
Soumis le : 28 Mars 2011
 Forme révisée acceptée le : 09 Janvier 2012
 Email de l'auteur correspondant :
 djenane5@yahoo.fr

Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde

Djamal DJENANE¹, Javier YANGÜELA², Fariza DERRICHE¹, Lydia BOUARAB¹, Pedro RONCALES²

¹Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Département de Biochimie et de Microbiologie. Université Mouloud Mammeri. BP 17, 15000-Tizi-Ouzou, Algérie.

²Faculté Vétérinaire. Département de Production Animale et Science des Aliments. Université de Zaragoza. C/Miguel Servet, 177, 50013-Zaragoza. Espagne

Résumé

Des extraits de feuilles d'olivier de la variété *azerradj* sont préparés et l'effet antimicrobien de ces composés est déterminé par la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis de trois souches bactériennes: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella enterica* sérotype Enteritidis (*S. Enteritidis*) et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Ces composés se sont révélés très actifs contre l'ensemble des bactéries testées. Cependant, une forte activité de l'extrait polyphénolique vis-à-vis de *S. aureus* (diamètre d'inhibition=30,18 mm) est enregistrée. L'activité antimicrobienne de ces extraits est confirmée par la méthode de microdilution (Concentrations Minimales Inhibitrices: CMI). Les mêmes extraits sont additionnés à des escalopes fraîches de dinde qui sont expérimentalement inoculées avec les mêmes bactéries cibles à une charge initiale de 2×10^5 ufc/g. Tous les échantillons de viande sont stockés à l'air libre à 8 ± 2 °C pendant 7 jours en simulant les conditions pratiques réelles en Algérie. Les résultats obtenus ont montré que les extraits de feuilles d'olivier appliqués sur la viande ont exercé une remarquable activité antimicrobienne durant toute la phase de stockage du produit. L'analyse sensorielle a révélé aussi que l'ajout de ces extraits sur la viande n'affecte pas négativement l'odeur de cette dernière. Les résultats obtenus sont très encourageants et ouvrent une voie prometteuse pour l'utilisation des feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens naturels pour la préservation des viandes.

Mots clés : Feuilles olivier, Extrait brut, Pathogènes, CMI, Activité antibactérienne, Dinde

Abstract

In this study, an aqueous crude extract and oleuropein were obtained from the leaves of the "azerradj" variety of olive tree. The antimicrobial effect of these compounds has been determined via the diffusion method on agar, against three common pathogenic bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis and *Pseudomonas aeruginosa*. These compounds have proven to be very active against all of the bacteria tested. However, oleuropein has demonstrated a much greater activity against *Staphylococcus aureus* (inhibition diameter = 30.18 mm). The antimicrobial activity of these two compounds was confirmed by the microdilution method (Minimum Inhibitory Concentrations: MICs). The same compounds have been added to fresh turkey escalopes that have been experimentally inoculated with the same target bacteria, at an initial load of approximately 2×10^5 cfu/g. All samples of meat were stored in the open air at 8 ± 2 °C for 7 days, simulating the real-life storage conditions in Algeria. The results demonstrated that the two compounds exhibited remarkable antimicrobial activity throughout the whole storage phase. However, oleuropein showed bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*. Sensory analysis revealed that the smell of the meat with these compounds added remained acceptable at the threshold antimicrobial concentration used. The results obtained are very encouraging and it can be suggested that the leaves from the olive tree contain compounds that have significant antimicrobial properties, which can be applied to use in the meat industry. Thus, we have proposed that the leaves of the olive tree can be exploited in order to control pathogenic bacteria in fresh turkey meat.

Keywords : Olive tree leaves, Crude extract, Oleuropein, Pathogens, MICs, Antimicrobial activity, Turkey

1. Introduction

L'olivier (*Olea europaea* L.) est une espèce largement cultivée dans le bassin méditerranéen depuis la plus haute antiquité. L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Par ailleurs, les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles qui font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches scientifiques. En effet, l'utilisation des feuilles d'olivier en phytothérapie remonte à très loin dans l'histoire. L'olivier est considéré donc comme étant une plante aromatique et médicinale, réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques. Certains composés identifiés dans les extraits de feuilles, tels que les composés phénoliques sont doués d'activités biologiques extrêmement importantes [5]. Les recherches réalisées "in vitro" par plusieurs auteurs [7] [32] ont démontré que les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes, ayant des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis de nombreux microorganismes. L'oleuropéine des feuilles d'olivier est le principal composé antimicrobien. Il présente une activité antimicrobienne supérieure par rapport à d'autres substances testées [5] [32]. Malgré l'existence de plusieurs travaux réalisés "in vitro" sur l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles d'olivier et leurs composés, le nombre de travaux publiés concernant une application des ces composés sur des aliments reste négligeable [9].

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'olivier appliqués sur la viande de dinde stockée à $8 \pm 2^\circ\text{C}$.

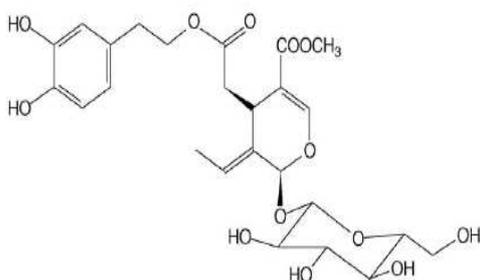


Figure 1. Structure chimique de l'oleuropéine, composé majeur de l'extrait de feuille d'olivier [9]

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Des feuilles fraîches d'olivier *azerradj*, variété cultivée en Algérie et en particulier dans la région de Tizi-Ouzou sont cueillies en pleine période de floraison (Mars-Avril 2010) dans la région de Boghni (Tizi-Ouzou) à une altitude de 400 m du niveau de la mer. La collecte des feuilles était effectuée le matin, juste après évaporation de la rosée. Après récolte, les feuilles étaient transportées au laboratoire puis intensément nettoyées avec de l'eau distillée à 20°C , égouttées à l'aide d'un tamis et séchées à température ambiante à l'air libre et à l'abri de la lumière.

