

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

Université 08 Mai 45 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre
et de l'Univers

Département de : Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biologie Moléculaire des Procaryotes

Étude de l'effet de l'huile d'olive sur l'action des antibiotiques

Présenté par :

- BOUABID Samia
- MOUCHARA Souad
- OUMEDDOUR Rahma

Devant le jury composé de :

- | | |
|--------------------------------|-------------------------|
| • Promoteur : BENOUARETH. D.E | (Pr. Univ de Guelma) |
| • Président : MOKHTARI. A | (M.A.A. Univ de Guelma) |
| • Examineur : BRAIK. A | (M.A.A. Univ de Guelma) |
| • Membre invitée: NIGRI. S | (M.C.A. Univ de Guelma) |
| • Membre invité : OUMEDDOUR. R | (Pr. Univ de Guelma) |

Juin 2013

Résumé:

L'objectif de ce travail a été de rechercher l'effet *in vitro* de l'huile d'olive sur l'action de la gentamicine. Pour cela l'activité antibactérienne de l'huile d'olive et de la gentamicine, ainsi que l'interaction entre ces deux antibactériens ont été évaluées contre quatre souches de bactéries *Staphylococcus aureus*, *Echerechia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Pseudomonas aeruginosa* par des essais basés sur la méthode de diffusion par disque et par des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice.

L'activité antibactérienne de l'huile d'olive s'est révélée moins importante par rapport à celle trouvée généralement avec les antibiotiques. Cependant Une interaction antagoniste a été observée avec les quatre souches testées caractérisée par une inhibition de l'activité de la gentamicine par l'huile d'olive.

Les résultats obtenus par cette étude suggèrent que certaines thérapies naturelles contenant des huiles d'olive doivent être utilisées en dehors de toute combinaison avec les antibiotiques.

Mots-clés : Huile d'olive, Antibiotique, Gentamicine, Antagonisme.

Summary :

The aim of this study is to investigate the *in vitro* effect of olive oil on the action of gentamicin. For this, both antibacterial activities of olive oil and gentamicin were evaluated. Then interaction between these two antibacterials was tested against four strains of bacteria *Staphylococcus aureus*, *Echerechia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* with two methods based on disk diffusion method and determination of minimum inhibitory concentration.

The antibacterial activity of oil olive was less significant compared to that generally found with antibiotics, however an antagonistic interaction was observed with all strains of tested bacteria characterized by inhibiting the activity of gentamicin by olive oil.

The results of this study suggest that some natural therapies containing olive oils should be used without any combination with antibiotics.

Keys words: Olive Oil, Antibiotic, Gentamicin, and Antagonism.

المخلص:

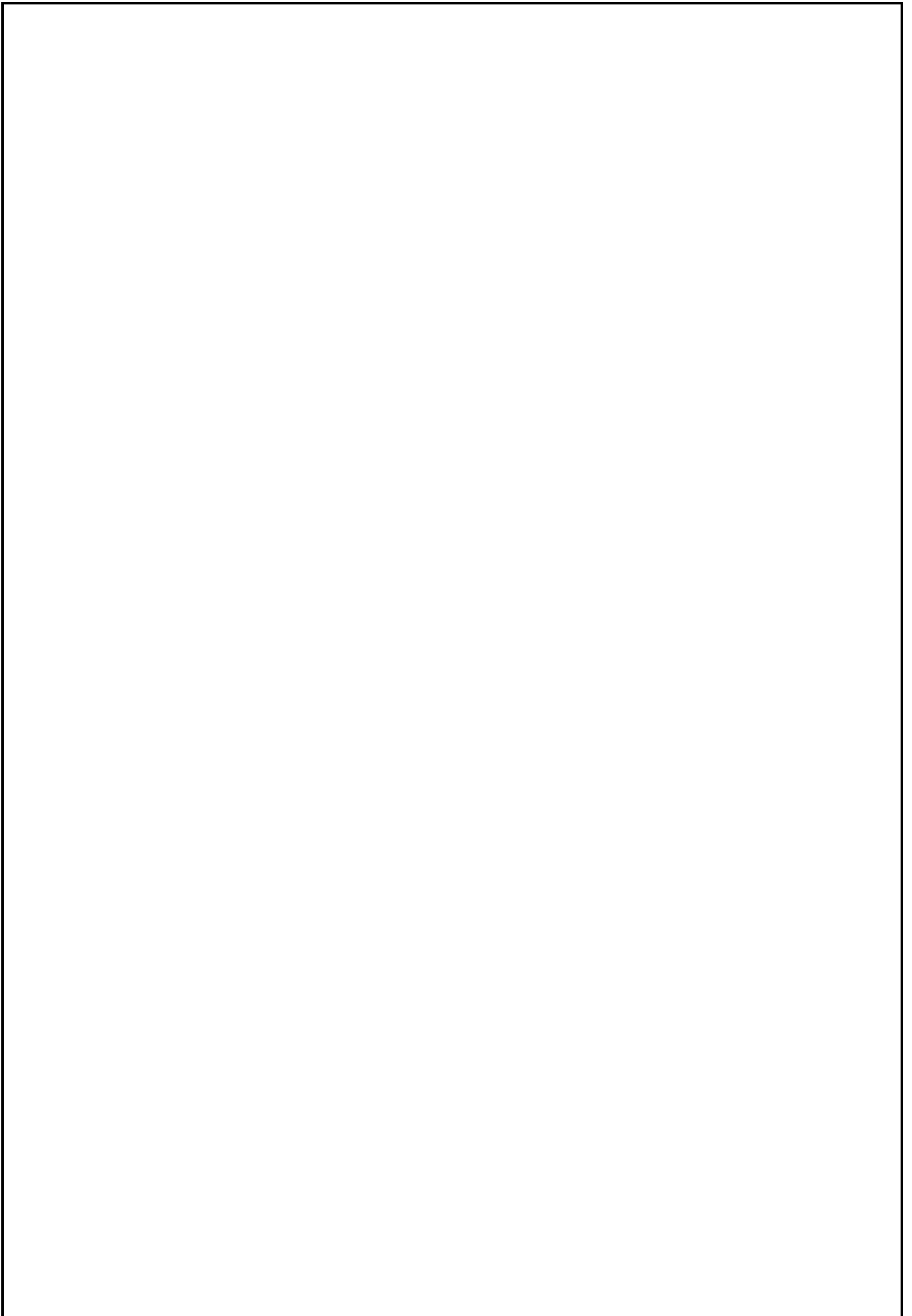
الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن تأثير زيت الزيتون على الجنتاميسين لهذا، تم تقييم الأنشطة المضادة للبكتيريا لكل من زيت الزيتون والجنتاميسين و من ثم تمت دراسة فعالية ارتباط مزيج من زيت الزيتون / الجنتاميسين ضد أربع سلالات من البكتيريا: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Echerechia coli* و *Staphylococcus aureus*

تم اختبار تفاعل زيت الزيتون، مع الجنتاميسين مع طريقتين مختلفتين طريقة القرص في الوسط الصلب وتحديد التركيز الأدنى المثبط.

كان النشاط المضاد للبكتيريا لزيت الزيتون أقل أهمية مقارنة مع ذلك التي توفره عادة المضادات الحيوية. لوحظ أنه تم تثبيط عمل الجنتاميسين من قبل زيت الزيتون مع ذلك جميع سلالات البكتيريا المختبرة.

نتائج هذه الدراسة تشير إلى أن بعض العلاجات الطبيعية التي تحتوي على زيوت الزيتون ينبغي أن تستخدم بعبء أي عن مضاد حيوي.

الكلمات المفتاحية : زيت الزيتون ، مضاد حيوي ، الجنتاميسين، عدائية.



