25 % d'acides gras saturés qui sont : L'acide palmitique (C16 : 0) et l'acide stéarique (C18 : 0) ;
- ✓ **Acides gras monoinsaturés (AGMI)** : ils représentent 55 à 80 % de la teneur en lipides de l'huile d'olive. On retrouve : L'acide oléique (C18 : 1) qui est le plus abondant avec environ 77.4% (Ghazghazi et al, 2015) et l'acide palmitoléique (C16 : 1) ;
- ✓ **Acides gras polyinsaturés (AGPI)** : ils représentent 4 à 22 % de la teneur en lipides de l'huile d'olive : l'acide linoléique (C18 : 2) et l'acide α -linoléique (C18 : 3).

La composition des acides gras de l'huile sera différente en fonction du climat, de la latitude et du degré de maturation des fruits au moment de la récolte (Rayan, 1998).

Pour une meilleure conservation de la qualité du produit, il faut que les huiles d'olive ne contiennent pas plus de 10 % d'acide linoléique, car c'est le principal responsable du vieillissement chimique de l'huile.

5.1.2. Triglycérides

Les stérols sont des constituants importants des huiles d'olive car ils sont liés à la qualité de l'huile. Le β -sitostérol est le principal stérol, suivi par le Δ^5 -avenasterol et le campesterol (Hannachi et al, 2013).

Les olives contiennent des antioxydants en abondance (jusqu'à 16 g/kg), tel que l'actéoside, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et les acides phénylpropioniques, ainsi que d'autres composés réputés d'être des agents anticancéreux (par exemple le squalène et les terpénoïdes) (Owen et al., 2004). En plus, il y a les tocophérols (Djenane et al., 2012), les flavonoïdes et les composants phénoliques où les plus abondants sont les secoiridoïdes comme l'oleuropéine et le diméthyloléuropéine (Bianco et Uccella, 2000). En plus, l'huile de l'oléastre contient les chlorophylles et les caroténoïdes (Dabou et al., 2011 ; Gherib, 2014).

5.2. Feuilles

Les feuilles d'*Olea europea* var *sylvestris* contiennent :

- Les cinchonidines, un alcaloïdecquinoléinique. Elles contiennent aussi l'oleuropéine (Ghedira, 2008).
- Les acides gras mono-insaturés tels que l'acide oléique (Huang et al., 2010)

- L'extrait de feuilles d'oléastre peut inclure des traces d'éléments vitaux comme le sélénium, le fer, le zinc, la vitamine C, le β -carotène et une quantité importante d'acides aminés (Polzonetti *et al.*, 2004).

De plus, selon les travaux réalisés par Hannachi et ses collaborateurs :

- ✓ **Le noyau** : contient différents acides gras en proportion différentes, dont, l'acide oléique, palmitique et linoléique. Des protéines, comme la globuline qui est en premier, suivie par l'albumine et la prolamine.
- ✓ **La pulpe** : contient les acides gras présents dans le noyau, mais en quantité différente. En plus, elle contient le potassium, le sodium et les composés phénoliques (Hannachi et al, 2019).

6. Intérêt thérapeutique :

L'huile de l'olivier sauvage a plusieurs effets thérapeutiques, d'après Sidi Mammar (2012). Les vertus médicinales de ce produit sont :

- ✓ Traitement des maladies cardiovasculaires ;
- ✓ Son absorption régulière par voie orale élimine le mauvais cholestérol ;
- ✓ Un effet positif sur le rhume et les affections pulmonaires ;
- ✓ Amélioration de la vision par l'ajout d'une goutte d'huile dans l'œil ;
- ✓ Réduction des douleurs musculaires ;
- ✓ Régulation de la tension artérielle ;
- ✓ Utilisation contre les maladies cutanées parasitaires, comme bain de bouche pour les gencives et aussi pour calmer les douleurs dentaires (Goodyer, 2000).

L'huile de l'olivier sauvage a une forte activité antiradicalaire, antibactérienne, et antifongique (Ghazghazi *et al.*, 2015 ; Mirad et Badis, 2019). Il est utilisé aussi comme un antidote vis-à-vis de quelques toxines et un bon lubrifiant pour les cheveux (Bammi et Douira, 2002).

L'hydroxytyrosol retrouvé dans l'huile d'olive, exerce une activité antioxydante, anti-inflammatoire, anti-plaquettaire et anti-athérogène (Tejada *et al.*, 2017).

L'extrait phénolique de l'oléastre à concentration de 20 μg / ml réduit le nombre de cellules cancéreuses du côlon d'environ 50% sans affectant la viabilité des cellules normales du côlon (Zeriouh *et al.*, 2017).

Matériel et méthodes

Partie expérimentale

Ce travail est réalisé dans le laboratoire de recherche : Antibiotique, antifongique : physico-chimie, synthèse et activité biologique, du département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers – Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

1. Préparation des extraits bruts

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de l'expérimentation est représenté par des feuilles de l'olivier sauvage qui sont récoltées durant le mois de Décembre 2019 dans la région l'Ourit à Tlemcen. Puis, elles sont séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité. Elles sont par la suite coupées finement et broyées le jour de l'expérimentation.

1.2. Préparation des extraits bruts

Deux extraits bruts sont préparés par macération de 24 heures avec 200 ml d'eau/méthanol et 200 ml d'eau acétone. Les proportions utilisées pour les deux systèmes de solvants sont (30/70) (v/v).

Ensuite, les extraits sont filtrés et concentrés par un évaporateur rotatif à 60°C pour éliminer la phase organique. La phase aqueuse des deux extraits est évaporée dans une étuve à 35° C. Les résidus obtenus sont conservés au réfrigérateur à + 4°C.

2. Activités biologiques

2.1. Evaluation de l'effet hémolytique

Le test de l'effet hémolytique des extraits bruts d'oléastre a été réalisé *in vitro* sur une suspension d'érythrocytes du sang humain dans le PBS (Phosphate Buffered Saline) à pH = 7,4 [chlorure de potassium (2,7 mM), dihydrogénophosphate de potassium (2 mM), Chlorure de sodium (137 mM), hydrogénophosphate de sodium (8 mM)] (Mohan, 2006).

Un prélèvement sanguin a été réalisé à partir d'un sujet sain dans un tube héparine, puis, centrifugé à 2500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant (plasma) est éliminé et le culot a été lavé deux fois par le tampon PBS. Ensuite, la suspension érythrocytaire est préparée à 2 %.

