

République algérienne démocratique et populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université a. Mira de Bejaia



Faculté de Technologie  
Département de Génie des procédés

# Mémoire

## EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE Master

Domaine : Science et Technologie Filière : Génie des Procédés  
Spécialité : Génie alimentaire

Présenté par

**SAIDI Syhem et AISSOU Samra**

*Thème*

*Elaboration et caractérisation des films d'emballage alimentaire  
à base de PLA et d'extrait d'Olea europaea*

Soutenue le 29/06/2022

Devant le jury composé de :

| Nom et Prénom   | Grade     |                      |               |
|-----------------|-----------|----------------------|---------------|
| Mr. AZZOUG M.   | MCA       | Université de Bejaia | Président     |
| Mme. CHIBANI N. | MCA       | Université de Bejaia | Examineur     |
| Mr. FATMI S.    | MCA       | Université de Bejaia | Encadrant     |
| Mme. Harrate I. | Doctorant | Université de Bejaia | Co- Encadrant |

Année Universitaire : 2021/2022

## **Remerciements**

*On remercie le bon Dieu de nous avoir donné le savoir et la force de pouvoir réaliser ce travail.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre promoteur **MR. FATMI S** et à notre Co-promotrice **Mme HARRATE I** qui nous ont permis de bénéficier de la qualité de leurs encadrement, les conseils qu'elles nous ont prodiguées, la patience et la confiance qu'elles nous ont témoignées.*

*Nos vifs remerciements vont au **Mr. AZZOUG M** d'avoir accepté la présidence du jury, nous tenons compte à exprimer toute nos reconnaissances au **Mme. CHIBANI N** qui nous a fait l'honneur d'examiner notre travail, leurs regards critiques ne sauront que rehausser le niveau de notre savoir-faire.*

*On présente nos remerciements à **Mme BENSIDHOUM L** pour son aide et disponibilité. Merci également aux techniciens du Département de Génie des Procédés sans qui ce mémoire ne serait pas illustré de si beaux spectres infrarouge et d'UV-visible. On s'adresse plus particulièrement à la technicienne de laboratoire de Génie des Procédés de l'Environnement **Mme MERABET K** qui nous a toujours mis à l'aise dans le laboratoire. On tient à remercier aussi tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette étude.*

## **DEDICAS**

*Je dédise ce travail à mes parents pour leur soutien et leurs encouragements sans faille tout au long de mon parcours scolaire mais aussi personnel. Aucun mot ne serait exprimer tout mon amour et toute ma gratitude, merci pour vos sacrifices le long de ces années merci pour vos présence rassurante, et si j'en suis arrivé là s'est grâce a vous. J'espère le bon dieu les gardes, les combles de santé et leurs une longue vie.*

*A mon père « Abdelkader » pour son patient avec moi et son encouragement*

*A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère « Saliha » que le bon ALLAH vous garde en bonne santé*

*A ma chère sœur Rima*

*A mes chers frères Yassine, Youba, Ghouleme Eddine*

*A ma petite chère Assile*

*A ma binôme Samra*

*A mes très chères amies Nadine, Wahiba, Nessrine*

*A mes chères cousines Hania, Kahina, Widade, Lynda*

*A ma famille, Mes grands-parents, Oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand sans exception.*

*A toute la promotion Master Génie alimentaire 2021-2022, et à toutes les personnes que j'aime... A tous ce qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin*

## **DEDICAS**

*Je dédise ce travail à mes parents pour leur soutien et leurs encouragements sans faille tout au long de mon parcours scolaire mais aussi personnel. Aucun mot ne serait exprimer tout mon amour et toute ma gratitude, merci pour vos sacrifices le long de ces années merci pour vos présence rassurante, et si j'en suis arrivé là s'est grâce a vous. J'espère le bon dieu les gardes, les combles de santé et leurs une longue vie.*

*A mon père « Bachir» pour son patient avec moi et son encouragement*

*A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère « Zahia » que le bon ALLAH vous garde en bonne santé*

