

ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE DEUX VARIETES DE L'OLIVIER

O. Bouchenak¹, K. Yahiaoui¹, N. Benhabyles¹, R. Laoufi², Th. Afif Chaouche¹,
K. Arab¹

(1). Laboratoire Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques, Faculté des Sciences, Université M'hamed Bougara de Boumerdes.

(2). Laboratoire de Technologie Douce, Valorisation, Physico-chimie des Matériaux Biologiques et Biodiversité, Faculté des Sciences, Université M'hamed Bougara de Boumerdes.

Email of corresponding author: bouchenakouahida@gmail.com

Received: 5 June 2018

Accepted: 30 June 2018

Abstract

The resistance of microorganisms to antibiotics is a major problem for public health. The present work attempts to promote the integration of olive tree extracts into pathogen agent's control. The adopted methodology consists of a phytochemical screening for two varieties of olive: cultivated and wild, followed by an extraction and a characterization of the essential oils, tannins and flavonoids, and finally an evaluation of their antimicrobial was done. The results obtained revealed a richness of the two varieties in bioactive substances. Through physicochemical analysis, the vegetable oil of the cultivated olive tree has been of good quality and complies with International olive council standards. Finally, it is important to note that the bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*) and yeast (*Candida albicans*) tested were sensitive to extracts of both varieties. However, no inhibitory action was noted on the growth of the fungi tested (*Aspergillus niger*).

Keywords: olive tree, essential oils, tannins, flavonoids, phytochemical screening, antimicrobial activity.

Résumé

La résistance des microorganismes aux antibiotiques constitue un problème majeur pour la santé publique. Le présent travail tente de valoriser l'intégration des extraits de l'olivier dans la lutte antimicrobienne. La méthodologie adoptée consiste en un screening phytochimique pour deux variétés de l'olivier : cultivé et sauvage, suivi d'une extraction et d'une caractérisation des huiles essentielles, tanins et flavonoïdes, et enfin une évaluation de leur activité antimicrobienne a été réalisée. Les résultats obtenus ont révélés une richesse des deux variétés en substances bioactives. A travers l'analyse physicochimique, l'huile végétale de l'olivier cultivé s'est montrée de bonne qualité est conforme aux normes Conseil oléicole international. Enfin, il est important de signaler que les bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*) et les levures (*Candida albicans*) testées se sont montrées sensibles aux extraits des deux variétés. Cependant, aucune action inhibitrice n'a été notée sur la croissance des champignons testés (*Aspergillus niger*).

Mots clés: olivier, huiles essentielles, tanins, flavonoïdes, screening phytochimique, activité antimicrobienne.

INTRODUCTION

Les infections nosocomiales ou infections hospitalières sont devenues aujourd'hui un sujet d'actualité, et constituent un sérieux problème de santé publique. Cette situation semble se compliquer par l'émergence du phénomène de résistance aux antibiotiques. La détermination des effets biologiques des plantes médicinales est restée toujours l'objectif de plusieurs recherches scientifiques dans de nombreux pays. En Algérie, de nombreuses études tentent de mettre en valeur les effets thérapeutiques et antimicrobiens des plantes médicinales. Nous pouvons citer à titre d'exemple, le travail de Arab *et al.* (2013) [1] sur l'effet antioxydant et antidiabétique des polyphénols de l'olivier, celui de Arab *et al.* (2014) [2] sur le pouvoir antioxydant et antimicrobien des polyphénols et des huiles essentielles du pistachier lentisque, celui de Afif Chaouche *et al.* (2014) [3] sur l'effet antimicrobien de la bourrache officinale, et celui de Yahiaoui *et al.* (2018) [4] sur l'activité antimicrobienne des polyphénols du *Cumin*. D'autres études ont évalué les effets antimicrobiens de l'olivier dans la conservation des aliments [5 et 6]. Ce travail consiste à mettre en évidence les caractéristiques phytochimiques et le pouvoir antimicrobien des extraits de deux variétés de l'olivier.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Les feuilles et les fruits de l'olivier utilisées dans cette étude sont récoltées en février : à Béjaïa pour la variété cultivée et à Boumerdes pour la variété sauvage. Les feuilles récoltées sont séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 72 heures. Les feuilles séchées sont broyées par un broyeur à hélice de type Waring. La poudre obtenue permet d'extraire les tanins et les flavonoïdes. Les fruits servent à extraire l'huile végétale.