Les deux extraits à tester sont préparés et solubilisés dans le tampon PBS à des concentrations allant de 0,5 mg/ml à 2 mg/ml.

Le test de l'effet hémolytique de la plante étudiée est réalisé selon la méthode de Guo-Xiang et Zai-Qun (2007 et OMS 2011). Dans des tubes à hémolyse, 90 µl de chaque extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 8910 µl de la suspension érythrocytaire préparée à 2 %. Les tubes sont incubés pendant 60 minutes à 37 °C dans un incubateur agitateur. Les prélèvements sont réalisés aux temps 0, 30 et 60 minutes d'incubation.

Des prélèvements de 500 µl sont réalisés pour chaque tube et sont mélangés délicatement avec 1.5 ml de tampon PBS. Les tubes sont centrifugés à 2 500 rpm pendant 5 minutes.

La lecture des absorbances des surnageant est effectuée à 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc contenant du PBS.

Dans les mêmes démarches expérimentales, un tube d'hémolyse totale qui contient 2970 µl de la suspension érythrocytaire et 30 µl de Triton X100 et un tube témoin négatif composé de 2970µl la de suspension érythrocytaire et 30µl de la solution tampon de PBS sont préparés et testés.

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 :

2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

2.2.1. Microorganismes

L'activité antimicrobienne est réalisée sur 11 souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC 8739, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterobacter cloacae* ATCC 35659, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 et une levure : *Candida albicans* ATCC 10231.

2.2.2. Activité antibactérienne

Cette activité a été déterminée par la méthode de diffusion sur milieu solide selon le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en 2012.

a. Préparation de l'inoculum

➤ **Préparation de la préculture**

Les tests antibactériens sont réalisés à partir de cultures jeunes (18h), en phase de croissance exponentielle. La revivification des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne sur un milieu solide qui est une gélose nutritive stérile GN. Après une incubation de 24 heures à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de pétri contenant le milieu Mueller Hinton MH, puis, incubées dans une étuve à 37°C.

➤ **Préparation de la suspension bactérienne**

A partir de cultures jeunes, nous avons prélevé quelques colonies bien isolées dans l'eau physiologique stérile.

Après homogénéisation du mélange, la suspension est ajustée au standard McFarland 0.5 à l'aide d'un spectrophotomètre qui correspond à une absorbance comprise entre 0.08 et 0.13 lue à 625 nm où l'absorbance finale de colonie obtenue est équivalente à 10⁸ UFC/ml. L'ensemencement est fait par écouvillonnage sur le milieu de gélose Mueller Hinton.

b. Technique de diffusion sur gélose

Des disques en papier filtre de 6 mm de diamètre sont préparés et stérilisés. Ces disques sont imprégnés par 10 µl des extraits hydrométhanolique et hydroacétonique à tester à une concentration de 50 mg/ml dans le DMSO. Ensuite, les disques sont transférés dans les boîtes inoculées à l'aide d'une pince. Et les boîtes sont incubées ensuite pendant 24 heures à 37°C.

Par la suite, un antibiogramme est réalisé pour chaque espèce bactérienne testée, il consiste à déterminer la résistance des souches bactériennes à l'antibiotique gentamycine. Ainsi, nous avons déposé les disques d'antibiotiques sur la gélose MH préalablement ensemencée, puis, incubé les boîtes à 37 °C pendant 24 heures. Trois répétitions sont réalisées pour chaque extrait et pour l'antibiotique testé.

c. Lecture

La lecture est réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C. Elle consiste à mesurer les zones d'inhibition entourant les disques déposés sur le milieu. Les valeurs sont exprimées en millimètres.

2.2.3. Activité antifongique

a. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé dans les mêmes conditions comme pour les bactéries avec un équivalent à 0.5 McFarland. Sauf pour l'absorbance qui doit être comprise entre 0.12 et 0.15 lue à une longueur d'onde de 530 nm où l'absorbance finale de colonie obtenue est équivalente à 10^6 UFC/ml, et le milieu de culture utilisé pour la levure est le sabouraud liquide.

b. Technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton supplémentée.

Cette méthode a pour objectif de tester la sensibilité des levures capables de fermenter le glucose vis-à-vis des substances antifongiques.

Le milieu Mueller Hinton gélosé est supplémenté de 2% de glucose et 0.5µg/ml de bleu de méthylène. Ce colorant permet de produire des zones d'inhibition bien visibles. Par la suite, la souche estensemencée sur les boites de pétri contenant le Mueller Hinton supplémenté. Les disques stériles préparés préalablement et imprégnés par 10 µl/disque de nos extraits à tester, sont déposés sur la gélose. Ensuite, les boites sont incubées à 35° C pendant 24 heures (CLSI ,2004).

Nous avons testé l'amphotéricine B, un antifongique de référence, dans les mêmes conditions sur la levure de *Candida*. Les tests sont réalisés trois fois pour chaque extrait.

c. Lecture

Après incubation, la lecture des boites est effectuée et les diamètres de zones d'inhibition sont mesurés.

Résultats et interprétation

Résultats et interprétation

1. Rendement des extraits bruts préparés

Le rendement d'une extraction se calcule par le rapport entre la masse de l'extrait et la masse de la matière première végétale traitée.

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R \% = \text{PEB} / \text{PMV} \times 100$$

Où, R (%) : représente le rendement en pourcentage ;

PMV : poids de matière végétale (g) ;

PEB : poids de l'extrait brut (g).

Tableau 5 : rendement des extraits bruts de l'olivier

Poids de matériel végétal (g)	Mode de préparation	Nature d'extrait	Masse de l'extrait (g)	Rendement %
20	Macération	Eau-acétone	4.683	23.415
		Eau - méthanol	4.803	24.015

2. Effet hémolytique

Les figures ci-dessous présentent l'évolution des absorbances de l'effet hémolytique des extraits en fonction de temps.

Les tests d'hémolyse vis-à-vis des érythrocytes ont été réalisés pendant 60 minutes à une température de 37°C. Les extraits sont testés à trois concentrations différentes : 2 mg/ml, 1 mg/ml et 0.5 mg/ml.