*A mes chères sœurs Karima, Kahina*

*A mes chers frères Hamza, Islem*

*A ma binôme Syhem*

*A mes très chères amies Nadine, Wahiba, Nessrine*

*A mes chères cousines Amina, Chaima*

*A ma famille, Mes grands-parents, Oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand sans exception.*

*A toute la promotion Master Génie alimentaire 2021-2022, et à toutes les personnes que j'aime... A tous ce qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin*

## Liste des figures

- Figure 1 :** Transfert de la matière entre aliment et emballage
- Figure 2 :** matrice des bioplastiques
- Figure 3 :** Les différentes familles de biopolymères.
- Figure 4 :** structure chimique du poly(acide lactique).
- Figure 5 :** Les monomères optiques de l'acide lactique.
- Figure 6 :** Types de matériaux en PLA utilisés dans le domaine de la médecine
- Figure 7 :** Types de matériaux en PLA utilisés dans le domaine de l'emballage alimentaire.
- Figure 8 :** Olivearie
- Figure 9 :** Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde
- Figure 10 :** Distribution naturel du complexe *Olea europea* dans le monde
- Figure 11 :** Carte oléicole d'Algérie
- Figure 12 :** Formules brute et chimique d'une fonction phénol
- Figure 13 :** Effets biologiques des polyphénols.
- Figure 14:** PLA sous forme de granulés.
- Figure 15 :** Evaporateur rotatif (rota vapeur).
- Figure 16 :** Appareil Infrarouge.
- Figure 17 :** Réaction de chlorure d'aluminium et des flavonoïdes.
- Figure 18 :** Appareil d'UV.
- Figure 19 :** Réduction du radical DPPH par un antioxydant.
- Figure 20 :** Mise en évidence de l'effet antibactérienne de l'extrait des feuilles d'oliviers.
- Figure 21 :** Mise en évidence de l'effet antifongique de l'extrait des feuilles d'oliviers.
- Figure 22 :** Test d'absorption d'eau.
- Figure 23:** Mise en évidence de l'effet antifongique des films.

**Figure 24 :** Histogramme de teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier.

**Figure 25 :** Histogramme de DPPH de l'extrait éthanolique de l'extrait des feuilles d'olivier.

**Figure 26 :** Spectre infrarouge d'extrait et la poudre des feuilles d'olivier.

**Figure 27:** Histogramme des diamètres d'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO.

**Figure 28 :** Images de l'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO pour la bactérie *Bacillus subtilis*.

**Figure 29 :** Images de l'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO pour la bactérie *Klebsiella pneumoniae*.

**Figure 30 :** Images de l'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO pour la bactérie *Staphylococcus clinique*.

**Figure 31 :** Images de l'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO par la bactérie *Staphylococcus aureus*.

**Figure 32 :** Images du test d'inhibition de la croissance antifongique par l'extrait des feuilles d'olivier.

**Figure 33:** Spectre infrarouge films PLA/EFO.

**Figure 34 :** Histogramme représentant le Test d'absorption d'eau.

**Figure 35 :** Contrainte/allongement du PLA vierge.

**Figure 36 :** Contrainte/allongement du PLA à 3% d'extrait.

**Figure 37 :** Contrainte/allongement du PLA à 6% d'extrait.

**Figure 38 :** Contrainte/allongement du PLA à 9% d'extrait.

**Figure 39 :** les résultats antibactériens des films pour la bactérie *Bacillus subtilis*.

**Figure 40 :** les résultats antibactériens des films pour la bactérie *Klebsiella pneumoniae*.

**Figure 41:** les résultats antibactériens des films pour la bactérie *Staphylococcus clinique*.

**Figure 42:** les résultats antibactériens des films pour la bactérie *Staphylococcus aureus*.

**Figure 43 :** Résultats antifongique des films pour la souche *penicillium sp.*

**Figure 44 :** Résultats antifongique des films pour la souche *Aspergillus niger.*

## Liste des Tableaux

**Tableau 1.** Propriétés spécifiques de quelques bio polymères et les applications attendues.

**Tableau 2.** Propriétés mécaniques et thermiques du PLA.

**Tableau 3.** Composition chimique global des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g) selon plusieurs auteurs.