2.2. Extrait brut des feuilles d'olivier

Les feuilles sont broyées dans un mixeur (Blender 8011E, Model 38 BL 41). 100 g de broyat sont additionnés à 900 ml d'eau chaude (45°C) de façon à obtenir une concentration de 10% (p/v). L'infusion est laissée reposer pendant 24 h à l'obscurité et à température ambiante. Après agitation à l'aide d'un agitateur magnétique, deux filtrations successives sont effectuées sur papier Wattman n°1. Une solution aqueuse d'extrait brut est donc obtenue. Celle-ci est conservée en réfrigération dans un flacon hermétique à l'abri de la lumière et de l' O_2 .

2.3. Extrait des Polyphénols

L'extraction des polyphénols est réalisée selon la méthode d'Akowuah et ses collaborateurs [1]. La première étape d'extraction est celle décrite précédemment pour l'obtention d'un extrait brut de feuilles d'olivier sur laquelle une deuxième étape d'extraction est appliquée pour l'obtention d'un extrait polyphénolique. Pour cela, une phase de dépigmentation est réalisée pour éliminer les traces de pigments. La solution dépigmentée obtenue est purifiée. Les traces d' H_2O et des solvants utilisés durant les différentes étapes sont éliminés respectivement à l'aide de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) et par évaporation sous vide à 30°C . L'extrait phénolique ainsi obtenu est conservé dans les mêmes conditions décrites précédemment pour l'extrait brut.

2.4. Activité Antibactérienne

2.4.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches *S. enterica* sérotype Enteritidis, *P. aeruginosa* (Gram négative) et *S. aureus* (Gram positive) sont utilisées dans cette étude. Les souches à Gram

négative sont d'origine clinique (isolées et identifiées par le Service de Bactériologie, CHU Mohamed Nadir de Tizi-Ouzou), par contre *S. aureus* est d'origine alimentaire (isolée et identifiée par le Centre Vétérinaire Régional de Draâ Ben Khedda Tizi-Ouzou). Toutes ces souches bactériennes sont identifiées et confirmées à l'origine selon des méthodes normalisées (ISO). ISO 6888-2 pour *S. aureus*, ISO 16266 pour *P. aeruginosa* et ISO 6579-2002 pour *S. Enteritidis*.

Les souches bactériennes sont cultivées pendant 12 h à 37 °C dans un milieu gélosé Mueller Hinton (MHA, Oxoid, Basingstoke, UK). Deux ensemencements successifs sont réalisés pendant 24 h à 37±1°C dans des tubes contenant 9 ml de Bouillon Infusion Cœur-Cerveille (BHIB; Oxoid, Basingstoke, UK). Après 24 h, 100 µl de la suspension bactérienne sont ensemencés dans un bouillon BHI puis incubés à 37±1 °C pendant 12 heures pour obtenir une suspension bactérienne fraîche contenant approximativement une concentration de 2-3×10⁵ ufc/ml, déterminée à l'aide de la mesure de transmittance à 600 nm (Spectro-photomètre Spectronic 20 Bausch & Lomb). Les souches étaient conservées dans un milieu cryoprotecteur à - 80°C. Plusieurs revivifications sont réalisées avant chaque test.

2.4.2. Test de diffusion sur gélose

L'évaluation de l'activité antibactérienne des composés de feuilles d'olivier est déterminée par la technique de diffusion sur gélose décrite par Djenane et ses collaborateurs et Hazzit et ses collaborateurs [13] [17]. Des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu gélosé Mueller Hinton en surfusion étaient placées dans une hôte à flux laminaire vertical à une température de 25 °C/30 minutes jusqu'à solidification du milieu. 0,1 ml de la solution standardisée d'inoculum (2-3×10⁵ ufc/ml) est versé dans chaque boîte puis uniformément réparti. Toutes les boîtes sont laissées sécher pendant 5 minutes. Des disques stériles en papier (6 mm de diamètre, Filter LAB ANOIA, Barcelona, Espagne) sont imprégnés respectivement avec 5 µl de des deux extraits à l'aide d'une micropipette capillaire (Finnpipette®, Thermo Fischer Scientific Inc.). Les boîtes de Pétri étaient maintenues pendant 15 min à une température de 25 °C puis incubées à 37 °C/24h. L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure à l'aide d'un pied à coulisse (Wiha dialMax® ESD-Uhrmessschieber, CH) des diamètres des zones d'inhibition (mm) formées autour des disques. La sensibilité des bactéries cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition [27]: Ø<8 mm: bactérie non sensible; 9<Ø<14 mm: bactérie sensible; 15<Ø<19 mm: bactérie très sensible et Ø>20 mm: bactérie extrêmement sensible. Un traitement avec l'eau est utilisé comme témoin négatif. Un antibiotique de référence, le chloramphénicol (10 µg/disque), est utilisé comme témoin positif. Chaque essai est répété trois fois.