Introduction 1

Chapitre I : Des bactéries aux antibiotiques

I.1 Vue d'ensemble sur le monde bactérien 3
I.2. Les antibiotiques..... 4
I.3. Résistance aux antibiotiques..... 7
I.4. Mécanismes de résistance..... 8
I.5. La combinaison des antimicrobiens 10

Chapitre II : Généralités sur les huiles d'olive

II.1 L'olivier et les olives..... 12
II.2 Composition et caractéristiques de l'huile d'olive 12
II.3 Production et consommation de l'huile d'olive 15
II.4 Qualité et stabilité de l'huile d'olive 16
II.5 Classification des huiles d'olive..... 18
II.6 Effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé 19

Chapitre III : Matériel et Méthodes

III.1 Matériel..... 22
III.2 Méthodes..... 23

Chapitre IV: Résultats et Discussion

IV.1 L'indice d'acide I_A 29
IV.2 Spectres de l'huile d'olive de la région de Guelma et de Jijel..... 29
IV.3 Test de l'activité antibactérienne de l'éthanol..... 30
IV.4 L'antibiogramme 30
IV.5 Test de l'activité antibactérienne des deux huiles d'olive..... 32
IV.6 Détermination des CMI en milieu liquide 34
IV.7 Cinétique de l'association de l'huile d'olive et de la gentamicine 36

Conclusion 40

Références bibliographiques

Annexes

Figure I.1 : La structure d'une cellule procaryote	3
Figure I.2 : Mode d'action des antibiotiques	5
Figure I.3 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries	8
Figure I.4 : Principaux mécanismes de résistances aux antibiotiques développés par les bactéries.....	9
Figure III.1 : Principe de la méthode de diffusion par disque	26
Figure IV.1 : Spectre infrarouge de l'huile d'olive de Guelma	29
Figure IV.2 : Spectre infrarouge de l'huile d'olive de Jijel	29
Figure IV.3 : Antibiogramme des quatre bactéries étudiées	31
Figure IV.4 : Nombre de bactéries viables calculé après 18 heures d'incubation en présence de concentration décroissante de l'huile d'olive	34
Figure IV.5 : Nombre de bactéries viables calculé après 18 heures d'incubation en présence de concentration décroissante de la gentamicine.....	35
Figure IV.6 : Nombre de bactéries viables calculé après 18 heures d'incubation en présence de combinaison huile d'olive/gentamicine	35
Figure IV.7 : Effet de l'association de l'huile d'olive avec la gentamicine sur <i>E. coli</i>	36
Figure IV.8 : Effet de l'association de l'huile d'olive avec la gentamicine sur <i>P.aeru</i>	36
Figure IV.9 : Effet de l'association de l'huile d'olive avec la gentamicine sur <i>K. pneu</i>	37
Figure IV.10 : Effet de l'association de l'huile d'olive avec la gentamicine sur <i>S. aureus</i>	37
Figure IV.11 : Résultats de la combinaison réalisée par la méthode de diffusion sur gélose...38	

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Les cibles des principales classes de médicaments antimicrobiens	6
Tableau II.1 : Fabrication de l'huile d'olive	13
Tableau II.2 : Production et consommation d'huiles d'olive dans cinq pays producteurs du bassin méditerranée	16
Tableau IV.1 : L'activité antibactérienne de l'éthanol 60° par deux méthodes différentes.....	30
Tableau IV.2 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'antibiogramme.....	31
Tableau IV.3 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition de différentes dilutions de l'huile d'olive de Guelma sur les quatre souches testées.....	32
Tableau IV.4 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition de différentes dilutions de l'huile d'olive de Jijel sur les quatre souches testées.....	32

Dans les dernières décennies, le programme de recherche antimicrobienne a concentré son attention à la recherche de nouveaux composés ayant des activités antibactériennes potentielles [01]. Ce besoin réel est potentiellement imputable au pourcentage élevé de bactéries isolées à partir d'infections cliniques qui sont résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. La plupart sont même résistantes à de multiples antibiotiques. Certaines sont même résistantes à tous les antibiotiques couramment utilisés.

Ce problème est devenu si grave que beaucoup d'antibiotiques jadis très utilisés sont maintenant devenus inutiles, donc les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques constituent un problème grandissant de santé publique [02].

Pour cela, le retour vers le naturel est devenu indispensable, surtout que le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus, d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux.

A l'instar d'autres contrées du monde, l'Algérie possède aussi ses « jardins splendides » avec ses plantes vertueuses [03,04], parmi lesquelles l'olivier (*Olea europaea* L.) qui 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 thérapeutique [05].

Dans le passé, des hommes et des femmes avisés savaient faire usage de nombreuses plantes médicinales et connaissent l'endroit approprié et le moment propice pour les cueillir.

L'étude de la médecine traditionnelle et du traitement par les plantes ou la phytothérapie est particulièrement intéressante en Algérie pour sa richesse de la flore médicinale et aussi pour la persistance de l'usage des plantes par une proportion importante de la population.

Elle consiste en l'utilisation des plantes médicinales pour guérir mais aussi pour prévenir. Il s'agit là d'une phytothérapie millénaire, car l'homme, depuis la nuit des temps, a toujours cherché à se servir des plantes pour s'alimenter et pour se soigner.

Actuellement les travaux de recherche scientifiques confirment le bien-fondé de ces notions populaires découlant d'un pur empirisme. Et ainsi le remède de « grand-mère » devient un traitement sérieux, étayé par des résultats expérimentaux [04].

Prenant l'exemple de l'huile d'olive qui est largement cultivée en Algérie, dans la présente étude, nous examinerons la validité de l'une de ces notions qui indique l'évitement de l'association de l'huile d'olive avec les antibiotiques.

Notre travail sera reparti en deux parties, initié par une revue bibliographique où nous apportons des données générales sur le monde des bactéries, les antibiotiques, et des généralités sur l'huile d'olive. La seconde partie rapporte les méthodes utilisées et les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

I.1 Vue d'ensemble sur le monde bactérien :

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classées parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires).

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 μm . On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopies électroniques [06].

Les procaryotes sont les organismes les plus répandus sur terre. Ceci parce que leurs métabolismes différents et souvent très adaptables leur permettent de vivre dans une variété considérable d'habitats. Outre la possibilité qu'ils ont de vivre dans notre environnement familial tempéré et oxygéné, certains types de bactéries peuvent se développer dans des conditions de vie hostiles aux eucaryotes, ou même exiger ces conditions, telles que des environnements chimiques défavorables, des températures élevés (jusqu'à 113°C) ou encore l'absence d'oxygène. De plus, la vitesse de reproduction rapide des procaryotes (au mieux < 20 minutes pour une division cellulaire dans la plupart des espèces) leur permet de mettre à profit des conditions de vie momentanément favorables. Inversement, la possibilité pour beaucoup de bactéries de former des spores résistantes leur permet de survivre dans des conditions hostiles [07].

Les cellules procaryotes ont une morphologie simple que celles des cellules eucaryotes, mais ce ne sont pas des versions plus simples des eucaryotes. Bien que de nombreuses structures soient communes aux deux types de cellules, certaines sont uniques aux procaryotes (figure I.1) [08].

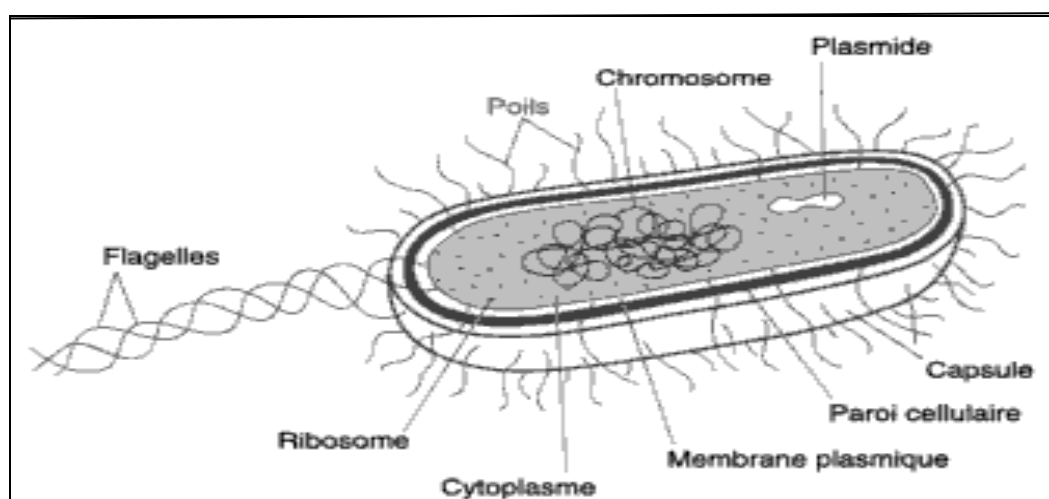


Fig. I.1: La structure d'une cellule procaryote [09].

On distingue les bactéries proprement dites (*bacteria*) des bactéries primitives (*Archaea*). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux *Bacteria* [06].

Les infections bactériennes sont responsables de maladies allant de l'angine bénigne aux épidémies de choléra et de peste. Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables, à l'origine de maladies graves ou de simple colonisation de la peau. Elles sont capables de survivre et se multiplier dans l'environnement et certaines forment des spores qui survivent pendant des décennies. Un grand nombre parasite les animaux, et n'infecte l'homme que par hasard. D'autres ne peuvent survivre qu'au contact intime de leur hôte humain. Alors que la plupart des bactéries se répliquent en quelques heures ou jours, d'autres ont une croissance beaucoup plus lente, entraînant des infections chroniques difficiles à traiter. En plus d'une grande diversité d'habitat, les bactéries ont un potentiel important d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques, comme on le verra ci-dessous [10].

I.2 Les antibiotiques :

Les antibiotiques sont, par définition, « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance ». Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie [11].

I.2.1 Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action :

Les antibiotiques sont regroupés en classes (ou familles) sur la base de leur structure chimique, par exemple, β -lactames (pénicillines et céphalosporines), aminosides (streptomycine, kanamycine, et la gentamicine), et les tétracyclines.

En conséquence, les membres d'une classe donnée sont étroitement et généralement liés par la même cible dans la cellule et sont donc des substrats pour le même mécanisme de résistance (tableau I.1) [12].