**Tableau 4.** Composition chimique des feuilles d'olivier sauvages "*Olea europaea* var *sylvestris*".

**Tableau 5 :** Les principales propriétés physiques du PLA.

**Tableau 6 :** Les souches microbiennes testées.

**Tableau 7:** Activité anti bactérienne par l'EFO.

**Tableau 8:** le poids sèche et le poids humide des films de l'extrait des feuilles d'oliviers pour les différentes concentrations.

**Tableau 9 :** comparaison des propriétés mécaniques.

## Liste des abréviations

**PLA** : Polylactic acid.

**PE** : Polyéthylène.

**PP** : Polypropylène.

**PET** : Polyéthylène téréphtalate.

**PS** : Polystyrène.

**DPPH** : Diphénylpicrylhydrazyle.

**EFO** : Extrait feuille d'olivier.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde.

**MH** : Muller Hinton.

**L<sub>0</sub>** : Espacement initial entre les pinces de préhension en mm.

**h** : Epaisseur mesuré de l'éprouvette en  $\mu\text{m}$ .

**b** : Largeur de l'éprouvette.

**$\sigma_x$**  : Contrainte à  $\epsilon=1\%$ .

**E<sub>t</sub>** : Module de traction.

**$\sigma_y$**  : Contrainte d'élasticité.

**$\sigma_m$**  : Résistance à la traction (Contrainte nominale).

**$\sigma_b$**  : Contrainte à la rupture.

**$\Sigma_y$**  : Allongement élastique.

**$\Sigma_m$**  : Allongement à la contrainte nominal.

**$\Sigma_{tb}$**  : Allongement nominal à la rupture.

## *Sommaire*

|  |          |
|--|----------|
| Liste des tableaux   |          |
| Liste des abréviations   |          |
| Introduction .....   | 1        |
| <b>Chapitre I: Etudes bibliographiques .....</b>                           | <b>3</b> |
| I.1 Généralités sur l'emballage alimentaire .....                          | 3        |
| I.1.1. Introduction .....  | 3        |
| 1.1.2. Définition d'un emballage .....                                     | 3        |
| 1.1.3. Les différents types d'emballage .....                              | 3        |
| 1.1.4. Les fonctions de l'emballage .....                                  | 4        |
| 1.1.5. Les matériaux d'emballages alimentaires .....                       | 5        |
| 1.1.6. Interaction contenant/contenu dans l'emballage .....                | 5        |
| I.2 Généralité sur les bio-polymères .....                                 | 8        |
| 1.2.1 Définitions .....  | 8        |
| 1.2.2. Classification des biopolymères .....                               | 8        |
| 1.2.2.1. Polymères biodégradables issus de la pétrochimie .....            | 9        |
| 1.2.2.2. Polymères biodégradables issus des ressources renouvelables ..... | 9        |
| 1.2.3. Propriétés des bio-polymères .....                                  | 11       |
| 1.3. Poly (acide lactique) PLA .....                                       | 12       |
| 1.3.1 Définition.....  | 12       |
| 1.3.2. Composition chimique.....   | 13       |
| 1.3.3. Source de l'acide lactique.....                                     | 13       |
| 1.3.4. Propriétés du PLA .....   | 14       |
| 1.3.4.1. Propriété mécanique et physique .....                             | 14       |
| 1.3.4.2. Propriétés thermiques .....                                       | 14       |
| 1.3.5. Applications du PLA .....   | 15       |
| 1.3.5.1 Application textile .....  | 16       |