Souches microbienne

L'effet antimicrobien des extraits obtenus est évalué sur plusieurs microorganismes (Tab. 1).

Tableau 1. Microorganismes testés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Microorganismes	Gram	Provenance	Référence
<i>Escherichia coli</i>	-	IPA	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus (R)</i>	+	IPA	ATCC 43300
<i>Staphylococcus aureus (S)</i>	+	IPA	ATCC 25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	IPA	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	SAIDAL	ATCC 4352
<i>Candida albicans</i>	/	IPA	ATCC 24433
<i>Aspergillus niger</i>	/	CPMC Mustafa Bacha	AN12
<i>Salmonella typhi</i>	-	CPMC Mustafa Bacha	Sérotype OMB8-1,2

Légende: IPA: Institut Pasteur d'Alger; SAIDAL: un groupe pharmaceutique généraliste algérien

Screening phytochimique

Ce test est réalisé soit sur la poudre végétale, soit sur l'infusé à 20%. Les méthodes de caractérisation dérivent de celles décrites par Raaman (2006) [7] et Bruneton (1999) [8]. Il s'agit d'une analyse colorimétrique qui permet d'avoir une estimation qualitative de la

richesse des feuilles de l'olivier en substances primaires et secondaires. Les molécules recherchées sont les tanins totaux, catéchiques, galiques, les flavonoïdes, les anthocyanes, les sennosides, l'amidon, les quinones libres, les saponosides, les alcaloïdes, les glucosides, les mucilages, les irridioïdes et les coumarines.

Extraction et caractérisation des huiles végétales

Pour extraire les huiles végétales, nous avons opté pour la méthode classique artisanale comprenant quatre opérations principales : (opération réalisée au niveau d'une huilerie)

- Nettoyage des fruits (défoliation, lavage des olives) ;
- Préparation de la pâte (broyage, malaxage) ;
- Séparation de la phase solide (grignons) et liquide (l'huile et l'eau de végétation) ;
- Séparation de la phase liquide (huile et l'eau de végétation).

La séparation des grignons du mélange huile/eaux de végétation fait appel à des systèmes de pression, de centrifugation et de percolation.

Avant d'entamer les tests antimicrobiens, l'huile végétale est caractérisée point de vue organoleptique (aspect, couleur et odeur), et physicochimique indiqués par l'association française de normalisation AFNOR (1981) [9] (indice de réfraction, d'acide, d'ester, et de saponification).

Extraction et dosage des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée, à partir de 80g de poudre végétale, selon la méthode décrite par Bruneton (1999) [8]. Elle est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques. La méthode consiste à solubiliser les flavonoïdes dans du méthanol, puis séparer les différentes fractions par des lavages successifs en utilisant comme solvants l'éther de pétrole, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le butanol. L'extrait butanolique obtenu renferme les flavonoïdes les plus polaires.

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium donnée par Ayoola (2008) [10], en utilisant un spectrophotomètre (Optizen 2120 UV) à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est calculée grâce à une gamme d'étalonnage établi en utilisant la quercétine (1-25 g/mL). Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents de quercétine pour un gramme d'extrait.