Les principales classes d'antibiotiques agissent sur quatre différentes cibles (figure I.2).

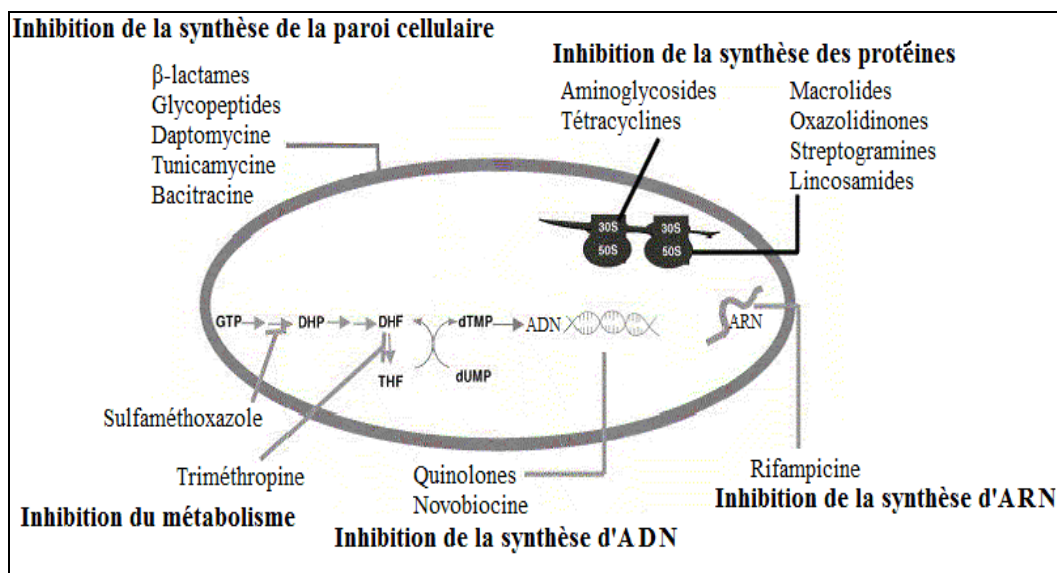


Fig. I.2: Mode d'action des antibiotiques [13].

DHP : dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate.

1. Inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi cellulaire :

La paroi cellulaire bactérienne protège les procaryotes de l'environnement et de la lyse osmotique. Elle est caractérisée par la présence d'un peptidoglycane situé à l'extérieur de la membrane cytoplasmique qui est responsable de la rigidité de la paroi et de la détermination de la forme des cellules bactériennes. La synthèse de la paroi cellulaire nécessite plusieurs étapes dans le cytoplasme, comme la synthèse du muramyl pentapeptide, qui est ensuite transporté vers la face externe de la membrane cellulaire par un support. La réticulation par les transglycosylases et les transpeptidases est responsable de la synthèse totale du peptidoglycane à l'extérieur de la cellule. Les antibiotiques β -Lactamines également nommé « penicillin binding protéins » (PBP), tels que les pénicillines et les céphalosporines, bloquent les événements du transpeptidation par leurs liaisons aux transpeptidases.

Les glycopeptides agissent en se liant, de façon non covalente, à l'extrémité C-terminale de la D-alanine-D-alanine des dipeptides qui constituent les précurseurs du peptidoglycane, empêchant ainsi leur incorporation dans la paroi en pleine croissance.

La fosfomycine inhibe l'activité de MurA, une enzyme impliquée dans la conversion de l'uridine-diphosphate-N-acétylglucosamine, souvent abrégée en UDP-GlcNAc, qui est un nucléotide-ose en UDP-muramylpentapeptide, en se fixant sur sa cystéine du site actif et bloquant ainsi la formation de pentapeptidemuramyl.

2. Inhibiteurs de la biosynthèse des protéines :

Les ribosomes bactériens, qui traduisent l'ARNm en séquences d'acides aminés, sont constitués de deux sous-unités nucléoprotéiques nommés, 50S et 30S. La grande sous-unité 50S contient des protéines et deux ARNr, 23S et 5S, tandis que la petite sous-unité 30S est composée de protéines et de l'ARNr 16S. Les événements de la traduction commencent par la liaison de l'ARNm avec la sous-unité 30S. Un formylméthionyl-ARNt est alors attaché sur le site donneur (P) en face du codon initiateur AUG. La sous-unité 50S est ensuite ajoutée, et l'aminocyl-ARNt adéquate entre dans le site récepteur aminocyl (A), qui est adjacente au site donneur peptidyl (Site P). Une transférase peptidyl spécifique médie la liaison entre la N-formylméthionine et l'acide aminé adjacent.

Les macrolides, comme l'érythromycine, se lient au ARNr 23S, à proximité du centre du peptidyl transférase, et bloquent l'entrée du tunnel du ribosome, et ainsi arrêtent l'allongement de la chaîne peptidique [12, 06, 14].

Tableau I.1: Les cibles des principales classes de médicaments antimicrobiens [12].

Synthèse de la paroi cellulaire	La synthèse des protéines	réplication de l'ADN	Membrane
La bacitracine	Les aminoglycosides	Les coumarines	Les polymyxines
Les glycopeptides	Le chloramphénicol	Les quinolones	
Les β-Lactamines	L'acide fusidique	La rifampicine	
Les fosfomycines	Le kétolides	Les sulfonamides	
	Les lincosamides	La triméthoprim	
	Les macrolides		
	Les oxazolidinones		
	Les streptogramines		
	Les tétracyclines		

Les tétracyclines se lient au voisinage de l'emplacement A de la sous-unité 30S et bloquent le déplacement de l'ARNt au long du ribosome, ce qui empêche la formation de la première liaison peptidique.

Le chloramphénicol se lie au site A et empêche leur liaison par l'ARNt.

Les lincosamides (la lincomycine et la clindamycine), en interagissant à la fois avec le site A et le site P peptide inhibent la formation de la liaison peptidique.

Le ribosome est également la cible spécifique des aminoglycosides qui agissent en provoquant des erreurs de translation et une inhibition de translocation.

3. Inhibiteurs de la réplication de l'ADN :

Les topoisomérases sont essentiels pour la viabilité cellulaire. L'ADN gyrase est impliqué dans le contrôle de la topologie de l'ADN, dans la réplication de l'ADN, la recombinaison et la transcription.

La topoisomérase IV est impliquée dans la réplication de l'ADN et la décaténation du chromosome. L'interaction des quinolones avec des complexes d'ADN liés à l'enzyme est responsable des changements de conformation et de l'accumulation de complexes qui pourrait bloquer la fourche de réplication.

La rifampicine est un inhibiteur de l'ARN polymérase qui entrave la transcription des protéines de l'ADN en ARNm.

L'acide folique est un précurseur essentiel dans la synthèse de l'acide nucléique.

La triméthoprim et la sulfaméthoxazole inhibent le métabolisme de l'acide folique : la première molécule bloque la dihydrofolate réductase (DHFR), une enzyme essentielle pour la synthèse de l'ADN, alors que la seconde bloque la dihydroptéroate synthase (figure I.2) [12, 06, 14].

4. Antibiotiques agissant sur les membranes :

Les polymyxines sont des polypeptides amphipathiques, extraits de bacilles, qui agissent comme les détergents. Elles désorganisent la membrane externe des bactéries gram négatif en s'attaquant aux phospholipides provoquant une dialyse de la cellule et la mort de celle-ci. Les polymyxines ne peuvent pas agir sur la membrane des bactéries gram positif protégée par la paroi bactérienne [12, 15].

I.3 Résistance aux antibiotiques :

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques : intrinsèque et acquise.

I.3.1 La résistance intrinsèque (ou naturelle) :

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle [11].

I.3.2 La résistance acquise :

La résistance acquise n'est présente que chez certaines souches de la même espèce ou d'un genre [12]. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes.

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine [11, 16].

La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (figure I.3) [11].

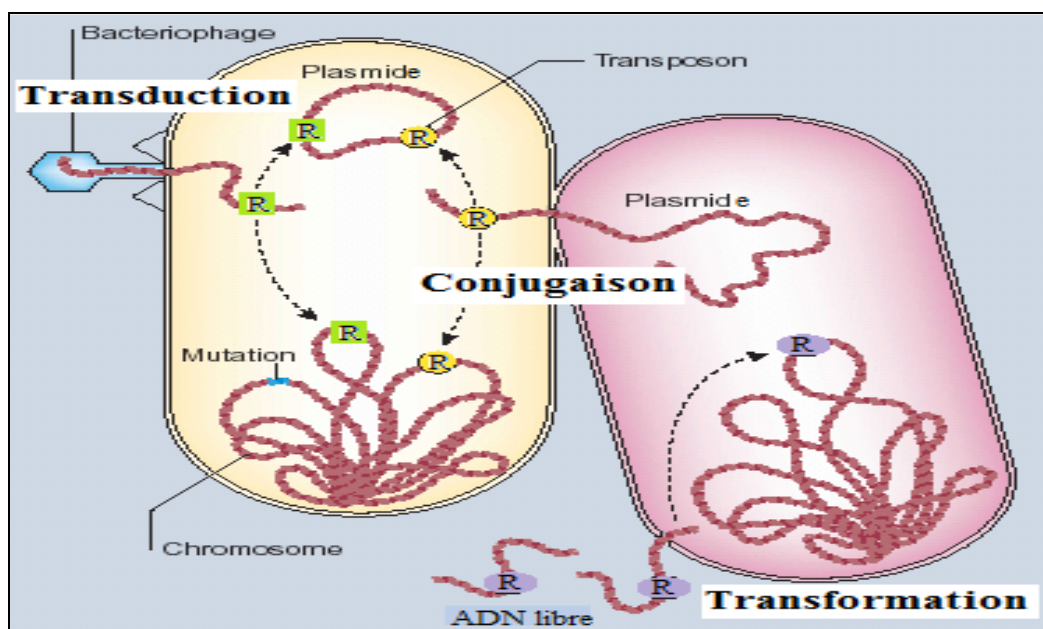


Fig. I.3: Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries [11].