D'après les résultats obtenus, nous n'avons observé aucune hémolyse des globules rouges en présence des extraits et aux concentrations étudiés.

Le taux d'hémolyse le plus élevé en présence de l'extrait hydro-acétonique est égale **0.0408** %, et il est égale à **0.0168** % pour l'extrait hydrométhanolique à une concentration de **2 mg/ml** (après 30min).

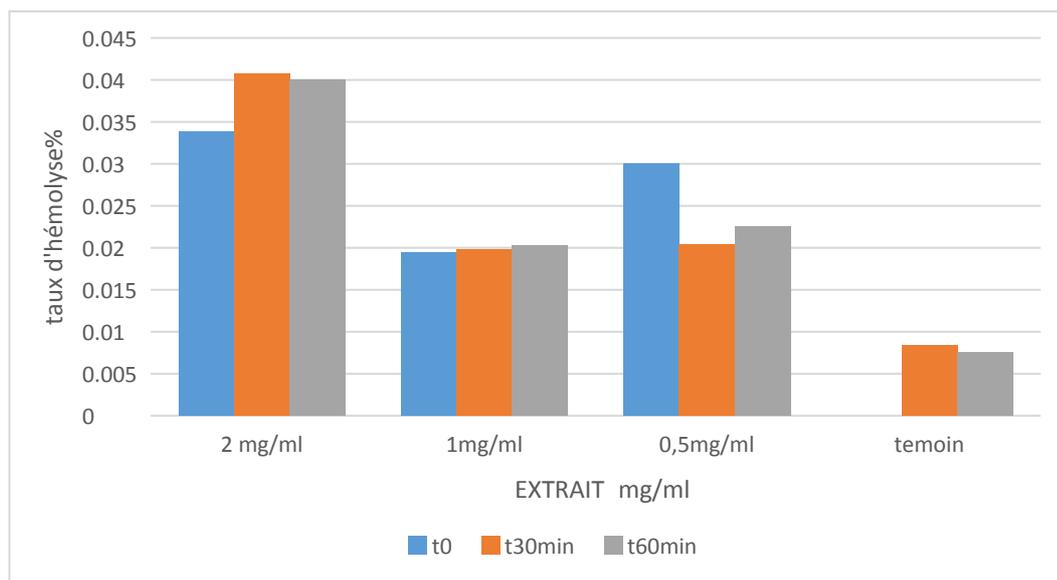


Figure 4 : Evolution des taux d'hémolyse obtenus pour l'extrait brut eau-acétonique du feuille d'*Olea europea var sylvestris*

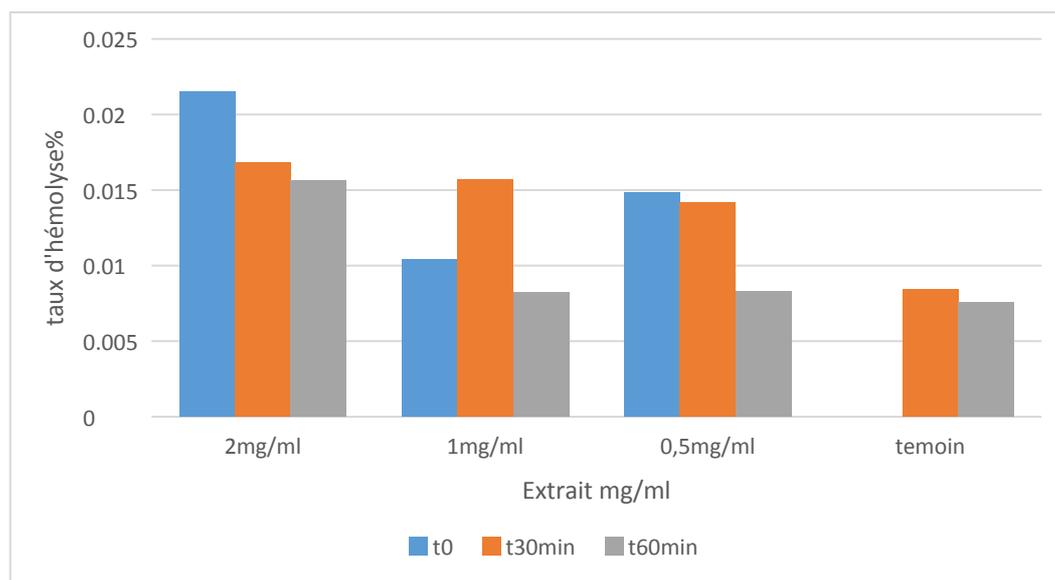


Figure 5 : Evolution des taux d'hémolyse obtenus pour l'extrait brut eau-méthanolique du feuille d'*Olea europea var sylvestris*

3. Activité antimicrobienne

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien de nos extraits hydro-acétonique et hydro-méthanolique des feuilles de l'olivier sauvage par la méthode de diffusion sur milieu solide.

L'effet antimicrobien de nos extraits vis-à-vis des souches bactériennes, est estimé par la mesure des diamètres d'inhibition autour des disques qui sont imprégnés avec nos extraits.

Tableau 6 : Activité antibactérienne de l'extrait hydro-acétonique et hydro-méthanolique des feuilles de l'olivier sauvage et de l'antibiotique de référence gentamicine.

Les souches	Diamètres (mm)		
	Nature de l'extrait		Gentamicine
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	EA	7.3±1.5	23
	EM	8,3±2.5	
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	EA	7	26
	EM	7.3±1.1	
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	EA	7.6±1.5	24
	EM	8.6±2.3	
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	EA	8.3±0.5	24
	EM	9.3±1.1	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	EA	6	24
	EM	7± 0.5	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	EA	6± 0.5	23
	EM	6±0.5	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	EA	8 ±1.7	24
	EM	8± 2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	EA	6±0.5	20
	EM	6±0.5	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	EA	6±0.5	23

	EM	7±0.5	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	EA	7±0.5	23
	EM	7.3±0.5	
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	EA	7.6±2	18
	EM	7.6± 2	

E A : Extrait hydroacétonique ; E M : Extrait méthanolique

Tableau 7 : Activité antifongique de nos deux extraits et de l'antifongique de référence amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans*

Diamètres (mm)			
Souche	Nature d'extrait		Amp B
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	E A	6	26
	E M	6	

E A : Extrait hydroacétonique ; E M : Extrait méthanolique

D'après les résultats obtenus pour l'activité antibactérienne, nos extraits bruts à la concentration de 50 mg/ml ont présenté une légère activité vis-à-vis de quelques souches bactériennes : *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (9.3±1.1 mm), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (8.6± 2.3 mm), *Escherichia coli* ATCC 8739 (8,3±2.5), *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 (8±2 mm), *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (7.6±2 mm), *Proteus mirabilis* ATCC 35659 (7.3± 1.1 mm). Cependant, les extraits n'ont pas présenté une activité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Nous avons noté que l'extrait eau-méthanol a un effet légèrement meilleur sur les souches que le deuxième extrait eau –acétone. Cette différence peut être liée à la différence en composition chimique des deux extraits.