Extraction et dosage des tanins

Le protocole opératoire adopté pour extraire les tanins, à partir de 60g de poudre végétale, est fourni par le laboratoire des substances naturelles du centre de recherche et du développement (CRD) de SAIDAL. Il renferme plusieurs lavages permettant le fractionnement et la récupération des tanins. Les solvants utilisés sont le chloroforme et le benzène pour éliminer les lipides, l'éther diéthylique pour éliminer les polyphénols, les catéchines et l'acide oxybutyrique, l'acétate d'éthyle pour éliminer les proanthocyanes et les leuco-anthocyanes, et enfin les tanins sont récupérés par l'alcool méthylique.

Le dosage des tanins totaux est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin, en présence de tanins pour donner une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 760 nm [11].

Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits (huile végétale, flavonoïdes et tanins) a été étudiée, selon la recommandation de la société française de microbiologie et NCCLS (2006) [12]. Ainsi, les plaques de gélose Mueller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons ont été inoculées par écouvillonnage d'une suspension microbienne standardisée (0,5 Mc Farland). Ensuite, des disques de 6 mm de diamètre, imprégnés de 10 µL d'extrait ont été déposés à la surface des milieux de culture préalablement ensemencés. Après incubation à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 28 °C pendant 48 h pour les souches fongiques, l'activité antimicrobienne des trois extraits est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque test.

RESULTATS ET DISCUSSION

Screening phytochimique

Le screening phytochimique nous a renseignés sur les familles chimiques des métabolites primaires et secondaires, ce qui va nous permettre de choisir des substances bioactives à extraire. L'ensemble des résultats obtenus sont résumé dans le tableau suivant :

Tableau 2. Screening phytochimique préliminaire de l'olivier cultivé et sauvage

Substances	Résultat positif	Olivier cultivé	Olivier sauvage
Tanins totaux	Bleu noir	+++	+++
Tanins catéchiques	Rouge	+/-	+/-
Tanins galliques	Bleu foncé	+++	+++
Flavonoïdes	Rouge orangé	+++	+++
Anthocyanes	Rouge	-	-
Leuco-anthocyanes	Rouge	-	-
Senosides	Violet-rouge	+++	++
Amidon	Bleu violet	-	-
Quinones libres	Rouge	++	+
Alcaloïdes	Précipité rouge	+++	+++
Glucosides	Rouge brique	+++	+++
Mucilages	Précipité	-	-
Irridoïdes	Bleu	+++	++
Coumarines	Trouble	+++	++

(-) : absence de substances, (+/-) : très faible teneur en substances, (+) : faible teneur en substances, (++) : moyenne teneur en substances, (+++) : forte teneur en substances.

La poudre des feuilles de l'olivier cultivé s'est montrée riche en composés bioactifs en particulier les tanins, irridioïdes, alcaloïdes, glucosides et flavonoïdes. Cependant, celle de l'oléastre est moyennement riche en irridioïdes. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés dans de nombreuses études. Nous pouvons citer ceux de Martin-Garcia et al. (2003) [13], Corea et al. (2004) [14], Ranalli et al. (2006) [15] et Benhabyles (2016) [16] qui confirment la richesse de l'olivier en flavonoïdes, tanins et irridioïdes. De plus, Pinkas et al. (1986) [17] ont affirmé que les feuilles de cette plante

contient des glucosides. Par ailleurs, Tessier *et al.* (1994) [18] a signalé la présence d'alkaloïdes (cinchonine et cinchonidine), et de flavonoïdes (lutéoline, l'olivine et α -tocophérol). Enfin, Owen *et al.* (2000) [19] ont noté une richesse en sécoiridoïdes (l'oleuropéine et le ligstroïden), et en molécules plus complexes comme les lignanes et l'apigénine.

Caractérisation physicochimique de l'huile végétale

Les valeurs des indices physicochimiques de l'huile végétale de l'olivier cultivé et sauvage sont notées sur le tableau 3. Le degré d'acidité est lié à la fraîcheur, l'état sanitaire des olives broyées, les conditions de stockage et le degré de maturité des fruits.