2.4.3. Concentration minimale inhibitrice: test de microdilution

Les CMI sont aussi déterminées vis-à-vis des bactéries cibles. L'inoculum de chaque bactérie testée est obtenu à partir d'une préculture de 12 h d'incubation, la charge microbienne était ajustée à 5×10³ ufc/ml à l'aide d'une turbidité standard 0,5 McFarland. Des dilutions ½ en série sont préparées dans une gamme de concentration de 32 à 0,3125 µl/ml dans des tubes à essai stériles contenant de bouillon MH. Les CMI des différents composés vis-à-vis des souches bactériennes sont déterminées par la méthode de microdilutions en puits. Des plaques contenant 96 puits (Iwaki brand, Asahi Techno Glass, Japan) sont préparées en distribuant dans chaque puits 95 µl de bouillon MH et 5 µl d'inoculum. 100 µl de chaque solution d'extrait préparé préalablement à des concentrations de 32-0,3125 µl/ml sont versés dans les premiers puits de chaque plaque. 100 µl de chaque dilution en séries sont transférés dans les puits successifs. Les derniers puits contenant uniquement 195 µl de bouillon MH et 5 µl d'inoculum étaient utilisés comme témoins négatifs. Le volume final de chaque puit était de 200 µl.

Le chloramphénicol, un antibiotique standard, est utilisé comme témoin positif. Des concentrations de 32 - 0,3125 µl/ml sont préparées dans le bouillon MH. La même démarche citée ci dessus est adoptée. Tous les contenus des puits sont homogénéisés (300 rpm/20s). Les plaques sont incubées sous agitation à 37°C/18-24h. Après incubation, tous les puits sont examinés et la CMI (%: v/v) est déterminée en prenant en compte la plus faible concentration en extrait qui inhibe tout développement bactérien (absence de turbidité). L'H₂O distillée stérile est utilisée comme témoin négatif. Chaque test est répété deux fois.

2.5. Application des extraits de feuilles d'olivier sur la viande de dinde

2.5.1. Préparation de la viande

Des escalopes de dinde (*Pectoralis major*: pH initial 5,7; 24 h *post-mortem*) sont achetées chez un boucher local dans la ville de Tizi-Ouzou (Algérie) puis transportées dans une enceinte réfrigérée (3±1°C) au Laboratoire Régional Vétérinaire de Draâ Ben Khedda (Tizi-Ouzou) dans les 30 mn qui ont suivi l'achat.

2.5.2. Inoculation de la viande par des souches bactériennes

Avant inoculation avec les différentes souches bactériennes et l'addition des différents extraits de feuilles d'olivier, les escalopes sont aussi préalablement analysées pour déterminer une éventuelle présence de bactéries

testées ainsi que la détermination de la charge bactérienne initiale (flore aérobie totale) (résultats non présentés).

Pour évaluer l'effet antimicrobien des différents composés de feuilles d'olivier, plusieurs escalopes de dinde sont préparées selon les bonnes pratiques de manipulation. Au total, 54 escalopes sont préparées (2 escalopes/échantillon). Les escalopes du premier groupe ($18 \times 50 \pm 5$ g) étaient placées dans des sachets stériles individuels Stomacher, puis inoculées avec *S. aureus* (5×10^3 ufc/g). Le deuxième et le troisième groupe $2 \times (18 \times 50 \pm 5$ g) d'échantillons d'escalopes sont préparées de la même manière, puis inoculées respectivement avec *P. aeruginosa* et *S. Enteritidis* (5×10^3 ufc/g). Tous les échantillons inoculés étaient soigneusement homogénéisés pour assurer une bonne distribution de la charge bactérienne à travers toute la surface. Six (06) échantillons de chaque groupe sont additionnés d'extrait brut de feuilles d'olivier, les 06 autres échantillons sont additionnés d'extrait polyphénolique et enfin les 06 derniers échantillons de chaque groupe sont traités avec l' H_2O distillée stérile (témoins). Les échantillons ayant reçus ces différents traitements étaient placés dans des barquettes en polystyrène puis recouverts avec des sachets en plastique (polyéthylène/polyamide; Sidlaw Packaging-Soplaril, Barcelona, Espagne). Les échantillons de viande étaient stockés à l'air libre et à l'obscurité pendant 7 jours à 8 ± 2 °C, simulant les mêmes conditions pratiques appliquées en Algérie.

Les analyses microbiologiques sont réalisées pour un intervalle de 3 jours sur une durée de stockage de 7 jours.

2.6. pH-métrie

Le pH de la viande est mesuré à l'aide d'un micro pH-mètre modèle 2001 (Crison Instruments, Barcelona, Espagne) après avoir homogénéisé 3 g du produit dans 27 ml d'eau distillée pendant 10 s à 1300 rpm à l'aide d'un Ultra-Turrax T25 macevator (Janke & Kunkel, Staufen, Germany). Chaque valeur est la moyenne de trois déterminations.

2.7. Analyse bactériologique

À chaque intervalle d'analyse, des échantillons de 25 g sont placés individuellement dans des sachets stériles contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée. L'ensemble est homogénéisé à température ambiante pendant 1 minute dans un Stomacher (Stomacher 400-Circulator. Seward. Worthing, U.K.). Des dilutions décimales sont préparées dans de l'eau peptonée stérile (0,1 %). 0,1 ml de chaque dilution estensemencé dans le milieu approprié pour chaque souche bactérienne. Toutes les boîtes de Pétri étaient incubées en aérobiose à 37 °C/24-48h. Le milieu gélosé *Salmonella-Shigella* (GSS, BD, 274500; Oxoid) est utilisé pour le dénombrement de

S. Enteritidis. Le milieu sélectif utilisé pour le dénombrement de *S. aureus* est la gélose Baird-Parker (Oxoid; CM275) additionné d'une émulsion de Jaune d'œuf-tellurite (Oxoid; SR054C). Les résultats sont exprimés en \log_{10} ufc/g.

2.8. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle de la viande est évaluée par un panel entraîné constitué par six personnes appartenant à notre département (enseignants et étudiants post gradués). Des tests préalables d'entraînement étaient réalisés selon la méthode: "American Meat Science Association guidelines" [2]. L'attribut acceptabilité est évalué selon les 5 échelles: 1=très inacceptable, 2=inacceptable, 3=ni acceptable, ni inacceptable, 4=acceptable; 5=très acceptable [10]. Les résultats ont été exprimés selon les scores prédominants octroyés par les panelistes.