Selon les résultats de l'activité antifongique mentionnés dans le tableau 7, nous avons remarqué que nos extraits à la concentration testée n'ont présenté aucun effet sur la souche de *Candida albicans*.

Discussion

Discussion

Notre travail a pour but d'évaluer l'effet hémolytique et l'activité antibactérienne des extraits des feuilles d'*Olea europea* var. *sylvestris*.

Afin de mettre en évidence l'effet biologique de l'oléastre, nous avons réalisé une macération des feuilles de notre plante pendant 24 heures en utilisant deux systèmes de solvants : eau /méthanol aux proportions (30/70) (v/v) et eau / acétone aux proportions (30/70) (v/v).

L'extrait hydro-méthanolique a présenté un rendement de 24,01 % qui est élevé par rapport au rendement de l'extrait eau-acétone qui est de 23.415 %.

En comparant nos rendements obtenus avec d'autres travaux, nous observons que nos valeurs de rendement sont élevées que celles obtenues par Moussouni et Seghir en 2019, qui ont trouvé un rendement de 13,77% et de 19,76% pour les extraits eau-méthanol et eau-acétone macérés, respectivement. Par contre, d'après les résultats enregistrés par Teyeb-Dermel en 2019, a obtenu un rendement plus élevé de 32,705% pour l'extrait hydrométhanolique préparé par une extraction sous reflux. De même, Mirad et Badis en 2019, ont trouvé un rendement de 31,51% pour l'extrait éthanolique préparé par macération.

Le rendement dépend donc de plusieurs paramètres : la période de la récolte, la méthode d'extraction utilisée, le solvant utilisé, ainsi que, l'origine de la plante (Arab et al, 2014).

Après avoir préparé nos extraits, nous avons recherché leur cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges. Nos extraits n'ont présenté aucune toxicité aux trois concentrations testées vis-à-vis des érythrocytes pour toute la période d'incubation (1 heure).

Une étude *in vivo*, réalisée par Brahim en 2017 sur l'évaluation de la toxicité aiguë des extraits d'*Olea europea* par gavage oral sur des rats. Cette méthode permet d'évaluer les effets toxiques qui apparaissent dans un temps court après l'administration d'une substance à dose unique. Les rats ont reçu 3 doses différentes pendant 3 jours (200 mg/ml, 600 mg/ml et 800mg/ml). Elle a noté que l'extrait de la partie aérienne d'*Olea europaea* n'est pas létal et toxique à ces doses. Elle a ajouté que l'évaluation de l'effet de la dose de 800 mg/ml sur les reins, les foies et les intestins grêles chez les rats Hamsters montre l'absence d'impact pathologique ou des altérations morphologiques sur les tissus, établie par le diagnostic anatomopathologique des coupes histologiques, sauf des congestions vasculaires remarquables.

Dans le but d'estimer l'effet antimicrobien des extraits d'oléastre, nous avons réalisé le test de diffusion sur milieu solide. D'après les diamètres d'inhibition mesurés autour des disques, l'extrait hydrométhanolique donne un pouvoir antibactérien légèrement meilleur par rapport à l'extrait hydro-acétonique. Cette différence est peut-être liée à la composition chimique en métabolites secondaires dans les deux extraits.

Concernant l'activité antibactérienne, les extraits des feuilles d'oléastre ont une légère activité vis-à-vis des souches étudiées. Nos résultats s'accordent avec les résultats de nombreux auteurs qui ont obtenu une activité vis-à-vis des bactéries à Gram négatif ou à Gram positif (Djenane *et al.*, 2012 ; Bouharb, 2014 ; Himour et Yahia, 2018 ; Salama *et al.*, 2020).

Nos extraits n'avez aucune activité sur *Candida albicans*. L'analyse de nombreux travaux, a suggéré que l'activité antimicrobienne des extraits de plantes nécessitait dans la plupart de cas des fortes concentrations (Bagre *et al.*, 2006 ; Adejare *et al.* 2013). Ce qui laisse supposer probablement que la concentration que nous avons utilisé était faibles et expliqueraient l'absence d'activité.

Une étude est réalisée par Nahal- Boudierba *et al.*, 2012 sur l'activité antibactérienne des feuilles d'olivier sauvage. Les auteurs ont testé le pouvoir antimicrobien de l'extrait aqueux. Ils ont constaté que ce dernier est réagi positivement sur toutes les souches testées dont les diamètres d'inhibition sont : *Klepsiella pneumoniae* (11,7 mm) ; (13,3mm) *Pseudomonas aeruginosa*; (9 mm) *Staphylococcus aureus* et la meilleur activité est obtenue sue *Escherichia coli* (15.3 mm) avec une CMI de 150µl/ml.

Mirad et Badis en 2019 ont réalisé une extraction par macération hydroéthanolique des feuilles en utilisant deux proportions : 50 % et 70 %. Elles ont constaté que les deux extraits exercent une activité antibactérienne sur la majorité des bactéries testées à une concentration de 200 mg/ml, et la meilleure activité est obtenue pour l'extrait éthanolique 70%, dont les diamètres d'inhibition sont : **17,97 mm** contre *Bacillus cereus* ATCC 14579 ,**19,97 mm** contre *Staphylococcus aureus* MU50, **14mm** contre *Escherichia coli* ATCC 25922, **12,93 mm** contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Mais elles ont remarqué que cette dernière souche est résistante avec un diamètre de 6 mm vis-à-vis de l'extrait éthanolique à 50%. Ces mêmes auteurs ont noté que les bactéries à Gram négatif sont moins sensibles que les bactéries à Gram positif. Cette observation pourrait s'expliquer par la différence

importante de la couche externe des Gram positif qui influence sur la perméabilité de la paroi bactérienne et qui est généralement moins efficace chez les Gram négatif. Ceci peut être dû à la présence d'un taux élevé de phospholipides dans la paroi des Gram négatif et de molécules polysaccharidiques dans la membrane externe, imperméable aux molécules antibiotiques et composés lipophiles, et aussi un espace périplasmique riche en enzymes qu'on ne retrouve pas chez les Gram positif selon (Guinoiseau, 2011).