Tableau 3. Valeurs des indices physicochimiques de l'huile végétale de l'olivier cultivé et sauvage

Indices	Cultivé	oléastre	Normes	Source
I.Réf	1,4682	1,4472	1,4677-1,4705	FAO-OMS
I.A (mg)	1,68	29,17	H.O extra vierge $\leq 1,0$ H.O vierge $\leq 2,0$	C.O.I (2001)
A (%)	0,84	14,585	H.O courante $\leq 3,3$ H.O lampante $> 3,3$	
I.E (mg KOH)	193,36	155,85	/	
I.S (mg)	195,04	185,02	184-196	

Nos résultats restent néanmoins dans les normes fixées par COI (2015) [20]. Ainsi, l'huile végétale issue de la variété cultivée est classée dans la catégorie de l'huile d'olive extra vierge ($A = 0,84\% < 1$). Celle issue de la variété sauvage est qualifiée de lampante ($A = 14,585\% > 3,3$).

Selon COI (2015) [20], l'huile d'olive extra vierge est constituée de jus de fruit pur avec absence de défauts organoleptique. L'huile d'olive lampante comporte un taux de défauts organoleptiques supérieur à 6 sur 10, ce qui explique l'acidité élevée trouvée. Selon Nacer-Bey (2003) [21], le taux élevé d'acide gras libre dans une huile peut provenir d'une hydrolyse ou d'une oxydation des esters par des actions enzymatiques. Ces réactions aboutissent à la libération d'acides pouvant affecter l'aspect qualitatif de l'huile.

Par ailleurs, l'indice d'ester et de saponification sont en accord avec les normes de COI (2015) [20]. Le premier nous renseigne sur la richesse de l'huile d'olive cultivé en acide gras liés, soit 193,36 mg de KOH /g de CG. Le second nous permet d'avoir une idée sur la longueur de la chaîne des acides gras constituant les triglycérides. D'après les résultats obtenus, la valeur la plus élevée revient à l'huile végétale de l'olivier cultivé ($IS = 195,04$ mg de KOH/g de CG). Enfin, l'indice de réfraction n'a fait que confirmer la bonne qualité de l'huile végétale de la variété cultivé. La valeur obtenue est 1,4682 contre 1,4472 pour la variété sauvage.

Extraction et dosage des flavonoïdes

Les résultats du rendement des différentes fractions flavonoïques de la poudre des feuilles des deux variétés d'olivier indiquent une grande richesse en hétérosides. De plus, les monosides sont largement produits par l'olivier cultivé et sauvage avec 3,73 % et 8,02 % respectivement (Tab. 4). Les données révèlent aussi que l'olivier sauvage est plus riche en fractions flavonoïques.

Le rendement d'extraction obtenu dépend de l'origine géographique de la plante et les conditions dans lesquelles l'extraction a été réalisée. En effet, Su *et al.* (2006) [22] signalent l'influence de plusieurs facteurs à savoir le temps, la température et le solvant utilisé sur le rendement d'extraction. La méthode adoptée a permis d'extraire les flavonoïdes, tout en évitant leur dénaturation ou leur modification due aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Extraction et dosage des tanins

Le rendement en tanins obtenu des feuilles de l'olivier cultivé est de 22,71 % avec une concentration de $25,56 \pm 2,41$ mg EAT/g d'extrait. Celui de l'olivier sauvage est de 17,91 % avec une concentration de $18,63 \pm 2,41$ mg EAT/g d'extrait.

Tableau 4. Rendement et concentration des flavonoïdes pour 30g de poudre végétale

Variétés	Fractions	Rendement (%)	Concentration (mg EQ/ gE)
Cultivé	Aglycones (génines libres)	0,48	$35,12 \pm 4,7$
	Hétérosides (Monosides)	3,73	$90,47 \pm 3,9$
	Hétérosides (Biosides)	1,54	$50,95 \pm 2,1$
Sauvage	Aglycones (génines libres)	3,52	$84,72 \pm 4,2$
	Hétérosides (Monosides)	8,02	$120,02 \pm 3,9$
	Hétérosides (Biosides)	4,39	$95,44 \pm 1,6$

mg EQ/ gE : mg équivalent de la quercétine par gramme d'extrait. Les valeurs représentent la moyenne \pm E.S.M (moyenne de 3 essais).