Les résistances intrinsèques et acquise ne diffèrent pas dans leurs mécanismes, tous deux peuvent utiliser les quatre principales voies représentées sur la (figure I.4).

I.4 Mécanismes de résistance :

Il y a plusieurs raisons pour lesquelles un microorganisme peut avoir une résistance naturelle à un antibiotique.

- ✓ Il peut ne pas posséder la structure ciblée par l'antibiotique. Par exemple, certaines bactéries ne possèdent pas de paroi bactérienne typique et sont donc résistantes aux pénicillines.
- ✓ Le microorganisme peut être imperméable à l'antibiotique. Ainsi, la plupart des bactéries à GRAM négatif sont imperméables à la pénicilline G.
- ✓ Il peut modifier la structure chimique de l'antibiotique en une forme inactive.
- ✓ Beaucoup de staphylocoques contiennent des β -lactamases qui peuvent couper le cycle β -lactame de la plupart des pénicillines.
- ✓ Il peut modifier la cible de l'antibiotique.
- ✓ Le microorganisme peut développer une voie biochimique résistante. Par exemple, de nombreux microbes pathogènes développent la résistance aux molécules de sulfamides, empêchant la production d'acide folique chez les bactéries.
- ✓ Les souches résistantes modifient leur métabolisme pour assimiler l'acide folique présent dans l'environnement, évitant l'utilisation de la voie métabolique bloquée par les sulfamides.
- ✓ Le microorganisme peut être capable de relarguer un antibiotique entré dans la cellule (mécanisme d'efflux), comme décrit dans la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à de nombreux antibiotiques [17].

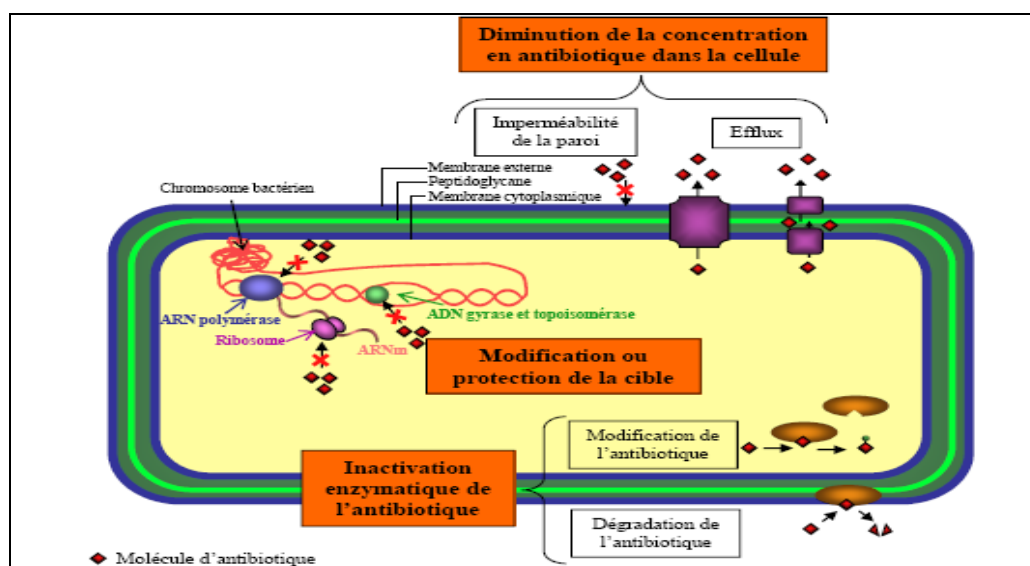


Fig. I.4: Principaux mécanismes de résistances aux antibiotiques développés par les bactéries.

Les différents mécanismes de résistance sont représentés : la diminution de la concentration en antibiotiques dans la cellule grâce à l'efflux et l'imperméabilité de la membrane, les modifications ou protections de la cible des antibiotiques (l'ADN gyrase et topoisomérase,

l'ARN polymérase, et les sous-unités ribosomales) et l'inactivation des antibiotiques par des enzymes membranaires ou cytoplasmiques [18].

I.5 La combinaison des antimicrobiens :

Les combinaisons des antimicrobiens sont utilisées le plus fréquemment pour fournir un large spectre empirique dans le traitement des patients qui sont gravement malades et qui peuvent être septicémique. Moins fréquemment, les combinaisons des antimicrobiens sont choisies parce qu'un agent pathogène identifié est résistant à l'inhibition et / ou mis à mort par des doses conventionnelles d'antimicrobiens simples, mais plus sensibles à l'inhibition ou à la destruction par la combinaison. Dans les deux cas, le résultat clinique peut dépendre des interactions de ces agents antimicrobiens contre les micro-organismes individuels.

I.5.1 Raisons de l'utilisation des antimicrobiens en combinaison :

1. Diminution de l'émergence de souches résistantes :

Les antibiotiques sont parfois utilisés en combinaison dans une tentative d'empêcher ou de retarder l'apparition *in vivo* de sous-population résistante de l'organisme pathogène. Avec l'utilisation du traitement simultané de deux ou plusieurs agents contre les bactéries qui se développent par des mécanismes de résistance différente, la probabilité que les colonies apparaîtront résistantes à l'ensemble des antimicrobiens utilisés est théoriquement très faible.

2. Diminution de la toxicité dose-dépendance:

Plusieurs antimicrobiens importants ont des toxicités significatives des doses liées qui limitent sérieusement leur utilisation. Par conséquent, il y a des raisons théoriques pour lesquels les médecins ou les cliniciens tentent de réduire la dose d'un antimicrobien potentiellement toxiques lors de l'utilisation d'un agent supplémentaire pour assurer un résultat clinique réussi.

3. Infection polymicrobienne :

Une autre utilisation importante de combinaisons antimicrobiennes est le traitement d'une infection mixte (polymicrobienne) documentée ou suspectée. Dans certaines infections polymicrobiennes, il peut être nécessaire de cibler chacune de plusieurs agents pathogènes importants pour la thérapie antimicrobienne.

4. Synergie antimicrobienne :

Les combinaisons des antimicrobiens ont d'abord été utilisés pour traiter les patients au début de l'ère des antibiotiques quand il est devenu évident que toutes les infections répondent

au traitement par les sulfamides, la pénicilline, ou la streptomycine utilisé seul. Malgré son empirisme évident, une partie de cette première expérience a été un succès remarquable, il existe maintenant un corpus considérable de littérature concernant le rôle de synergie antimicrobienne dans le traitement des infections dues à une grande variété de bactéries Gram positives et Gram-négatives.

Cette utilisation de combinaisons antimicrobiennes pour réaliser une activité *in vitro* et / ou mise à mort par des concentrations acceptables de simples agents continue d'être une grande pertinence clinique [19].

Le résultat de l'association (de la combinaison) de deux antibiotiques vis-à-vis d'une bactérie est variable. Trois éventualités sont possibles. Dans un premier cas l'activité des antibiotiques n'est pas modifiée (indifférence), dans un second cas leur activité est amplifiée (synergie) et dans le troisième cas leur activité est diminuée (antagonisme) [06].

Le chapitre qui suit a pour objectif de présenter dans leurs grandes lignes les principales caractéristiques de l'huile d'olive qui possède selon plusieurs travaux un effet antibactérien important, et par la suite, on détermineras le type de l'interaction entre ce remède naturel et les antibiotiques.

II.1 L'olivier et les olives :

L'olivier et l'huile d'olive font partie intégrante de l'histoire du bassin méditerranéen et on les retrouve au fil des siècles à travers différents mythes et croyances. Depuis la civilisation grecque jusqu'à nos jours [20].

L'olivier, arbre typique des régions sèches et chaudes, constitue une composante familière des pays du bassin méditerranéen et représente pour beaucoup d'entre eux, une des principales cultures traditionnelles, et un symbole de la modernité économique [21].