2.9. Analyse Statistique

L'étude de la variance est utilisée [32]. Les différences entre les moyennes sont déterminées à travers LSD. Les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées comme significativement différentes.

3. Résultats et discussion

3.1. Activité antibactérienne (diffusion sur gélose)

L'activité antimicrobienne des extraits de feuilles d'olivier vis-à-vis des trois souches pathogènes communément associées aux maladies d'origine alimentaire est évaluée qualitativement et quantitativement par la méthode de diffusion sur gélose et la détermination des CMI, respectivement. Selon les résultats représentés sur le **Tableau 1**, l'extrait brut et les polyphénols de feuilles d'olivier ont présenté une forte activité antibactérienne (**Figure 2**). Les résultats obtenus pour ces composés sont comparables à ceux obtenus pour le chloramphénicol, un antibiotique utilisé comme témoin positif. Les diamètres d'inhibition enregistrés vis-à-vis de *S. Enteritidis* étaient de $16,20 \pm 1,2$ mm et $13,70 \pm 2,10$ mm, respectivement pour les polyphénols et l'extrait brut. Tandis que les diamètres d'inhibition enregistrés pour *S. aureus* étaient de $30,18 \pm 2,10$ mm et $16,33 \pm 1,80$ mm, respectivement pour les polyphénols et l'extrait brut. Enfin, les diamètres d'inhibition enregistrés vis-à-vis *P. aeruginosa* étaient de $15,57 \pm 2,15$ mm et $15,29 \pm 1,90$ mm, respectivement pour les polyphénols et l'extrait brut aqueux.

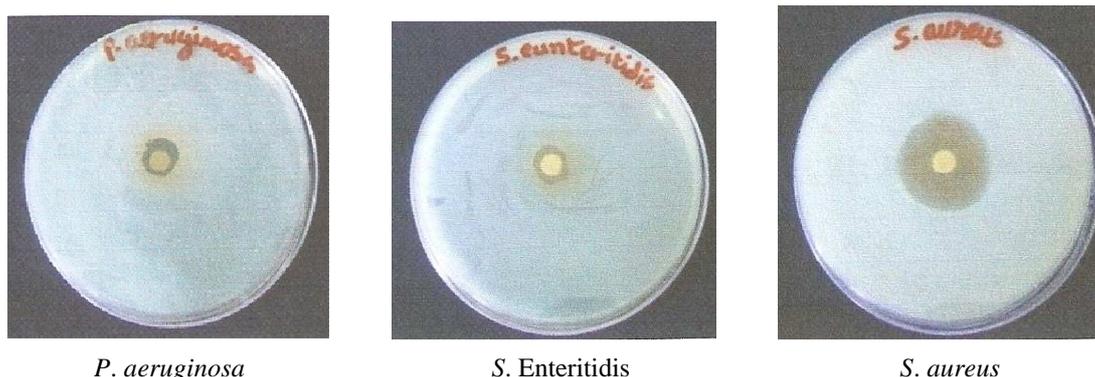


Figure 2 : Effet inhibiteur des extraits vis-à-vis de *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* et *S. aureus*

Les zones d'inhibitions du chlor-amphénicol étaient de 15,25±0,8 mm, 16,35±1,8 mm et 16,15±0,7 mm, respectivement vis-à-vis de *S. Enteritidis*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Tableau 1 :

Activité Antibactérienne de l'extrait brut aqueux et des polyphénols des feuilles d'olivier (méthode de diffusion sur gélose), exprimée en diamètre d'inhibition (mm) (Moyenne±écart type).

	φ (mm)		
	Polyphénol	Extrait brut	chloramphénicol
<i>S. Enteritidis</i>	16,15±1,2 ^a	13,70±2,10 ^b	15,25±0,8 ^{a,b}
<i>S. aureus</i>	30,18±2,10 ^a	16,33±1,8 ^b	16,35±1,8 ^b
<i>P. aeruginosa</i>	15,57±2,15 ^a	15,29±1,9 ^a	16,15±0,7 ^a

φ: zone d'inhibition exprimée selon le diamètre autour des disques imprégnés avec les deux composés. Le diamètre (6 mm) du disque est inclus dans les calculs.

Tous les tests ont été répétés trois fois.

Les valeurs suivies par la même lettre dans la même ligne, ne sont pas significativement différentes (p > 0,05).

La forte activité antimicrobienne de ces deux composés est confirmée par la méthode de microdilution (**Tableau 2**).

Tableau 2:

Les Concentrations minimales inhibitrices exprimées en pourcentage (v/v)

	CMI%	
	Polyphénols	Extrait brut
<i>S. Enteritidis</i>	0,1	1,2
<i>S. aureus</i>	0,05	0,9
<i>P. aeruginosa</i>	0,1	1,2

Il ressort de ce tableau que les polyphénols sont plus performants par rapport à l'extrait brut en termes de valeurs de CMI. Les polyphénols ont exhibé une valeur de CMI

(0,05%) inférieure de 18 fois à celle obtenue avec l'extrait brut (0,9%) vis-à-vis de *S. aureus*. Cependant, vis-à-vis de *S. Enteritidis* et *P. aeruginosa*, l'extrait polyphénolique est 12 fois plus performant que l'extrait brut. Il est aussi important de souligner que notre groupe a aussi réalisé des travaux sur l'activité antimicrobienne de deux extraits bruts de feuilles d'olivier de deux variétés Kabyles (chemlal et azerradj) et d'un extrait polyphénolique vis-à-vis d'*E. Coli*. Les résultats (non publiés) ont montré que ladite bactérie présente certaine résistance aux extraits testés. En effet des diamètres d'inhibition de 9,60 mm, 10,97 mm et 9,5 mm sont enregistrés respectivement pour les extraits bruts chemlal et azerradj et l'extrait polyphénolique. Selon certains auteurs, les molécules polyphénoliques comme l'oleuropéine pourraient s'hydrolyser, ce qui provoque une baisse dans l'activité antimicrobienne [6]. En accord avec nos observations, Tassou et Nychas [33] ont déjà confirmé la résistance d'*E. coli* envers l'oleuropéine purifiée.