|   |    |
|---|----|
| 1.3.5.2. Application médicale .....                                       | 16 |
| 1.3.5.3 Emballages .....  | 17 |
| I.4. Olea europaea .....  | 19 |
| I.4.1.L'olivier.....  | 19 |
| I.4.1.1.Classification botanique .....                                    | 19 |
| I.4.2. Répartition géographique .....                                     | 20 |
| I.4.2.1.Dans le monde .....   | 20 |
| I.4.2.2. En Algérie .....   | 21 |
| I.5. Les feuille d'olivier .....  | 22 |
| I.5.1. Biomasse énorme .....  | 22 |
| I.5.2. Composition des feuilles d'olivier .....                           | 22 |
| I.5.3. Usage traditionnel des feuilles d'olivier .....                    | 25 |
| I.6. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier .....                | 25 |
| I.6.1. Généralité sur les composés phénoliques .....                      | 25 |
| I.6.1.1. Définition et localisation des composés phénoliques.....         | 25 |
| I.6.1.2. Activités biologiques des composés phénoliques .....             | 26 |
| I.6.2.1. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques ..... | 27 |
| I.6.3.1. Préparation pré-extraction des échantillons de plante.....       | 28 |
| I.7. Les techniques d'extraction des polyphénols.....                     | 28 |
| I.8. Méthodes d'extraction des composés phénoliques .....                 | 28 |
| I.8.1. Infusion .....   | 28 |
| I.8.2. Décoction .....  | 29 |
| I.8.3. Macération.....  | 29 |
| I.8.4. Distillation.....  | 29 |
| I.8.5. Soxhlet.....   | 29 |
| I.9. Autres techniques .....  | 30 |

## Chapitre II : Matériel et Méthode

|  |    |
|--|----|
| II.1. Présentation des produits utilisés .....   | 31 |
| II.1.1. Acide poly lactique (PLA) .....  | 31 |
| II.1.2.Extrait des feuilles d'olivier.....   | 32 |
| II.1.3. Chloroforme .....  | 32 |
| II.1.4. Alcool éthanolique .....   | 33 |
| II.2. Matériel biologique .....  | 33 |
| II.2.1. Souches bactériennes .....   | 33 |
| II.2.2. Souches fongiques .....  | 34 |
| II.3. Méthodes expérimentales .....  | 34 |
| II.3.1. Nettoyage et broyage des feuilles d'olivier .....                                | 34 |
| II.3.2. Extraction des feuilles d'olivier .....  | 35 |
| II.3.3. Techniques de caractérisation .....  | 35 |
| II.3.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (IRTF) .....              | 35 |
| II.3.3.3. Evaluation de l'activité antioxydant de l'extrait des feuilles d'olivier ..... | 37 |
| II.3.3.3.1. Dosage des composés phénoliques .....  | 37 |
| II.3.3.3.2. Mesure de l'activité anti-oxydante .....                                     | 39 |
| II.3.3.4. Test d'activité antimicrobienne .....  | 41 |
| II.3.3.4.1. Activité antibactérienne .....   | 41 |
| II.3.3.5. Activité antifongique .....  | 42 |
| II.3.4. Préparation des essais (films de PLA / feuilles d'olivier) .....                 | 43 |
| II.3.4.1. Test d'absorption d'eau .....  | 43 |
| II.3.4.2. Test de traction.....  | 44 |
| II.3.4.3. Test d'activité antibactérienne .....  | 47 |
| II.3.4.4. Activité antifongique .....  | 47 |

## Chapitre III : Résultats et discussion

|  |    |
|--|----|
| III .1. Résultats de la teneur en composés phénoliques EFO .....   | 48 |
| III.1.1. La teneur en polyphénols totaux.....  | 48 |
| III.1.2. La teneur en flavonoïdes .....  | 48 |
| III.1.3. La teneur en tanins condensés .....   | 48 |
| III.1.4. Activité antioxydante.....  | 49 |
| III.1.4.1. Effet de piégeage du radical DPPH .....   | 49 |
| III.1.5. Résultats d'analyse spectrométrique à transformation de Fourier IR .....                                | 50 |
| III.1.6. Résultats d'évaluation de l'activité antibactérienne .....  | 52 |
| III.1.7. Résultats d'évaluation de l'activité antifongique de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier ..... | 55 |
| III.2. Films PLA / EFO .....   | 57 |
| III.2.1. Analyse spectrométrique à transformation de Fourier IR .....  | 57 |
| III.2 .2. Taux d'absorption d'eau.....   | 58 |
| III.2.3 Résultats du test d'attraction .....   | 60 |
| III.2.4. Résultats du test d'activité antibactérienne des films .....  | 61 |
| III.2.5. Résultats du test d'activité antifongique des films .....   | 63 |
| Conclusion.....  | 67 |