De point de vue botanique l'olivier appartient à la famille des oléacées (comme le lilas, le troène ou le frêne), à l'intérieur de celle-ci, il est du genre *olea* qui comprend huit espèces dont *olea europaea*. Cette dernière se divise en deux sous espèces : *olea europaea sylvestris* ou oléastre, qui est l'olivier sauvage, et *olea europaea sativa*, sa version cultivée.

L'origine de l'olivier sylvestre se situe en Asie mineure où il est très abondant et forme de véritables forêts. C'est donc sur cet arbre que poussent la centaine des variétés (cultivars) endémiques d'olives. Évidemment c'est le travail de l'homme, par un long processus de sélection et leur destination finale qui a permis d'obtenir une si large palette de fruits [22].

L'olivier est un arbre cultivé pour ses fruits alimentaires et, secondairement, pour ses feuilles utilisées en phytothérapie.

Les olives sont des drupes ellipsoïdes dont l'épicarpe mince et lisse passe progressivement du vert au pourpre noirâtre au cours de la maturation. Cet épicarpe recouvre un mésocarpe charnu et huileux entourant lui-même un noyau dur à endocarpe sclérifié. Le fruit frais est riche en eau (40 à 45%) en glucide (10 à 20%) et surtout en lipides qui représentent environ 30% du fruit mur [23].

II.2 Composition et caractéristiques de l'huile d'olive :

II.2.1 L'huile d'olive :

Le terme huile d'olive désigne exclusivement l'huile extraite du fruit de l'olivier. L'huile d'olive est la seule qui ne soit pas obtenue par raffinage mais seulement par des procédés mécaniques. Cette façon de l'obtenir garantit que toutes les vitamines et les substances définissant le goût et qui étaient présentes dans le fruit, se retrouveront intactes [24].

Le tableau suivant représente un exemple de fabrication de l'huile d'olive :

Tableau II.1 : Fabrication de l'huile d'olive [25].

Opérations unitaires	Type d'opération	Rôles
Triage	Préliminaires	Éliminer les olives non conformes.
Lavage	Préliminaires	Éliminer les matières contaminantes : pierres, feuilles.
Broyage	Réduction de taille	Augmenter la surface d'échange et faciliter l'extraction par pression.
Malaxage	Mélange	Favoriser la migration de l'huile à travers le broyat.
Extraction par pression a froid	Séparation sans changement d'état	Séparer l'extrait (phase riche en huile) du résidu (tourteau pauvre en huile).
Décantation	Séparation par sédimentation	Éliminer les matières en suspension.
Filtration ou centrifugation	Séparation par filtration	Clarifier l'huile obtenue.
Mise en bouteilles	Conditionnement	Soutirer et mettre en bouteilles

II.2.2 Composition générale des huiles d'olive :

L'huile d'olive contient un grand nombre de composés structurellement hétérogènes dont les principaux sont les triacylglycérols (>95%), une faible quantité d'acides gras libres, du glycérol, des pigments, et un grand nombre de composants dits «mineurs» présents en faibles quantités (0,5 à 15%). On peut séparer ces composés en tocophérols, phénols, composés aromatiques, hydrocarbures et stérols [26].

1. Les acides gras :

Les acides gras appartiennent à la famille des lipides. Ces lipides contiennent une fraction principale dite saponifiable (phospholipides, triglycérides) et une fraction mineure insaponifiable (stérols, vitamines liposolubles, caroténoïdes). Les lipides sont caractérisés par leur insolubilité dans l'eau et la solubilité dans les solvants organiques.

Ces acides gras sont dites essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'homme et doivent donc être apportés par l'alimentation. Dans la nature, les acides gras sont généralement sous forme de triesters entre des acides gras et du glycérol selon la formule :



Dans le cas de l'huile d'olive les triacylglycérides représentent entre 98% et 99% de la masse totale [20].

Les tryglcérides sont principalement mono-insaturés. Le principale acide gras de l'huile d'olive est l'acide oléique, elle en contient en moyenne 77% [24] mais contenant une quantité d'acides linoléique (3,5 à 21%) et linoléique (acides gras polyinsaturés essentiels). [21]

La concentration de cet acide (acide oléique) varie selon les races d'olivier plusieurs facteurs ont une influence sur la proportion de ces différents acides gras et donc sur la qualité. [24]

2. Les Tocophérols :

Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique propre, qui sont nécessaires à l'organisme et que l'homme ne peut synthétiser en quantité suffisante. Elles doivent donc être fournies par l'alimentation. L'huile d'olive contient des tocophérols α , β , γ , δ , Le α -tocophérol (la vitamine E) est majoritaire à plus de 88% avec une teneur moyenne d'environ 12 à 25 mg/100g.

3. Les Pigments :

La couleur de l'huile d'olive est essentiellement liée à la présence des chlorophylles, de la phéophytine ainsi qu'aux caroténoïdes. La composition et la teneur totale des pigments naturellement présents dans l'huile, sont des paramètres importants parce qu'elles sont corrélées à la couleur, qui est un attribut de base pour évaluer la qualité d'huile d'olive [21].

4. Les composés phénoliques :

L'huile d'olive contient des composés phénoliques simples et complexes qui augmentent sa stabilité et lui confère des propriétés antioxydantes et modulent sa saveur [27].

Les composés phénoliques contribuent fortement au goût piquant, à l'astringence et à l'amertume des huiles [28]. Un grand nombre d'entre eux, ont des propriétés antioxydantes ; c'est le cas notamment de l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide caféique, le tyrosol, l'hydroxytyrosol, du 1-acétoxy-pinorésinol et de l'oleuropéine [21].

Les composés phénoliques sont très variables d'une huile à une autre, tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Si la composition phénolique peut servir de marqueur pour l'identification des huiles c'est parce que l'origine géographique a une forte influence sur le développement de certains phénols [29].

5. Les composés aromatiques :

On estime que plus de 70 composés contribuent au parfum et au goût particulier de l'huile d'olive.

Parmi ceux-ci figurent des produits de dégradation d'acides gras insaturés tels que les aldéhydes dont le prédominant est l'hexanal.

6. Les hydrocarbures :

Le squalène est le principal hydrocarbure de l'huile d'olive, c'est un triterpène qui apparaît dans la voie de la biosynthèse du cholestérol. Sa présence dans l'huile d'olive est d'environ 400-450mg/100g [30].

7. Les stérols :

C'est une famille de constituants essentiels des membranes cellulaires, d'origine animale et végétale. Ils ont le même noyau et diffèrent par leur chaîne latérale. Dans l'huile d'olive, le principal stérol est le β -sitostérol, représentant jusqu'à 90-95% du total, et qui a une action anticarcinogène, Le campéstérol et le stigmastérol comptent respectivement pour 3% et 1% du total.

II.3 Production et consommation de l'huile d'olive :

La production d'huile d'olive représente une très faible part de la fourniture en huiles végétales dans le monde (3,3% contre 27% pour l'huile de soja) ; mais elle occupe une place notable dans la consommation en lipides [21].

Il y a aujourd'hui près d'un milliard d'oliviers (*Olea europaea L.*) cultivés à travers le monde et cela sur presque tous les continents. Plus de 90% des oliviers sont cultivés dans le bassin méditerranéen, notamment en Espagne, en Italie et en Grèce. Il existe plus de cent variétés d'oliviers, cultivées en fonction de leur objectif final. Les olives peuvent avoir deux grandes utilisations : la première est l'utilisation en tant que fruit entier ou encore appelée "olives de table", la seconde est pour la production d'huile d'olive [20].

Le Conseil Oléicole International estime la production mondiale de l'huile d'olive à 2590,5 milliers de tonnes. L'Union Européenne (UE) est de loin le plus grand producteur mondial (75% de la production) ; l'Espagne en produisant 43% suivi d'Italie et de la Grèce avec respectivement 32% et 22%, assurant ainsi 97% de la production européenne [21]. La grande majorité des olives est donc utilisée pour la fabrication de l'huile d'olive [20].

En Algérie, l'oléiculture représente la culture fruitière la plus répandue ; elle couvre 24% de la surface agricole utilisée soit 200 000ha répartis notamment sur les zones Est et Centre-Est du pays, en particulier Béjaïa, Tizi Ouzou, Bouira, Bordj-Bouarreridj, Sétif et Jijel, qui représentent ensemble 69% de la superficie totale de l'oléiculture.

Les principaux pays consommateurs sont également les principaux pays producteurs. La consommation d'huile d'olive varie, selon les pays, de 0,5 à 25 kg par habitant.

Au niveau national, l'Algérie est un pays où la consommation pourrait être très significative à l'avenir. La consommation algérienne d'huile d'olive par habitant est passée de 0,80 kg en moyenne dans les années 80 à 0,90 kg au début des années 90 et à 1kg à la fin des années 90. Cependant, l'Algérie joue actuellement un rôle insignifiant en tant qu'exportateur.

Tableau II.2 : Production et consommation d'huiles d'olive dans cinq pays producteurs du bassin méditerranée [21].