Selon Cowan [7], les polyphénols sont les principaux composés antimicrobiens des plantes possédant des modes d'action divers et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'un nombre important de microorganismes. Ces dernières années nous avons réalisé plusieurs travaux portant sur l'évaluation de l'activité biologique d'extraits issus de plusieurs plantes méditerranéennes (bourrache, romarin, tomate, sauge, origan, lentisque, etc....) appliqués sur des produits alimentaires divers [11,12]. Les résultats obtenus ont montré que dans la plupart des cas, ces extraits ont démontré une certaine activité antimicrobienne. Récemment, nous avons aussi démontré l'efficacité antimicrobienne de plusieurs huiles essentielles obtenues à partir des espèces locales (lentisque, lavande, menthe, sarriette, eucalyptus, inule etc.,...) contre plusieurs bactéries pathogènes: *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *Campylobacter jejuni* [13] [14] [15].

Les effets antimicrobiens observés dans ce travail sont comparables dans la plupart des cas à ceux rapportés dans la littérature scientifique. Dans une étude récente, Lee et Lee [23] ont constaté que l'oleuropéine est de loin le composé le plus efficace vis-à-vis de *S. Enteritidis*

(23,5±0,8 mm), par contre l'acide caféique a montré une efficacité modérée (9,8 mm - 10,4 mm) vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *E. coli* et *S. Enteritidis*. Cependant, ces deux composés phénoliques n'ont exercé aucune action antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus*. Dans cette même optique, ces mêmes auteurs ont indiqué que d'autres composés de feuilles d'olivier comme la rutine et la vanilline n'ont exercé aucune activité antimicrobienne contre des bactéries Gram positif et Gram négatif (*B. cereus*, *E. coli*, *S. Enteritidis* et *S. aureus*).

Sudjana et ses collaborateurs [32] ont testé un extrait aqueux de feuilles d'olivier contre 122 espèces microbiennes. Ils ont constaté que cet extrait a exercé un effet antimicrobien trop restreint, car, parmi l'ensemble des microorganismes testés, uniquement *C. jejuni*, *Helicobacter pylori* et *S. aureus* ont manifesté une certaine sensibilité envers cet extrait. Les valeurs de CMI enregistrées étaient comprises entre 0,31-0,78 % (v/v) pour ces 03 souches bactériennes. Cependant, pour le reste des microorganismes, entre autres *P. aeruginosa*, leurs MICs sont situées entre 6,25 et 50 % (v/v).

Dans une étude récente, Lee et Lee [23] ont indiqué que les feuilles d'olivier possèdent une grande capacité biologique naturelle. En effet, ces deux auteurs ont testé individuellement et sous forme combinée l'effet antioxydant et antimicrobien de deux composés phénoliques propres aux feuilles d'olivier (Oleuropéine et acide caféique). Les résultats ont montré que ces deux composés phénoliques avaient exercé une activité antiradicalaire potentielle. En termes d'activité antimicrobienne, les deux composés étaient aussi efficaces. Cependant, l'effet antimicrobien observé est beaucoup plus important lorsque les deux composés étaient appliqués sous forme combinée. En accord avec ces observations, Benavente-Garcia et ses collaborateurs [4] ont suggéré que les extraits de feuilles d'olivier peuvent exercer une action synergique grâce à la présence de l'oleuropéine et autres composés phénoliques.

Un grand nombre d'auteurs ont rapporté que l'oleuropéine est parmi les composés phénoliques des feuilles d'olivier le plus puissant pour ses propriétés antimicrobiennes [3] [5] [24] [26]. Il serait donc probable que les résultats obtenus dans ce travail découlent de la présence de l'oleuropéine dans les différents extraits de feuilles d'oliviers utilisés.

Medina et ses collaborateurs [25] ont déjà signalé le spectre bactéricide très élargie contre plusieurs microorganismes de plusieurs composés phénoliques: l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol. L'efficacité antimicrobienne déjà démontrée par ces composés laisse supposer qu'ils peuvent constituer une très bonne alternative dans la lutte contre certaines maladies infectieuses [34].

Confirmant les rapports précédents, il a été constaté que la force et le spectre d'activité antimicrobienne varient

selon le type d'extrait et le Gram des bactéries. Cependant, les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques. Cette résistance générale plus élevée chez les bactéries à Gram négatif est attribuée à la présence d'une membrane externe imperméable aux composés lipophiles. L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne, entraînant une augmentation de la perméabilité aux ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux ou l'altération des systèmes enzymatiques bactériens [35].

En outre, les activités antimicrobiennes de ces extraits sont difficiles à corrélérer à un composé spécifique en raison de leur complexité et leur variabilité. Néanmoins, certains chercheurs ont signalé qu'il existe une relation étroite entre la composition chimique en éléments les plus abondants et l'activité antimicrobienne. Les valeurs de CMI indiquent que l'extrait polyphénolique est plus efficace que l'extrait brut. Kim et ses collaborateurs [21] ont déjà indiqué qu'en raison de la variation dans la diffusion et des propriétés de solubilité des différents composés dans les différents milieux, les résultats obtenus par la méthode des disques ne peuvent pas être directement comparables à ceux obtenus par la méthode de microdilution. Nos résultats ont montré que l'extrait polyphénolique qui a provoqué d'importantes zones d'inhibition vis-à-vis de *S. aureus* est celui qui a donné la plus faible valeur de CMI (0,05%).