Activité antimicrobienne

Les valeurs des diamètres de la zone d'inhibition (d) de l'huile végétale testée sur plusieurs souches microbiennes de références et de cas cliniques sont notées sur le tableau suivant :

Tableau 5. Effet de l'huile végétale de l'olivier cultivé et sauvage sur les différentes souches microbiennes testées

Souches	Olivier cultivé	Olivier sauvage
<i>S. aureus S</i>	$12,11 \pm 0,33$	$12,52 \pm 0,43$
<i>S. aureus R</i>	$13,38 \pm 0,27$	$12,70 \pm 0,50$
<i>P. aeruginosa</i>	$12,70 \pm 0,36$	$11,75 \pm 0,74$
<i>K. pneumoniae</i>	$15,64 \pm 0,19$	$12,73 \pm 0,55$
<i>E. coli</i>	$13,29 \pm 0,21$	$12,43 \pm 0,71$
<i>S. typhi</i>	R	R
<i>C. albicans</i>	$13,63 \pm 0,13$	$12,76 \pm 0,70$
<i>A. niger</i>	Résistante	Résistante

Les résultats du test antimicrobien des fractions flavonoïques appliquées sur les souches microbiennes testées sont mentionnés sur le tableau 6.

Concernant l'effet antimicrobien des tanins, il ressort des résultats obtenus que *A. niger* est la seule souche ayant montrée une résistance aux tanins des deux variétés de l'olivier (Tab. 7).

L'analyse et l'interprétation des résultats a fait ressortir une certaine activité antimicrobienne de l'olivier en particulier la variété cultivé. Par ailleurs, l'huile végétale des deux variétés présente un effet antimicrobien, plus au moins similaire sur l'ensemble des souches bactériennes testées, excepté *Salmonella typhi* qui s'est montrée résistante. Cette dernière souche, résistante aux huiles végétales et aux flavonoïdes, s'est révélée sensible aux tanins, avec un diamètre d'inhibition de $13,54 \pm 0,30$ mm pour le cultivé et $11,03 \pm 0,22$ mm pour le sauvage. Ainsi, l'effet antimicrobien constaté est : huile végétale > flavonoïdes > tanins. Enfin, il est à signaler qu'aucun effet inhibiteur de la croissance d'*Aspergillus niger* n'a été constaté pour l'ensemble des extraits testés.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Tranter et al. (1993) [23], Kubo et al. (1995) [24], Aziz et al. (1998) [25] et Bisignano et al. [26] qui ont noté l'effet antimicrobien des polyphénols et des huiles végétales de l'olivier sur des bactéries considérés comme des agents causals d'infections du système gastro-intestinal ou respiratoire de l'homme, en retardant ou en empêchant leur croissance. Ces auteurs ont étudiés particulièrement *S. typhi*, *S. aureus* S et R, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*. Concernant les levures, Morton (2005) [27] a obtenu des résultats similaires. En effet, cet auteur a révélé un pouvoir inhibiteur de la croissance de *C. albicans*.

D'une manière générale, les polyphénols agissent soit par la privation des ions métalliques tels que le fer, soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes de croissances [28, 29].