Pays	Année 1998/99-2001/02		Année 2003/04	
	Production	Consommation	Production	Consommation
Algérie	35.0	34.0	40.0	39.0
Tunisie	148	49.0	180.8	60.0
Turquie	120.0	68.0	60.0	40.0
Maroc	50.0	54.0	80.0	70.0
Syrie	113.3	94.0	110.0	115.0

II.4 Qualité et stabilité de l'huile d'olive :

II.4.1 Critères de qualité :

La qualité d'une huile d'olive est définie par sa composition en acides gras libres, en composés aromatiques et en composés mineurs antioxydants. Ce sont ces 3 paramètres qui donnent à l'huile d'olive son originalité gustative et ses vertus nutritionnelles [31].

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont proposé d'inclure les phénols comme un bon indicateur de qualité d'huile d'olive.

II.4.2 Facteurs déterminants la qualité de l'huile d'olive :

Étant donné l'image très positive de l'huile d'olive, le Conseil Oléicole International vise à améliorer encore la qualité du produit qui dépend de plusieurs facteurs :

- En premier lieu, de la qualité des olives dont elle provient et en plus, des différentes étapes qui s'étendent de la production (labour, l'âge de l'arbre, taille des oliviers, quantité d'engrais, l'irrigation, la variété) à la cueillette des olives (l'état du fruit, son degré de maturation au moment de ramassage) et de la fabrication à la conservation de l'huile [21].

- Le lavage des olives après la récolte : l'olive doit subir un lavage qui permet d'éliminer les levures et les microorganismes qui se trouvent sur la pellicule des drupes. Ces organismes unicellulaires peuvent passer dans l'huile et se développer, atténuant ainsi la qualité de l'huile

[32]. Au bout de quelques mois de stockage l'huile devient de goût rance et dégage des odeurs désagréables. De même, l'opération d'effeuillage est nécessaire et recommandée pour améliorer la qualité des huiles produites.

- La rapidité de traitement des olives : une fois récoltées les olives doivent être pressées le plus rapidement possible sous peine de perdre leur parfum. Du fait de sa composition en huile, l'olive s'abîme très vite une fois récoltée. Cette dégradation sera d'autant plus accentuée que le stockage sera long (plus de 48 heures) et effectué dans de mauvaises conditions. Ceci provoque des échauffements des olives et déclenche le processus de fermentation, augmentant le taux d'acidité.

- Le traitement thermique de l'olive affecte d'autres traits de la qualité, comme la stabilité oxydative, la composition en arôme et également un changement du contenu de pigment de l'huile d'olive vierge.

- La température d'extraction : l'extraction se fait à froid, car à partir de 25° C, les arômes sont modifiés. Par ailleurs, une température supérieure à 28° C au cours du broyage et du malaxage a un impact sur la qualité de l'huile. Ainsi un contact long entre la phase organique contenant l'huile et la phase aqueuse (margine), au cours de la décantation dans les procédés traditionnels d'extraction, conduit à des phénomènes d'oxydation.

- Le stockage et la conservation constituent des facteurs importants dans la qualité de l'huile destinée à la consommation. En effet, une fois l'huile obtenue, il est important de la stocker, à l'abri de la lumière et, dans un endroit frais et sec avec un minimum de contacts avec l'air, de préférence dans des récipients en acier inoxydable ou en verre et non en matière en plastique qui donne un mauvais goût à l'huile, ainsi les changements de température de conservation favorisent la dégradation de l'huile d'olive [21].

II.4.3 Influence de stockage sur la stabilité de l'huile d'olive :

Selon les conditions de stockage, l'huile d'olive est sujette à une oxydation qui peut avoir un impact plus ou moins important sur ses propriétés gustatives et nutritionnelles.

Il a été montré que la manière de stocker l'huile d'olive avait une influence sur sa composition en composés phénoliques et en acides gras.

Une étude a mesuré l'évolution sur 12 mois d'une huile d'olive stockée dans des conditions de température et de lumière définies (bouteilles ambrées, stockées dans le noir à température ambiante). Les résultats montrent qu'après 12 mois de stockage, il y'a une augmentation de 3% de l'acide oléique, liée à une diminution des acides gras polyinsaturés (30% d'oméga 3 en moins et 10% d'oméga 6 en moins), ainsi une diminution de la stabilité

durant le stockage spécialement pour les huiles issues des olives ramassées en états de maturité avancée.

Ces résultats confirment que le stockage diminue la stabilité de l'huile d'olive avec consommation en premier lieu de la vitamine E puis des phénols pour lutter contre l'oxydation. Cette oxydation se traduit au final par la perte des acides gras polyinsaturés et l'augmentation du pourcentage d'acide oléique. Cela se traduit aussi par une perte de l'amertume et des parfums, ainsi qu'un changement dans la couleur de l'huile d'olive (augmentation de l'indice de luminosité) [31].

Pour être nommée en tant que telle, une huile d'olive ne peut être obtenue que par des procédés physiques sans intervention de solvants. Cette définition est cependant incomplète et d'autres critères permettent de diviser les huiles en différentes sous-catégories.

II.5 Classification des huiles d'olive :

II.5.1 Huiles d'olive vierges :

Huiles obtenues à partir du fruit de l'olivier, uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions, thermiques notamment, qui n'entraînent pas l'altération de l'huile, et n'ayant subi traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration. Elles font l'objet du classement et des dénominations ci-après :

1. Huile d'olive extra vierge :

Huile d'olive vierge dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 0,8 gramme pour 100 grammes.

2. Huile d'olive vierge :

Huile d'olive vierge dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 2 grammes pour 100 grammes et dont les caractéristiques organoleptiques correspondent à celles prévues pour cette catégorie.

3. Huile d'olive vierge courante :

Huile d'olive vierge dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 3,3 grammes pour 100 grammes.

4. Huile d'olive vierge lampante :

(Non propre à la consommation en l'état) : huile d'olive dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est supérieure à 3,3 grammes pour 100 grammes et/ou dont les caractéristiques organoleptiques et les autres caractéristiques correspondent à celles prévues pour cette

catégorie. Elle est destinée au raffinage en vue de son utilisation pour la consommation humaine ou destinée à des usages techniques.

II.5.2 Huile d'olive raffinée :

Huile d'olive obtenue à partir des huiles d'olive vierges par des techniques de raffinage qui n'entraînent pas de modifications de la structure glycéridique initiale. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 0,3 gramme pour 100 grammes.

II.5.3 Huile d'olive :

Huile constituée par un coupage d'huile d'olive raffinées et d'huiles d'olive vierges propres à la consommation en l'état. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 1 gramme pour 100 grammes et ses autres caractéristiques correspondent à celles prévues pour cette catégorie.

II.5.4 Huiles de grignons d'olive :

Cette huile est obtenue par traitement aux solvants ou d'autres procédés physiques des grignons d'olive, à l'exclusion des huiles obtenues par des procédés de ré-estérification et de tout mélange avec des huiles d'autre nature. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 1,5 gramme pour 100 grammes.

De manière générale, pour être catégorisée en huile d'olive vierge extra, une huile ne doit présenter aucun défaut organoleptique, une très faible acidité et un très faible état d'oxydation. Ces caractéristiques assurent au consommateur l'achat d'un produit de qualité qui se conservera bien dans le temps [20].

II.6 Effets bénéfiques de l'huile d'olive sur la santé :

De nombreuses recherches récentes ont confirmé les bienfaits de l'huile d'olive pour la santé. Riche en acides gras insaturés (principale source d'énergie pour le corps humain), principalement l'acide oléique, en antioxydants (polyphénols), en vitamine E et autres constituants, l'huile d'olive diminue le risque des maladies cardiovasculaires, le taux du mauvais cholestérol (LDL) dans le sang et protège contre la formation de cellules cancérogènes [20, 21].

De récentes études épidémiologiques suggèrent que les composantes non-lipidiques de l'huile d'olive ont un très grand rôle à jouer dans la prévention de ces maladies. En Europe, la mortalité due aux cancers du sein et du colon est considérablement diminué dans les pays qui

consomment beaucoup d'huile d'olive (Grèce, Italie...) comparée aux pays qui en consomment peu.

Cette diminution des cancers semble être principalement due aux polyphénols et au squalène naturellement présents dans l'huile d'olive et qui jouent un rôle d'antioxydant très puissant. De plus la consommation, d'huile, d'olive dont la composition en acides gras est remarquable par la haute teneur en acides gras mono-insaturés (acide oléique principalement) semble avoir un impact positif chez les sujets diabétiques et hypercholestérolémiques [31].