Mirad et Badis, ont réalisé la technique de dilution en milieu liquide (méthode quantitative) qui comporte l'étape de la détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI, dont une série de dilutions des extraits éthanoliques étudiés a été testée (50, 25, 12.5 et 6.25 mg/ml).

Elles ont noté que les extraits de l'olivier sauvage aux différentes proportions de solvant d'extraction, montrent des CMI très importantes de l'ordre de 6,25 à 12 ,5 mg/ml et allant jusqu'à des CMI inférieures à 6,25 mg /ml pour l'extrait éthanolique à 70% vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 14579 et *Staphylococcus aureus* MU50. Concernant *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, la CMI est 12,5 mg/ml (pour l'extrait 70%). (Mirad et Badis, 2019).

Il faut rappeler que l'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction, la concentration en principe actif et aussi l'origine des souches utilisées (Thangara et al., 2000).

Onzo et al., 2015 indiquent que le diamètre d'inhibition diffère d'un extrait à un autre et d'une bactérie à une autre et du taux de croissance des microorganismes.

Les travaux de Bisignano et al. 1999, montrent que le passage de l'état brut à l'état purifié augmente l'activité antibactérienne et par conséquent diminue les valeurs des CMI.

Selon Brainte et al., 2000, les polyphénols sont les principaux composants antimicrobiens des plantes du fait qu'ils possèdent des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un grand nombre de microorganismes.

Medina et al. 2006, indiquent que l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol sont parmi les composés majeurs antibactériens que contiennent les polyphénols, ce qui présente un spectre d'action élargi.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales resteront toujours une source fiable de principes actifs d'intérêt thérapeutique. Face à la phobie des molécules de synthèse chimique, leur utilisation est en progression constante.

Notre étude avait pour objectif l'évaluation du pouvoir hémolytique des extraits bruts hydro-acétonique et hydro-méthanolique des feuilles d'*Olea europea* var. *sylvestris*, pour rechercher une éventuelle cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes humains, et aussi, rechercher les activités antibactérienne et antifongique des extraits bruts vis-à-vis de différents microorganismes de référence.

A la lumière des résultats obtenues, nous avons conclu que :

- ❖ Les résultats des tests d'hémolyse réalisés ont montré que les deux extraits bruts d'*Olea europea* var. *sylvestris* ne présentent aucun effet toxique aux concentrations utilisées : 2 mg/ml, 1 mg/ml et 0.5 mg/ml.
- ❖ Nos extraits n'ont aucun effet sur *Candida albicans* ATCC10231, et aussi nous avons noté que la meilleure activité antibactérienne est obtenue par l'extrait hydro-méthanolique. Concernant l'activité antibactérienne, nous avons remarqué que nos extraits ont une légère activité vis-à-vis de certaines souches, où, le meilleur effet est obtenu sur *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (9.33 mm).

En perspective, il serait fort intéressant de :

- ✓ Approfondir les études *in vitro* par des expériences *in vivo* et de s'en assurer de l'innocuité totale des extraits testés chez un modèle animal de choix ;
- ✓ Déterminer les concentrations minimales inhibitrices CMI des extraits vis-à-vis des microorganismes utilisés dans notre étude pour une meilleure évaluation des activités antimicrobiennes ;
- ✓ Rechercher et évaluer d'autres activités biologiques présentes dans les racines ;
- ✓ Explorer la composition chimique des extraits et de tester l'effet isolé et synergique des différents constituants des différents extraits de cette espèce végétale.

Références bibliographiques

Référence bibliographique

Adejare, OY., Oduyebo, OO., Oladele RO., Nwaokorie FO., Ogunsola FT. (2013). In-vitro antifungal effect of Garcinia Lola and Garlic (*Alliums sativu*) on vaginal isolates of *Candida*. African journal of clinical and experimental microbiology 14 (3) ,140-145.

Ambe, A. S., Camara, D., Ouattara, D., Yapo, C. Y., Soumahoro, A., Zirihi, G. N., & N'Guessan, K. E. (2016). Etude ethnobotanique, évaluation in vitro de l'activité antifongique et cytotoxique des extraits de *Enantia polycarpa* (DC) Engl. et Diels (Annonaceae). International Journal of Biological and Chemical Sciences, 10(1), 23-34.

Arab K., Bouchenak O. (2013).EValuation De L'Activite' Biologique Des Feuilles De l'Olivier Sauvage Et Cultive'. Afrique Sci ,159–166

Arab K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K. (2014). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). J Fundment Appl Sci., 6(1), 79-93.

Aranda, S., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R.M., Landa, B.B. (2011) Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. *subsp europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*. Plant Soil 343 ,329–345.

Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S. (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1), 69-81.

Bagré, I., Bahi, C., Méité, S., Djaman, A. J., & Guédé, G. F. (2006). Évaluation et amélioration in vitro de l'activité antifongique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh (rubiaceae) sur *cryptococcus néoformans*, un champignon responsable de mycose humaine. *J Sci Pharm Biol*, 7(1), 37-46.

Baldoni L., Tosti N., Ricciolini C., Belaj A., Arcioni S., Pannelli G., Germana MA., Mulas M., Porceddu A. (2006) Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. *Ann Bot* 98,935–942.

Bammi, J., Douira, A. (2002). Les plantes médicinales dans forêt de l'achach (plateau central, maroc). *Acta Bot. Malacit.* 27, 131–145.