Tableau 6. Effet antimicrobien des fractions flavonoïques de l'olivier cultivé et sauvage

Souches	Olivier cultivé			Olivier sauvage		
	Génines libres	Monosides	Biosides	Génines libres	Monosides	Biosides
<i>S. aureus</i> S	$13,76 \pm 0,25$	$11,86 \pm 0,54$	$17,12 \pm 0,34$	R	R	R
<i>S. aureus</i> R	R	$18,08 \pm 0,52$	$12,96 \pm 0,12$	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i>	R	$12,09 \pm 0,26$	$12,69 \pm 0,35$	R	R	$10,56 \pm 0,13$
<i>K. pneumoniae</i>	$11,20 \pm 0,19$	$11,54 \pm 0,24$	$13,93 \pm 0,17$	R	R	$12,52 \pm 0,26$
<i>E. coli</i>	R	$11,71 \pm 0,74$	$14,00 \pm 0,24$	R	R	$13,16 \pm 0,39$
<i>S. typhi</i>	R	R	R	R	R	R
<i>C. albicans</i>	R	$16,79 \pm 0,77$	$11,15 \pm 0,17$	R	R	R
<i>A. niger</i>	R	R	R	R	R	R

R: Résistante

Tableau 7. Effet antimicrobien des tanins de l'olivier cultivé et sauvage

Souches	Olivier cultivé	Olivier sauvage
<i>S. aureus</i> S	$15,20 \pm 0,59$	$12,86 \pm 0,34$
<i>S. aureus</i> R	$14,90 \pm 0,19$	$14,61 \pm 0,68$
<i>P. aeruginosa</i>	$11,25 \pm 0,44$	$11,75 \pm 0,74$
<i>K. pneumoniae</i>	$11,86 \pm 0,30$	$11,78 \pm 0,09$
<i>E. coli</i>	$12,32 \pm 0,33$	$12,10 \pm 0,52$
<i>S. typhi</i>	$13,54 \pm 0,30$	$11,03 \pm 0,22$
<i>C. albicans</i>	$11,02 \pm 0,19$	$10,73 \pm 0,18$
<i>A. niger</i>	Résistante	Résistante

CONCLUSION

Les substances bioactives extraites des feuilles et des fruits de l'olivier ont montré une certaine activité antimicrobienne. L'olivier est donc une source potentielle d'agents antimicrobiens prometteurs pour le traitement de diverses infections. Les résultats obtenus dans cette étude sont d'une grande importance, et peuvent contribuer à renforcer et à enrichir le pauvre arsenal antibiotique qui existe à ce jour.

REFERENCES

- [1]. K. Arab, O. Bouchenak et K. Yahiaoui- 2013. Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. *Afrique Science*. 09(3), 159-166.
- [2]. K. Arab, O. Bouchenak et K. Yahiaoui- 2014. Étude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). *J. Fund. App. Sci.* 6(1), 79-93.
- [3]. Th. Afif Chaouche, K. Arab et M. Bendahou -2014. Phytochemical screening of Algerian *Borago officinalis* L. and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities against respiratory pathogens. *International Journal of Phytomedicine*. 6, 369-376.
- [4]. K. Yahiaoui, O. Bouchenak, S. Lefkir, N. Benhabyles, R. Laoufi et K. Arab- 2018. Antibacterial activity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) and cloves (*Syzygium aromaticum*) essential oils, and their application to the preservation of minced meat. *J. Fund. App. Sci.* 10(5S), 100-117.
- [5] D. Djenane, J. Yangüela, F. Derriche, L. Bouarab, P. Roncales -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*: 10–18 © Springer-Verlag France 2011 DOI 10.1007/s10298-011-0665-y.
- [6] N. Kouddane, I. Bekkouch, Ea. Daroui, A. Boukroute et A. Berrichi- 2012. Essais de transplantation du Caroubier (*Ceratonia siliqua*) du Bigaradier (*Citrus aurantium*) et du Brachychiton (*Brachychiton populneum*) dans la ville d'Oujda. *Revue Nature & Technologie*. 07, 74 -80.
- [7]. N. Raaman- 2006. *Phytochemical techniques*. New Delhi, New India: Publishing Agency, 306p.
- [8]. J. Bruneton- 1999. *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*. Éd. Tec & Doc, Paris, 575p.
- [9]. AFNOR- 1981. *Recueil des normes françaises. Graine oléagineuse, produits dérivés*, Paris, 438p.
- [10]. G. Ayoola, SS. Ipav, MO. Solidiya, AA. Adepoju-Bello, HAB. Coker et TO. Odugbemi- 2008. "Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* olive (Guttiferae). *International Journal of Health Research*. 1, 81-93.
- [11] H. Zhang, L. Wang, S. Derolles, R. Bennett et K. Davies- 2006. New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology*. 6, 29- 43.
- [12]. NCCLS- 2006. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. 7th edition. Wayne, Pennsylvania: Approved Standard M7-A7.