II.6.1 Huile d'olive et coronaropathies :

Les maladies coronariennes sont liées à un certain nombre de facteurs de risques tel que le tabagisme, l'hypertension artérielle, l'obésité, le diabète, l'inactivité physique et l'hypercholestérolémie, parmi ces facteurs l'un des plus importants est le taux de cholestérol. Les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont les principales particules chargées du transport du cholestérol dans le plasma. Il est désormais très généralement admis qu'il existe une relation de causalité entre l'augmentation du taux de LDL, l'athérosclérose et les coronaropathies. La diminution du taux de cholestérol total entraîne une baisse significative de l'incidence des maladies cardiovasculaires. Ainsi, une baisse de 1% de cholestérolémie total réduit le risque coronarien de 2 à 3%. Des arguments de plus en plus nombreux semblent montrer que les LDL, dans leur forme native, ne sont pas nocives mais que, lorsqu'elles subissent des altérations du fait d'un processus appelé oxydation, elles deviennent un danger réel à l'intérieur de la paroi artérielle. La sensibilité des LDL à l'oxydation dépend de facteurs internes (endogènes) et externes (exogènes), parmi ces derniers, les facteurs nutritionnels, et en particulier les types d'acides gras et de vitamines antioxydantes apportés par l'alimentation, jouent un rôle extrêmement important. Divers travaux ont révélé que les graisses monoinsaturées sont meilleures que les polyinsaturées car elles réduisent les lipoprotéines de faible densité (LDL ou mauvais cholestérol), sans nuire aux lipoprotéines de haute densité (HDL) [24].

Notamment l'acide oléique, il abaisse l'oxydabilité des LDL. Chez l'homme une supplémentation de 50g/jour d'huile d'olive pendant une semaine réduit significativement l'oxydabilité des LDL et leur incorporation par une souche de macrophages, tandis que l'acide oléique incubé en présence de LDL inhibe de façon dose-dépendante l'oxydation des LDL [33]. La relative stabilité des acides gras mono-insaturés par rapport aux acides gras polyinsaturés en fait des molécules plus intéressantes si l'on veut limiter l'oxydation du cholestérol dans les LDL [20].

II.6.2 Huile d'olive, croissance osseuse et ostéoporose :

L'huile d'olive contient de l'acide oléique que l'on retrouve partout dans l'os et qui facilite l'absorption intestinale de calcium et de la vitamine D3, et des acides gras polyinsaturés qui sont essentiels à la croissance osseuse. Ces derniers interviendraient sur la croissance en longueur des os tandis que l'acide oléique favorise davantage leur croissance en épaisseur. Ainsi la consommation de l'huile d'olive favorise la minéralisation et le développement des os, elle augmente la densité osseuse et pourrait jouer un rôle dans la prévention de l'apparition de l'ostéoporose puisqu'elle protège l'os des pertes calciques liées à la ménopause et au vieillissement [24].

II.6.3 Huile d'olive et cancer :

Si les acides gras monoinsaturés semblent avoir un rôle prépondérant dans la protection des maladies cardiovasculaires, ce sont les acides gras polyinsaturés qui semblent plus impliqués dans la protection vis-à-vis de certains cancers. Dans le cas du cancer du sein de nombreuses études (cas témoins) ont montré une tendance à la baisse du risque d'apparition du cancer du sein avant et après ménopause. Des études de cohorte utilisant des biomarqueurs sanguins (phospholipides sériques) ont montré une forte association entre apport en AGPI (acides gras polyinsaturés) et baisse du risque de cancer chez la femme ménopausée. Des discordances entre des études existent cependant, notamment en fonction du type de prélèvement. Cela peut être dû au fait que les prélèvements sériques ne reflètent que les profils alimentaires des quelques jours précédents alors que la demi-vie des acides gras du tissu adipeux est d'environ 2 ans. Un changement récent des habitudes alimentaires pourra donc être rapidement visualisé au niveau sérique mais pas au niveau des tissus adipeux [20].

III.1 Matériel

III.1.1 Les souches bactériennes

Le choix des bactéries a été porté sur quatre souches fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces constituent un problème majeur de santé publique par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens.

Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries :

Des bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Klebsiella pneumoniae*, qui a été isolée à partir de prélèvements de malades au niveau du laboratoire de bactériologie, Hôpital "Ibn Zohr" Guelma.

Des bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

(ATCC: American Type Culture Collection).

III.1.2 Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont :

- Gélose nutritive pour le repiquage des souches bactériennes testées.
- Gélose Muller Hinton (gélose MH) qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.
- Bouillon MH pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

III.1.3 L'huile d'olive

L'étude a porté sur deux échantillons prélevés durant la saison 2012 et répartis comme suit :

Un échantillon provenant de la commune d'EL djamaa, de la daïra de sidi Abdel Aziz, wilaya de Jijel, et l'autre de la commune de Bouati Mahmoud, wilaya de Guelma. Les échantillons de l'huile d'olive sont mis dans des flacons en verre foncé propres et secs d'une taille minimale de 250 ml munis de bouchon, et placés à l'abri de la lumière. Une étiquette est collée sur chaque flacon indiquant l'origine de chaque échantillon.

III.1.4 Les antibiotiques

Les disques d'antibiotiques, utilisés pour les tests de sensibilité, sont l'érythromycine (30µg), la vancomycine (30µg), la tétracycline (30µg), la cefotaxime (30µg), la lincomycine (30µg), la rifampicine (30µg) et la gentamicine (10µg). L'antibiotique utilisé pour la réalisation de la gamme de dilution est la gentamicine : un antibiotique de la famille des aminosides. Il est sous forme d'une solution injectable à 80 mg /2 ml dans une ampoule de 2 ml. Sa dilution est effectuée dans l'eau distillée stérile.

Le choix des antibiotiques a été fait en se basant sur la liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes (parmi lesquelles les quatre souches étudiées), qui se trouve dans la 5^{ème} édition de la standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS [34].

III.2 Méthodes

III.2.1 Méthodes chimiques

Cette partie a été réalisée au niveau de laboratoire d'analyses industrielles et génie des matériaux (LAIGM) de l'université de Guelma par le professeur OUMEDDOUR Rabah et Dr. NIGRI Soraya.

1. Détermination de l'indice d'acide (I_A)

L'acidité correspond à la teneur en pourcentage d'acide gras (exprimée en acide oléique) présent dans l'huile d'olive et représente un paramètre important dans l'évaluation de sa qualité.

Le principe repose sur la neutralisation des acides gras à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium de normalité 0,5 N.

La détermination est effectuée sur les deux échantillons de l'huile d'olive. 6g d'huile d'olive est dissout dans 100ml du mélange éthanol/toluène (V/V), puis titré, en agitant, avec la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 0,1N en présence de 0,3ml de la solution de phénolphaléine à 1% dans l'éthanol, jusqu'à virage de l'indicateur (coloration rose).

L'acidité, exprimée en pourcentage est égale à :

$$\text{Acidité} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m} \text{ où :}$$

V : le volume en ml de la solution titrée de KOH utilisé, C : la concentration exacte, en moles/litre, de la solution titrée de KOH utilisé, M : le poids molaire, en g/mole, de l'acide adopté pour l'expression du résultat (=282 g/mole), m : la prise d'essai en grammes [21].

2. Analyse spectrale de l'huile d'olive par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions

chimiques présentes dans le matériau à analyser. Les spectromètres IRTF fournissent, à l'aide des interféromètres, une plus grande énergie à l'échantillon [35].

• L'appareillage

Le spectromètre utilisé pour l'analyse des échantillons de l'huile d'olive est le Spectrum one de Perkin Elmer piloté par un micro-ordinateur muni d'un logiciel d'acquisition des données spectroscopiques permettant l'enregistrement des spectres dans le moyen infrarouge (longueur d'onde de 450 à 4000 cm^{-1}) et en fonction de la combinaison source/séparatrice/détecteur utilisée.

Le mode d'acquisition employé dans cette étude est en transmittance en utilisant comme porte échantillon deux pastilles en KBr.

Une goutte fine d'huile est déposée et bien étalée sur la surface centrale de la pastille de KBr à l'aide d'un tube capillaire. Le nettoyage des pastilles après chaque mesure est effectué avec du chloroforme. Après collections des données, les spectres IRTF obtenus seront traités.

III.2.2 Méthodes microbiologiques

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie, Université 08 Mai 45 pendant la période allant de Février à Avril 2013.

1. Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure des bactéries à tester (ayant au maximum 24h), quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur scellée.

L'anse ou la pipette pasteur est déchargée dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % (voir annexe b 02), le tout est bien homogénéisé et l'opacité de la suspension bactérienne doit être équivalente à 0.5 McFarland ou à une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm (voir annexe a 02). Cet étalon s'est préparé en versant 0.5 ml d'une solution de BaCl_2 dihydraté à 1% dans une éprouvette, et le volume final de 100 ml est complété avec du H_2SO_4 à 1%. Ainsi l'étalon doit présenter une DO de 0.08 à 0.1 lue à 625 nm, et l'ajustement de l'inoculum est fait, soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou l'eau physiologique stérile, s'il est trop fort.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum [03,34].

2. Essais préliminaires

Trois tests préliminaires ont été fait :

2.1 Antibiogramme

L'antibiogramme doit être réalisé en milieu de Muller Hinton (gélose) de composition elle-même standardisée (pH 7.4, concentration en tymidine < 50ng/ml, concentration ajustée en Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺). L'épaisseur de la gélose doit être de 4mm. L'ensemencement est réalisé par inondation de la gélose par quelques millilitres de l'inoculum. Les boîtes doivent être séchées 15 minutes à 37°C avant de déposer les disques [09]. L'antibiogramme a été fait pour sélectionner l'antibiotique pour lequel les souches étudiées sont sensibles.