- Battraud, P.** (2017). La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité? (Doctoral dissertation, Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lille 2, faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de Lille.
- Beaumont F.,Hergaux C.,**(2005) .Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques ; régulation par l'hepcidine C. / Transfusion Clinique et Biologique.p 123–130.
- Beddiar.A., Mekahlia.M.** (2007). infectivité et efficacité de 4 MPRPHOTYBES de spores de champignon endomycorhiziens à arbuscules extraits de sols Algériens et inoculés à l'oléastre .Colloque internatinal sur les BioTech World.24-25 Novembre.Oran, Algérie, p.18.
- Belarbi M., Bendimered,S.,Sour,S.,Soualem,Z.,Baghdad,C.,Hmimed,S.,Chermat ,F.,Visoli,F.**(2011).Oleastre oil positively modulates plasma lipids in humans.J.Agric.Food Chem,59(16) ,8667-8669.
- Benzeggouta, N.** (2005). Etude de l'activité antibacterienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments, Mémoire de master. Université Mentouri Constantine.
- Besnard G. & Bervillé A.** (2000). Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L.subsp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. Comptes rendus de l'Académie des Sciences Série III, 323, 173-81.
- Bianchi, V., Duployez, N., & El Anbassi, S.** (2013). *Bactériologie-virologie*. De Boeck Supérieur.
- Bianco, A., & Uccella, N.** (2000). Biophenolic components of Olives. *Food Research International*, 33(6), 475-485.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N. and Saija, A.** (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Pharm Pharmacol*, 51(8) , 971-974.
- Bossyt X., Boeynaems J.M.** (2001). louvain Garant Repères en Diagnostic de laboratoire Blood, 112(10).p 3939-39.
- Bouabdallah Adel.** (2014). Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europea sylvestris*), Mémoire de Master. Université de Tlemcen.

- Bouarroudj, K., Tamendjari, A., & Larbat, R.** (2016). Quality, composition and antioxidant activity of Algerian wild olive (*Olea europaea L. subsp. Oleaster*) oil. *Industrial Crops and products*, 83, 484-491.
- Boudribila M-M.** (2004). Les anciens Amazighs avant les phéniciens. Mode de vie et organisation sociale. *AWAL*, 29, p ,17-31
- Bouharb, H., El Badaoui, Kh., Zair,T., Chakir, S., & Alaoui, T.** (2014). Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences*, 78(1), 6685-6693.
- Bousta D, Ennabili A.** (2011). L'Institut national des plantes médicinales et aromatiques au service du développement de la phytothérapie au Maroc. *Phytothérapie*, 9(5), 297-303.
- Bouزيد, A., Chadli, R., & Bouزيد, K.** (2017). Étude ethnobotanique de la plante médicinale *Arbutus unedo L.* dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale. *Phytothérapie*, 15(6), 373-378.
- Brahimi, S.** (2017). Contribution à l'évaluation de l'effet toxique et thérapeutique des plantes médicinales: *Juniperus phoenicea*, *Olea europaea* Et *Urtica Dioica* (Doctoral Dissertation, Université De Bouira).
- Brainte, R., Francesco, L. C., Ferdinando, F., Maurizio, P., & Roberto, N.** (2000). Hydrolysis of oleuropein by recombinant β -glycosidases from hyper thermophilic *Archea sulfolobus* immobilised on chitosan matrix. *J Biotechnol*, 71, 275-286.
- Breton, C. M., & Berville, A.** (2012). New hypothesis elucidates self-incompatibility in the olive tree regarding S-alleles dominance relationships as in the sporophytic model. *Comptes rendus biologies*, 335(9), 563-572.
- Bruneton J.** (1999). *Pharmacognosie - Phytochimie – Plantes médicinales*, 3^{ème} Ed., Technique et Documentation, Paris.
- Buchbauer G** (2011). A review on recent research results on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr J* 27, 13–39.
- Chaudhary AS** (2016) A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharm Sin B* 6, 552–6.
- Chiappetta,A., Muzzalupo,I.** (2012). Botanical Description. In *Olive Germplasm-The Olive Cultivation ,Table Olive and Olive Oil Industry in Italy* ,I.Muzzalupo,ed(In Tech).

- Clinical and Laboratory Standards Institute** ; Wayne P. (2004). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline. Document M-44A. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, 19087-1898.
- Clinical and Laboratory Standards Institute** ; Wayne P. (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests. Approved standard M2-A11 7th ed., 950 West Valley Road, Suite 2500, 19087.
- Coatham, M.L., Brandon, H.E., Fischer, J., Schümmer, T., & Wieden, H.** (2016). The conserved GTPase HflX is a ribosome splitting factor that binds to the E-site of the bacterial ribosome. *Nucleic acids research*, 44(4), 1952-1961.
- Cronquist A.** (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, USA. P, 1262.
- Cuenca-Estrella, M.** (2014). Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 54-59.
- Dabbou, S., Dabbou, S., Selvaggini, R.** (2011). Comparison of the chemical composition and the organoleptic profile of virgin olive oil from two wild and two cultivated Tunisian *Olea europaea*. *Chemistry and Biodiversity*. 8, 189-202.
- Daoudi, A., Hrouk, H., Belaidi, R., Slimani, I., Ibijbijen, J., & Nassiri, L.** (2016). Valorisation de *Ruta montana* et *Ruta chalepensis*: étude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *J Mater Environ Sci*, 7, 926-35.
- Dauvin, E.** (2009). Intoxication par les plantes: Site internet d'aide à la reconnaissance de la plante et à la prise en charge de l'intoxiqué, Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré.
- De Candolle A.** (1883). Origines des plantes cultivées. Ed., Librairie Germer Bâillière, Paris.
- Dibong, S. D., Mpondo, M. E., Ngoye, A., Kwin, M. F., Betti, J. L.** (2011). Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* 37, 2496 – 2507.
- Djenane, D., Gómez, D., Yangüela, J., Roncalés, P., & Ariño, A.** (2019). Olive Leaves Extract from Algerian Oleaster (*Olea europaea* var. *sylvestris*) on Microbiological Safety and Shelf-life Stability of Raw Halal Minced Beef during Display. *Foods*, 8(1), 10