Pour des raisons de rendements et de qualité finale du produit, l'extraction par des fluides supercritiques (CO₂) et les ultrasons dynamiques était la plus utilisée pour les composés végétaux comme alternative aux méthodes conventionnelles existantes [16] [18]. Cependant, des différences de compositions chimiques peuvent être observées entre les différents extraits de feuilles d'oliviers. Ces différences de composition sont dues principalement aux variations climatiques, pédologiques et agronomiques dont sont issus les oliviers.

Les facteurs environnementaux tels que la géographie, la température, la longueur du jour, les éléments nutritifs, etc., devraient être examinés pour leur rôle clé dans la composition chimique des extraits obtenus à partir des feuilles d'oliviers. Ces facteurs influent sur les voies de biosynthèse de la plante et par conséquent sur la proportion relative des composés principaux caractéristiques. Cela conduit à l'existence de chémotypes différents représentatifs des extraits de différentes origines.

3.2. Application sur des escalopes de dinde et efficacité antibactérienne

En raison de la vocation oléicole de la région Kabyle et l'utilisation des feuilles d'olivier en médecine traditionnelle dans tout le territoire algérien, cette étude a pour objectif en premier lieu à déterminer l'efficacité antibactérienne "in vitro" des composés de feuilles d'olivier

et en deuxième lieu une application sur des escalopes de dinde.

Les Figures 3, 4 et 5 montrent respectivement les résultats du développement de *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* et *S. aureus* sur les escalopes de dinde conservées à 8 ± 2 °C en présence d'un extrait brut de feuilles d'olivier et d'un extrait polyphénolique.

Les mêmes figures montrent que le nombre de bactéries dans les escalopes témoins est significativement ($p < 0.05$) supérieur par rapport au nombre de bactéries dans les échantillons traités avec les extraits (sauf pour le cas d'extrait brut vis-à-vis de *Salmonella*). En effet, chez le témoin, la charge moyenne bactérienne atteinte pour les 3 espèces au 4^{ème} jour de stockage était de $6,66 \log_{10}$ ufc/g et, trois jours plus tard (7^{ème} jour), la charge moyenne a atteint une valeur de $7,42 \log_{10}$ ufc/g.

Il ressort de ces résultats que dans tous les cas de figures, l'extrait polyphénolique exerce un effet antibactérien significatif ($p < 0,05$). Pour *P. aeruginosa* et *S. Enteritidis*, cet effet est évident dès le 1^{er} jour de stockage. En effet, une réduction de 2,23 et $1,56 \log_{10}$ ufc/g (30,38 % et 21,56 %) est enregistrée au dernier jour de stockage. Quant à l'extrait brut, il est important de signaler aussi son activité antimicrobienne modérée vis-à-vis de ces deux bactéries. En effet, une réduction de 1,5 et $0,47 \log_{10}$ ufc/g est enregistrée au dernier jour de stockage respectivement contre *P. aeruginosa* et *S. Enteritidis*.

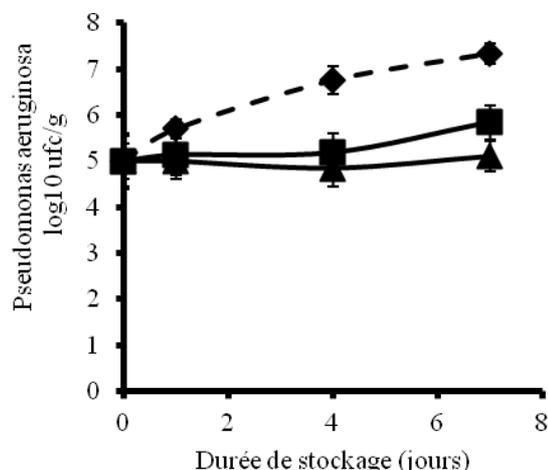


Figure 3 : Inhibition de *P. aeruginosa* par les extraits de feuilles d'olivier (*azerradj*) additionnés à des escalopes de dinde stockées à 8 ± 2 °C: (◆) Témoin; (■) Extrait brut; (▲) Extrait polyphénolique

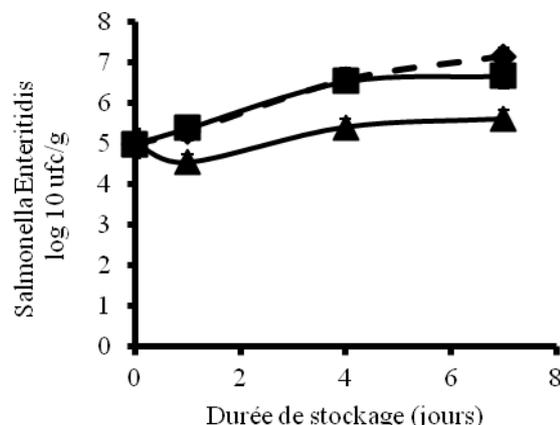


Figure 4 : Inhibition de *S. Enteritidis* par les extraits de feuilles d'olivier (*azerradj*) additionnés à des escalopes de dinde stockées à 8 ± 2 °C: (◆) Témoin; (■) Extrait brut; (▲) Extrait polyphénolique

La Figure 5 résume l'effet anti-*Staphylococcus aureus* des deux composés appliqués sur les escalopes. Une très forte réduction du nombre de *S. aureus* a été enregistrée. En effet, une réduction de 100% (effet bactéricide) a été observée à partir de 4^{ème} jour de stockage.