2.2 Test de l'activité antibactérienne de l'éthanol à 60°

Cette étape a été faite par deux méthodes :

2.2.1 Par incorporation directe dans le milieu de culture

2 ml de l'éthanol est met dans une boîte de Pétri en lui rajoutant 18 ml du milieu de culture Muller Hinton fondu, puis le mélange est homogénéisé par mouvements rotatoires. Les boîtes de Pétri sont laissées sécher plus longtemps pour éviter la formation des gouttelettes d'eau, ensuite elles sontensemencées par le même inoculum préparé pour l'antibiogramme, à l'aide d'une pipette pasteur par la technique de stries. Une boîteensemencée sans l'addition d'éthanol est utilisée comme témoin positif

Enfin, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures, et la lecture se fait en observant s'il y a une culture visible ou pas.

2.2.2 Par la méthode de diffusion par disque

Le principe de cette méthode sera expliqué ultérieurement. Les bactéries tests sontensemencées par écouvillons stériles sur le milieu Muller-Hinton.

Un l'écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis on a l'essoré en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

La totalité de la surface gélosée, sèche, est frottée par l'écouvillon de haut en bas, en stries serrées, et l'opération est répéter deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois. Enfin, les disques imprégnés par de l'éthanol 60° sont déposés à la surface de la gélose. La lecture se fait par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques [03].

2.3 Test de l'activité antibactérienne de l'huile d'olive par la méthode de diffusion par disque

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, lorsqu'un disque chargé de l'antimicrobien à tester est déposé à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé par une suspension bactérienne, l'antimicrobien diffuse spontanément en établissant un gradient de concentration : il s'établit alors une compétition entre la diffusion de l'antimicrobien et la vitesse de croissance bactérienne autour du disque [09]. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition (figure III.1).

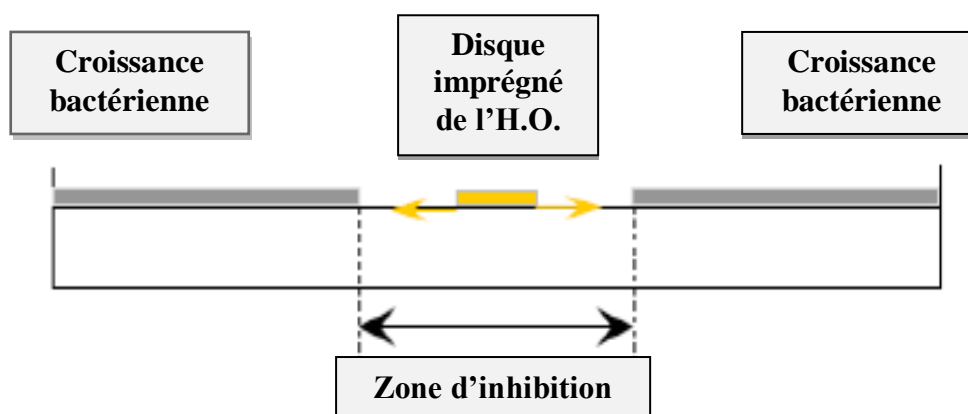


Fig. III.1 : Principe de la méthode de diffusion par disque [36].

Pour accomplir ce test une préparation des concentrations décroissantes de l'huile d'olive est une étape incontournable du fait que l'huile d'olive pose un problème de diffusion, d'homogénéité et de dispersion dans les milieux de culture aqueux à cause de leur faible solubilité. Ce problème a été résolu par l'utilisation de l'éthanol comme solvant.

Les différentes concentrations de l'huile d'olive, sont préparées aseptiquement dans l'éthanol 60° [03]. L'activité antibactérienne de l'éthanol a été préalablement testée.

Les dilutions utilisées sont des dilutions successives décimales de raison $10 : 10^{-1}$, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} , avec la solution mère (SM) qui est le mélange de 1 ml de l'huile d'olive pure avec 9 ml du diluant (l'éthanol 60°) [37].

La dilution de la gentamicine a été faite de la même manière, sauf que le diluant dans ce cas soit l'eau distillée stérile.

2.3.1 Ensemencement

L'ensemencement est réalisé par inondation sur boîtes Pétri sur une épaisseur de 4 mm contenant de la gélose Muller Hinton (MH). La gélose est séchée avant emploi.

2.3.2 Dépôt de disques

Les disques sont fabriqués à partir de papier Wattman n°3 avec un diamètre de 6 mm, ensuite ils sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'autoclave.

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque et l'imbiber avec l'huile d'olive (à différentes concentrations) jusqu'à l'imprégnation totale du disque, puis le déposer sur la gélose.

Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 mn, et mises à l'étuve à la température de 37°C pendant 24 heures.

3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante de l'antimicrobien à tester (l'huile d'olive, la gentamicine ou la combinaison entre les deux). Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice), qui correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Les tubes sont inoculés avec 50 µl de suspension bactérienne par tube.

Pour chaque série, un témoin sans aucun antimicrobien est réalisé, et les tubes sont bouchés et incubés de 18 h à 24 h dans un bain Marie à 37° sous agitation [36].

4. Evaluation de l'effet de la combinaison entre l'huile d'olive et la gentamicine

L'effet de l'association a été examiné :

4.1 En milieu liquide

Par le dénombrement à intervalles réguliers (2 h) les bactéries survivantes dans 4 tubes en calculant la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre visible (JENWAY 6305, spectrophotometer) [09], puisque d'après Davis et *al.* [38], le nombre de cellules peut être facilement estimé par mesure de la lumière diffusée à 600 nm du fait que la lecture de la DO est linéaire avec le nombre de cellules bactériennes : 1 DO/ml = 8×10^8 cellules/ml.

Quatre tubes ont été préparés :

- Tube contenant l'association huile d'olive/gentamicine (v/v) de dilution égale à 10^{-1} , et en même volume : 225 µl de chacun des deux et en complétant par le bouillon MH jusqu'à 5 ml.
- Tube contenant 450 µl de la gentamicine seul et 4.5 ml du bouillon MH.

- Tube contenant 450 µl de l'huile d'olive seulet 4.5 ml du bouillon MH.
- Tube témoin ne contenant ni de l'huile d'olive ni de la gentamicine.

Inoculer tous les tubes avec 50 µl de la suspension bactérienne.

Le volume final dans chaque tube est de 5 ml, l'essai est répété trois fois.

4.2 En milieu solide

En utilisant la méthode de diffusion par disque en milieu solide [09], l'effet de l'association a été étudié en mélangeant 1 ml de la gentamicine à 10^{-1} et le même volume de l'huile d'olive à la même dilution.

Quatre disques sont déposés par boîte Pétri, ils sont imprégnés par les solutions suivante:

- ✓ L'eau distillée, utilisée comme témoin négatif.
- ✓ L'huile d'olive à 10^{-1} .
- ✓ La gentamicine à 10^{-1} .
- ✓ La combinaison des deux.

L'objectif de ce travail a été de rechercher *in vitro* l'interaction entre l'huile d'olive (considérée comme traitement précieux naturel) et la gentamicine (antibiotique traditionnel) lorsqu'elles sont utilisées en combinaison, contre quatre souches : à Gram positive : *Staphylococcus aureus* et à Gram négative *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Tout d'abord la détermination de l'activité antibactérienne de l'huile d'olive par la méthode des disques, nous a permis d'évaluer la croissance des souches bactériennes par la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

L'activité antibactérienne de l'huile d'olive trouvée est due principalement aux composés phénoliques : l'hydroxytyrosol, l'oleuropeine et le tyrosol contenues dans l'huile d'olive extra vierge. Ces résultats suggèrent que l'huile d'olive se positionne comme un agent antibactérien prometteur pour le traitement des infections intestinales et respiratoires ainsi que les maladies dyspeptiques de même elle peut avoir des applications importantes dans l'avenir à cause de ses effets bénéfiques sur la santé humaine.

L'interaction de l'huile d'olive avec la gentamicine a indiqué principalement une réaction antagoniste entre ces deux antimicrobiens, caractérisée par une inhibition de l'action de la gentamicine par l'huile d'olive. Mais le mécanisme d'action exact reste mal connu.

Enfin, l'huile d'olive pourrait être un composant miracle dans certains aliments et capable d'exercer un effet protecteur contre les bactéries pathogènes.

Par conséquent certaines thérapies naturelles contenant des huiles d'olive doivent être utilisées avec prudence lorsqu'elles sont combinées avec des antibiotiques.

A la lumière de ces résultats, il serait très intéressant d'approfondir cette étude par la mise en évidence de l'ensemble des constituants de l'huile d'olive, de rechercher le produit qui agit sur l'effet de l'antibiotique et plus encore, comprendre le mécanisme de compétition entre les deux et le niveau de cette compétition chez la bactérie.