- Djenane, D., Yangüela, J., Derriche, F., Bouarab, L., & Roncales, P.** (2012). Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature & Technology*, (7), 53-696.
- El Hadrami A, Koné D, & Lepoivre P.** (2005). Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to Black Leaf Streak Disease. *European Journal of Plant Pathology* 113, 241 – 254.
- Fleischer, T.C., Mensah, M. L. K., Mensah, A. Y., Komlaga, G., Gbedema, S. Y., & Skaltsa, H.** (2008). Antimicrobial activity of essential oils of *Xylopia aethiopica*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(4), 391-393.
- Fouché, J. G., Marquet, A., & Hambuckers, A.** (2000). Les plantes médicinales de la plante au médicament. In *Exposition temporaire du (Vol. 19)*.
- Garnaud C., Cornet M.** (2020). Membrane et paroi fongiques: des rôles clés dans la résistance aux antifongiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020(519), 50-58.
- Gaudy C., Buxeraud J., & Mereghetti L.** (2005). Antibiotiques (pharmacologie et thérapeutique). *Collection pharma*.
- Georges Becker.** (1984). *Plantes toxiques*, Paris, Gründ,p, 224 .
- Ghazghazi H., Aouadhi Ch., Hamrouni S., Mnif., W.** (2015). Antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of tunisian *Olea europaea ssp. oleaster* fruit pulp and its essential fatty acids. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 52-55.
- Ghedira K.,** 2008. -L'olivier. *Phytothérapie*, 6, 83-89.
- Gherib. A.** (2014). Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait d'*Olea europaea var.oleaster* et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques. Thèse en vue de l'obtention d'un diplôme de Doctorat en Biochimie Appliquée, Université BADJI MOKHTAR – ANNABA.
- Goudyer A.** (2000). *The greek herbal of Discorides, illustrated by Byzantine A.* Ed. IBIDIS Press, 35-145.
- Grumezescu A.** (2017). *Nutrient Deliveryn Anotechnology in the Agri-Food Industry.* Department of Science and Engineering of Oxide Materials and Nanomaterials, Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, University Politehnica of Bucharest, Bucharest, Romania, NikkiLevy.

- Guillard, F., Merens, A., Dortet, L., Janvier, F., Lebrun, C., Yin, N., ... & Héry-Arnaud, M.** (2019). Évaluation de la prévalence de la résistance aux antibiotiques chez les entérobactéries isolées de prélèvements urinaires dans les services d'urgence de France. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(4), S111-S112.
- Guinea, J.** (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 5-10.
- Guinoiseau, E.** (2011). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat soutenue le 6 Décembre 2010. Université de Corse-Pasquale Paoli, 149 pages.
- Guo-Xiang L, Zai-Qun L.** (2008) The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. *Food Chem Toxicol* 46, 886–92
- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., & Halla, N.** (2016). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 1-9.
- Hannachi, H., Elfalleh, W., & Marzouk, S.** (2013). Oil, protein, antioxidants and free radical scavenging activity of stone from wild olive trees (*Olea europaea L.*). *Pak. J. Pharm. Sci*, 26(3), 503-510.
- Hannachi, H., Elfalleh, W., Laajel, M., Ennajeh, I., Mechlouch, R. F., & Nagaz, K.** (2019). Chemical Profiles and Antioxidant Activities of Leaf, Pulp, and Stone of Cultivated and Wild Olive Trees (*Olea Europaea L.*). *International Journal of Fruit Science*, 1-21.
- Hannachi, H., Nasri, N., El falleh, W., Tlili, N., Ferchichi, A., Msallem, M.** (2013). Fattyacids, sterols, polyphenols, and chlorophylls of olive oils obtained from Tunisian wild olive trees (*Olea europaea l. var. sylvestris*). *Int. J. Food. Prop.* 16,1271–1283
- Hartmann, A., Schmid, M., Van Tuinen, D., & Berg, G.** (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, 321(1-2), 235-257.
- Himour, S., & Yahia, A.** (2018). Comportements biologique, physiologique, biochimique et l'activité biologique de quatre variétés d'olivier (*Olea europeae L.* dans l'Est Algérien, Doctoral dissertation, Université Elikhwa Mantora, Costantine.
- Hoekou, Y. P., Batawila, K., Gbogbo, K. A., Karou, D. S., Ameyapoh, Y., & Souza, C.** (2012). Evaluation des propriétés antimicrobiennes de quatre plantes de la flore togolaise

utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement des diarrhées infantiles. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 3089-3097.

Huang, C. L., & Sumpio, B. E. (2008). Olive oil, the mediterranean diet, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Surgeons*, 207(3), 407-416.

Jacques-Meunié D., (1982). *Le Maroc saharien des origines à 1670*, Klincksieck, Paris. Vol.2 ,990p .

Jacques-Meunié, D. (1982). *Le Maroc saharien des origines à 1670 (Vol. 2)*. Librairie Klincksieck.

Kailis,S.G. (2017).Olive In *Encyclopedia of Applied Plants Science*,(Elsevier),236-245.

Khattabi A.,Rhalem N.,Chabat A.,Skali S,Soulaymani-Bencheich R. (2010). Plante toxique .définition et classification.*Toxicologie Maroc*, 2, 3-4.

Krief, S. (2003). *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées*. Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.

Laroche L.H. (2001). *toxicologie générale* ,25.

Le Manuel Merck ; Brian J.Werth. (2018). *Revue générale des médicaments antibactériens*. PharmD, University of Washington School of Pharmacy.

Lewis S.L.,Dirksen S R.,Heitkemper M.M.,BucherL et Camera I.M.,(2011)*Soins infirmiers médecine chirurgie (8e éd.)*, Montréal, Chenelière éducation, vol.1, p. 307-530 ; vol. 2, p. 413-449.

Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews Drug discovery*, 12(5), 371-387.

Lippi, G., Plebani, M., Di Somma, S., & Cervellin, G. (2011). Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 48(3), 143-153.

Mannargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pognas, J., L.and Perrin, C. (2016). Hemolysis by surfactants.Areview.*Advances in colloid and interface science* 228, 1-16

Maria Bardoulat. (2013). *Pour en savoir plus, lire : « L'olivier, trésor de santé »*, Éditions Alpen.

- Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D., & Cornet, M.** (2014). Resistance of *Candida spp.* to antifungal drugs in the ICU: where are we now?. *Intensive care medicine*, 40(9), 1241-1255.
- Medina E., de Castro A., Romero C. and Brenes M.** (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 54, 4954-4961.
- Michèle Génestal, Claudine Cabot.** (2009). *Olivier Anglés. Principales intoxications aiguës, Centre Antipoison et de Toxicovigilance, CHU Purpan, Toulouse.*
- Mirad, B., & Badis, A.** (2019). Activité antioxydant et antibactérienne des extraits des feuilles d'olivier sauvages et cultivés, Mémoire de Master. Université de Bouira.
- Mohan C.** (2006) .Buffers. A guide for the preparation and use of bufferd in biological systems .EMD, San Diego, California, Calbiochem, 22.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G.** (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(10), 3939-3948.
- Montgomery C.A.** (1990). *Oncological and toxicological research, Alleviation and control of pain and distress in laboratory animals.*
- Mouas, Y., Benrebiha, F., & Chaouia, C.** (2017). Evaluation de l'activité antibacterienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du *romarin rosmarinus officinalis l.* *Revue Agrobiologia*, 7(1), 363-370.
- Moussouni Nadjah.** (2019). Evaluation de l'activité antiradicalaire des extraits des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europea sylvestris*), Mémoire de Master. Université de Tlemcen.
- Nahal Boudarba N, Kadi H, Moghtet S, Meddah B et Moussaoui A.** (2012). Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of *Olea Europaea* Leaves from Algeria. *The Open Conference Proccedings Journal*, 2012, 3, (Suppl 1-M11), 66-69.
- Najem, M., Belaidi, R., Harouak, H., Bouiamrine, E. H., Ibijbijen, J., & Nassiri, L.** (2018). Occurrence de plantes toxiques en phytothérapie traditionnelle dans la région du Moyen Atlas central Maroc. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 35(2), 5651-5673.
- Nardoni, S., Mugnaini, L., Papini, R., Fiaschi, M., & Mancianti, F.** (2013). Canine and feline dermatophytosis due to *Microsporum gypseum*, a retrospective study of clinical data and therapy outcome with griseofulvin. *Journal de mycologie médicale*, 23(3), 164-167.

- Obame C., Engonga E.** (2009). Etude Phytochimique, Activités Antimicrobiennes et Antioxydantes de quelques Plantes Aromatiques et Médicinales Africaines, Thèse unique, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé).** (2011) .Quality control methods for herbal materials, 43-44.
- Onzo, C. F., Azokpota, P., Dah-Nouvlessounon, D., Lehmane, T. H., Adjatin, A., & Baba Moussa, L.** (2015). Évaluation de l'activité antimicrobienne de quatre feuilles utilisées comme emballages dans l'artisanat agroalimentaire au Bénin. *Journal of Applied Biosciences*, 95, 9015-9027.
- Ouis, N.** (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alger).
- Owen R.W., Haubner R. & Wurtele G.** (2000). Olive-oil consumption and health . The possible role of antioxidants. *Lancet Oncology*, 1, 107–112. , 372.
- Pasini, E. M., Kirkegaard, M., Mortensen, P., Lutz, H. U., Thomas, A. W., & Mann, M.** (2006). In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood*, 108(3), 791-801.
- Polzonetti V., Egidi D., Vita A.** (2004). Involvement of oleuropein in digestive metabolic pathways. *Food Chemistry*. 88, 1-15.
- Rayan D., Robards K. & Lavee S.** (1998). Evaluation de la qualité de l'huile d'olive. *Olivae*, 72, 23-33.
- Rebbas, K., Bounar, R., Gharzouli, R., Ramdani, M., Djellouli, Y., Alatou, D.** (2012). Plantes d'intérêt médicinal et écologique dans la région d'Ouanougha (M'Sila, Algérie). *Phytothérapie* 10, 131-142.
- Robbins, N., Wright, G. D., & Cowen, L. E.** (2016). Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. *The Fungal Kingdom*, 903-922.
- Salama, Z. A., Aboul-Enein, A. M., Gaafar, A. A., Asker, M. S., Aly, H. F., & Ahmed, H. A.** (2020). In-vitro Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activities of Banana leaves (*Musa acuminata*) and Olive leaves (*Olea europaea L.*) as by-products. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(2), 687.

- Sarni-Manchado P, Cheynir V.** (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Editions Lavoisier, Paris, 398.
- SGHIR, A.** (2019). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles d'*Olea europaea sylvestris*. Mémoire de Master, Université de Tlemcen.
- Shin S, Lim S.** (2004). Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *J Appl Microbiol* 97,1289–96
- Small, E., & Catling, P. M.** (2000). Les cultures médicinales canadiennes. NRC Research Press.
- Sofowora A., Eyitope O., Adedeji O.** (2013). The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Diseases Prevention. *Afr J Tradit Complement Altem Med.* 10(5), 210-229
- Tatsadjieu, L. N., Ngang, J. E., Ngassoum, M. B., & Etoa, F. X.** (2003). Antibacterial and antifungal activity of *Xylopiya aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. *Fitoterapia*, 74(5), 469-472.
- Tayeb-Dermel S.** (2019). Recherche de l'effet inhibiteur des extraits des feuilles d'*Olea europea sylvestris* sur l'activité de l'alpha amylase in vitro, Mémoire de Master. Université de Tlemcen.
- Tejada, S., Pinya, S., del Mar Bibiloni, M., A Tur, J., Pons, A., & Sureda, A.** (2017). Cardioprotective effects of the polyphenol hydroxytyrosol from olive oil. *Current drug targets*, 18(13), 1477-1486.
- Thangara J.H.S., Adjei O., Allen B.W. et Portaels F.** (2000). In vitro activity of ciprofloxacin, Sparfloxacin, Ofloxacin, Amikacin and Rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45 (2), 231-233.
- Thomas, L.** (2002). Haemolysis as influence & interference factor. *Ejifcc*, 13(4), 95.
- World Health Organization** (2014). Antimicrobial resistance Global Report on surveillance; summary, 8 pages.
- Yano, Y., Satomi, M., Oikawa, H.** (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J. Food Microbiology*, 111, 6-11.
- Yawata, Y.** (2006). Cell membrane: the red blood cell as a model. John Wiley & Sons.

Zeriouh, W., Nani, A., Belarbi, M., Dumont, A., de Rosny, C., Aboura, I., ... & Apetoh, L. (2017). Phenolic extract from oleaster (*Olea europaea* var. *Sylvestris*) leaves reduces colon cancer growth and induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *PloS one*, 12(2).

Zhang, Y., Mandava, C. S., Cao, W., Li, X., Zhang, D., Li, N., ... & Lei, J. (2015). HflX is a ribosome-splitting factor rescuing stalled ribosomes under stress conditions. *Nature structural & molecular biology*, 22(11), 906.