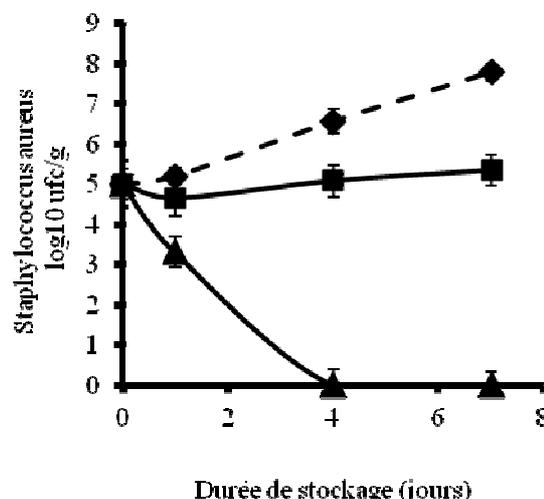


Figure 5 : Inhibition de *S. aureus* par l'extrait brut de feuilles d'olivier (*azerradj*) et de l'extrait polyphénolique additionnés à des escalopes de dinde stockées à 8 ± 2 °C: (◆) Témoin; (■) Extrait brut; (▲) Extrait polyphénolique

Ces dernières années, certaines études ont démontré avec succès les applications potentielles de différents composés végétaux pour réduire ou maîtriser la présence d'agents pathogènes dans les produits alimentaires, tels que le lait [20], le poisson [22], les fruits [29] et la viande [13].

L'activité antimicrobienne de l'extrait brut de feuilles d'olivier observée dans cette étude pourrait être attribuée à la présence de concentrations élevées d'oleuropéine,

hydroxytyrosol et verbascoside. Ces trois polyphénols sont considérés par certains auteurs comme des antibactériens et antifongiques potentiels [3] [5] [32].

Les extraits bruts de feuilles d'olivier sont constitués de mélanges complexes de nombreuses molécules chimiques. On peut se demander si leurs effets antibactériens ne sont pas le fruit d'une synergie entre toutes les molécules ou au contraire, ils ne reflètent que les molécules majeures présentes. Les mécanismes par lesquels les microorganismes sont inhibés par ces composés semblent impliquer différents modes d'action. Les composants phénoliques présents dans ces extraits ont été reconnus par plusieurs auteurs pour leur activité antimicrobienne [5] [24].

Le pH d'un aliment est aussi un facteur important affectant l'activité d'une substance antimicrobienne. À faible pH, l'hydrophobicité de certaines molécules augmente et par conséquent, elles se répartissent convenablement dans la phase lipidique du produit. Ces molécules peuvent aussi se dissoudre plus facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne et renforcer ainsi leur action antimicrobienne [18]. Nos résultats ont démontré que les valeurs de pH ne diffèrent pas significativement ($P > 0,05$) entre l'ensemble des échantillons au cours du stockage (résultats non présentés). En effet, les valeurs du pH pour tous les échantillons étaient de l'ordre de 5,6 à 5,8. Ce fait pourrait s'expliquer par le pouvoir tampon de la viande. En règle générale, la sensibilité des bactéries aux substances antibactériennes semble aussi augmenter avec la diminution du pH de l'aliment. Concernant la nature de la matrice alimentaire, Smith-Palmer et ses collaborateurs [30] ont montré que les composés actifs présents dans différents extraits végétaux exercent une forte activité antimicrobienne contre *L. monocytogenes* dans les produits maigres par contre des observations contraires sont faites dans les produits riches en matières grasses. Ces aspects énumérés ci-dessus devraient être considérés pour toute application optimisée des extraits végétaux dans les produits alimentaires. En règle générale, les principales composantes de ces extraits végétaux sont le reflet de leur activité antibactérienne. Ainsi, les fonctions synergiques des différentes molécules contenues dans les extraits par rapport à l'action d'un ou deux composants principaux de l'extrait semblent discutables. Toutefois, il est possible que l'activité des composants majeurs soit modulée par d'autres molécules mineures. En fait, les effets synergiques des divers constituants majeurs et mineurs présents dans les extraits végétaux bruts doivent être pris en considération pour rendre compte de leur activité biologique. Selon des études concernant les mécanismes d'action antimicrobienne de ces molécules, il semblerait que suite à une désintégration de la membrane cellulaire bactérienne provoquée par ces substances, la fuite des métabolites intracellulaires provoque la mort de la cellule [8] [28].

Des tests d'analyses sensorielles ont été aussi programmés. Des concentrations variables en extraits brut et polyphénolique sont utilisées dans cette étude pour étudier l'impact de l'effet de la concentration (optimisation) sur les propriétés organoleptiques du produit. L'application de ces extraits végétaux sur des escalopes de dinde aux concentrations indiquées semble améliorer la stabilité antimicrobienne de ces produits. Il faut également souligner que le panel des consommateurs n'a pas perçu d'odeur extrême liée à la présence de ces extraits dans la viande (résultats non présentés). Par conséquent, les propriétés sensorielles en termes d'acceptabilité des escalopes traitées avec ces composés sont acceptables pour les panélistes. Des études préliminaires ont montré que la combinaison des différents composés des feuilles d'olivier avait une très bonne activité antimicrobienne contre les agents pathogènes d'origine alimentaire [23]. Cependant, des recherches supplémentaires seront nécessaires pour mieux évaluer l'activité antibactérienne de ces extraits de feuilles d'oliviers. Des combinaisons de ces extraits avec d'autres substances naturelles (exemple: bactériocine...) ou avec un conditionnement de la viande sous atmosphère modifiée riche en CO_2 pourrait constituer une alternative prometteuse pour la conservation et la sécurité sanitaire du produit.

En conclusion, les deux extraits de feuilles d'olivier testés dans ce travail ont montré une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries testées. Par conséquent, ces résultats suggèrent que les feuilles d'olivier peuvent constituer un potentiel antimicrobien non négligeable pour la conservation de la viande.