- [13]. A-L. Martin-Garcia, A. Moumen, D-R. Yanez Ruiz et E. Molina Alcaide- 2003. Chemical composition and nutriment availability for goats and sheep of two stage olive cake and olive leaves. *Anim. Feed Sci. Tech.* 107, 61-74.
- [14]. G. Corea, M. Iorizzi, V. Lanzotti, M. Cammareri, C. Conicella, C. Laezza et M. Bifulco- 2004. Astersedifolioside A-C, three new oleane-type saponins with antiproliferative activity. *Bioorganic and medicinal chemistry.* 12(18), 4909-4915.
- [15]. A. Ranalli, S. Contento, L. Luceral, M. Difebo, D-R. Archgiant et V. Fonzo- 2006. Factor affecting the content of irridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *J. Agri. Food Chem.* 54, 438-448.
- [16]. N. Benhabyles- 2016. Analyse biochimique et évaluation de l'effet de l'extrait des feuilles d'Olivier sur le diabète expérimental à l'alloxane chez le rat blanc. Thèse de doctorat troisième cycle en sciences biologiques, USTHB, 197p.
- [17]. M. Pinkas, L. Bezanger et B-M. Tork- 1986. Les plantes dans la thérapeutique moderne. Ed. Maloine, Paris, 455p.
- [18]. A. Tessier- 1994. Phytothérapie analytique, phytochimie et pharmacologie. Ed. Marc-Aurèle, 310p.
- [19]. RW. Owen, W. Mier, A. Giacosa, WF. Hull, B. Spieglhalder et H. Bartsch- 2000. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.* 38, 647-659.
- [20]. COI- 2015. Norme commerciale applicable aux huiles d'olives et aux huiles de grignons d'olives. Conseil Oléicole International, 17p.
- [21]. N. Nacer-Bey- 2003. Etude des huiles essentielles (essences végétales) de quelques plantes algériennes : caractérisation chimique et valorisation agronomique. Mémoire de Magister en sciences agronomiques, I.N.A., El Harrach, 129p.
- [22]. X. Su, J. Duan, Y. Jian, J. Shi et Y. Kakuda- 2006. Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis.* 19, 348- 353.
- [23]. H-S. Tranter, SC. Tassar et G-J. Nychas- 1993. Effet du composant phénolique extrait à partir des olives, oleuropéine, sur la croissance et la production d'entérotoxines β de *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* 74(3), 253-259.
- [24]. A. Kubo, CS. Lunde et L. Kubo- 1995. Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1629-1633.
- [25]. N-H. Aziz, S-E. Farag, L-A. Moussa et M-A. Abo-Zaid- 1998. Effet antibactérien et antifongique comparatives de certains composants phénoliques. *Microbios.* 93(347), 43-54.
- [26]. G. Bisignano, A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Grisafi, N. Uccella et A. Saija- 1999. Activité antimicrobienne *in vitro* de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 51(8), 971-974.
- [27]. W. Morton- 2005. L'extrait de feuilles d'olivier (un antibiotique naturel pour renforcer le système immunitaire). Ed. Médecis Entrelacs, 198p.
- [28]. A. Scalbert- 1991. Antimicrobial properties of tanins. *Phytochem.* 12, 3875-3883.
- [29]. M-M. Cowan- 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12(4), 564-582.