Remerciements

Remerciements au Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación d' Espagne (AECID) pour avoir financé ces travaux rentrant dans le cadre d'un accord programme PCI/MED Algeria-Spain (grant ALI A/023365/09; A/033506/10).

References

- [1] Akowuah GA, Zhari I, Norgyati I, Sadikun A et Khamsah SM. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chem.* Vol. 87. (2005). pp. 559-566.
- [2] AMSA 1995. Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurements of fresh meat. Chicago, IL. American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board.
- [3] Aziz NH, Farag SE, Mousa LA et Abo-Zaid MA. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios.* Vol. 93. (1998). pp. 43-54.

- [4] Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuno A et Del Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* Vol. 68. (2000). pp. 457-462.
- [5] Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol.* Vol. 51. (1999). pp. 971-4.
- [6] Brainte R, Francesco LC, Ferdinando F, Maurizio P et Roberto N. Hydrolysis of Oleuropein by recombinant β -glycosidases from hyperthermophilic *Archea sulfobolus* immobilised on chitosan matrix. *J. Biotechnol.* Vol. 71. (2000). pp. 275-286.
- [7] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microb. Rev.* Vol. 12. (1999). pp. 564-582.
- [8] Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG et Miceli D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 55. (2007). pp. 6300-6308.
- [9] De Leonardis A et Macciola V. Olive Biophenols as Food Supplements and Additives in "Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention" Copyright © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved. Edited by: Victor R. Preedy and Ronald Ross Watson ISBN: 978-0-12-374420-3. 2010, Pages 283-289
- [10] Djenane D, Sánchez-Escalante A, Beltrán JA et Roncalés P. Extension of the retail display life of fresh beef packaged in modified atmosphere by varying lighting conditions. *J Food Sci.* Vol. 66. (2001). pp. 181-186.
- [11] Djenane D, Sánchez-Escalante A, Beltrán, JA et Roncalés P. Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chem.* Vol. 76. (2002). pp. 407-415.
- [12] Djenane D, Sánchez-Escalante A, Beltrán JA et Roncalés P. The shelf-life of beef steaks treated with dL-lactic acid and antioxidants and stored under modified atmospheres. *Food Microbiol.* Vol. 20. (2003). pp. 1-7.
- [13] Djenane D, Yangüela J, Amrouche T, Boubrit S, Bousaâd N et Roncalés P. Chemical composition and antimicrobial effects of essential Oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Sci. Technol. Int.* Vol. 17. (2011a). pp. 505-515.
- [14] Djenane D, Yangüela J, Montañés L, Djerbal M et Roncalés P. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media; efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Cont.* Vol. 22. (2011b). pp. 1046-1053.
- [15] Djenane D, Lefsih K, Yangüela Y et Roncalés P. Composition chimique et activité anti-Salmonella Enteritidis CECT 4300 des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, *Lavandula angustifolia* et *Satureja hortensis*; Tests in vitro et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à 7±1°C. *Phytothérapie.* Vol. 9 (2011c). pp. 343-353.
- [16] Floch FL, Tena MT, Rios A et Valcarcel M. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta.* Vol. 46. (1998). pp. 1123-1130.
- [17] Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML et Miguel MG. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem.* Vol. 116. (2009). pp. 714-721.
- [18] Japón-Luján R, Luque-Rodríguez J et Luque de Castro M. Dynamic ultrasound assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr A.* Vol. 1108. (2006). pp. 76-82.
- [19] Juven BJ, Kanner J, Schved F et Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Microbiol.* Vol. 76. (1994). pp. 626-63.
- [20] Karatzas AK, Kets EPW, Smid EJ et Bennik MHJ. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Microbiol.* Vol. 90. (2001). pp. 463-469.
- [21] Kim J, Marshall MR, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43. (1995). pp. 2839-2845.
- [22] Kolli Z. Activité antioxydante et antimicrobiennes des huiles essentielles de quelques Citrus; application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Thèse de Magister en Biochimie appliquée et Biotechnologies. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. (2011). pp 198.
- [23] Lee OH et Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Biores. Technol.* Vol. 101. (2010). pp. 3751-3754.
- [24] Markin D, Duek L et Berdicevsky I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses.* Vol. 46. (2003). pp. 132-136.
- [25] Medina E, de Castro A, Romero C et Brenes M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 54. (2006). pp. 4954-4961.
- [26] Medina E, Brenes M, Romero C, García A et De Castro A. Main Antimicrobial Compounds in Table Olives. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 55. (2007). pp. 9817-9823.
- [27] Ponce AG, Fritz R, del Valle C et Roura SI. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LW u.-Technol.* Vol. 36. (2003). pp. 679-684.
- [28] Rasooli I, Bagher Rezaei M et Allameh A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.* Vol. 10. (2006). pp. 236-241.
- [29] Roller S et Seedhar P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwifruit at 4 °C and 8 °C. *Lett. Appl. Microbiol.* Vol. 35. (2002). pp. 390-394.
- [30] Smith-Palmer A, Stewart J et Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* Vol. 18. (2001). pp. 463-470.
- [31] SPSS 1995. SPSS for Windows, 6.1.2. SPSS Inc., Chicago, IL.
- [32] Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley TV et Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *I. J. Antimicrob. Agents.* Vol. 33. (2009). pp. 461-463.
- [33] Tassou CC et Nychas GJE. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by olive phenolics in broth and in food model system. *J. Food Prot.* Vol. 57. (1994). pp. 120-124-132.
- [34] Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S et La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutri. Res. Rev.* Vol. 18. (2005). pp. 98-112.
- [35] Wendakoon CN et Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Prot.* Vol. 58. (1995). pp. 280-283.