# Introduction

## **Introduction**

L'emballage des aliments occupe aujourd'hui une place prépondérante dans les procédés de transformation/conditionnement notamment grâce à une demande accrue pour des produits alimentaires pratiques (à emporter et à préparer), de plus longue conservation (réduction de la fréquence d'achat) et présentant de meilleures qualités organoleptiques et nutritionnelles (réduction de l'usage d'additifs ou de procédés de conservation dénaturant). Cependant, au cours des dernières années, les problèmes environnementaux sont de plus en plus préoccupants. En effet, les polymères principalement utilisés dans les emballages plastiques proviennent de sources non renouvelables et ne sont pas biodégradables [1].

Un des rôles essentiels de l'emballage est d'assurer une bonne protection du produit qu'il contient. Cependant, si l'emballage évite les pollutions, les contaminations extérieures que pourraient subir les produits emballés ; s'il permet de contribuer au maintien de la qualité et de la sécurité, il faut également que le matériau utilisé soit plus ou moins inerte, c'est-à-dire ne risque pas de perturber le produit venant au contact dans les mêmes termes de sécurité comme de qualité sensorielle [1].

En réponse à ces nombreuses préoccupations environnementales et dans un souci d'image, de nombreux fabricants proposent depuis quelques années des emballages qu'ils présentent comme étant plus respectueux de l'environnement. L'essai portera sur les emballages fabriqués avec des bioplastiques biodégradables, compo stables et biosourcés qui sont des exemples de matériaux ainsi mis de l'avant par l'industrie et qui sont en forte croissance depuis ces dernières années. Les bioplastiques proviennent en grande majorité de ressources renouvelables et plusieurs d'entre eux se biodégradent [2].

Parmi les polymères biodégradables, le polyacide lactique (PLA) il a reçu un intérêt considérable durant les dernières années. C'est un polyester aliphatique issu de ressources renouvelable qui possède des propriétés comparable à celle des plastiques pétrochimiques. A cause de sa biodégradabilité et biocompatibilité, il peut être dégradé en dioxyde de carbone, eau et méthane dans l'environnement pendant une période allant de quelques mois à deux ans, il a été surtout utilisé dans des applications biomédicales [3].

Afin d'améliorer les propriétés physico-chimiques, mécaniques et microbiologiques du PLA en vue de son application dans le domaine de l'emballage alimentaire les chercheurs se

sont intéressés à l'incorporation des extraits des matières végétales ayant des propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydants... [4]

L'objectif de ce travail est, dans un premier temps est de mettre, en évidence les modifications des films polymères en ajoutant l'extrait des feuille d'olivier, puis dans un second temps, évaluer l'effet antibactérien et anti fongique de ces films plastique.

Ce mémoire est divisé en trois principaux chapitres :

Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique, dans laquelle nous avons parlé sur l'emballage alimentaire en général, ensuite sur les bio-polymères particulièrement le polyacide lactique(PLA) et Olea-europea ainsi que les techniques d'extraction phénolique des feuilles d'oliviers

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude expérimentale, tout d'abord on a commencé par la méthode d'extraction de l'extrait des feuilles d'oliviers puis la préparation des films alimentaires à base de ce dernier avec l'acide poly-lactique.

Le dernier chapitre consiste à discuter les principaux résultats obtenus dans notre recherche et on termine par une conclusion générale.

Chapitre I  
**Chapitre I**  
Etudes bibliographiques  
**Etudes bibliographiques**

## **Chapitre I: Etudes bibliographiques**

### **I.1 Généralités sur l'emballage alimentaire**

#### **I.1.1. Introduction**

Avec le développement scientifique et les avancées technologiques récentes en matière de conservation des aliments, l'industrie des emballages alimentaires n'a cessé de se développer pour d'une part, suivre ces développements, et d'autre part, répondre aux exigences croissantes du consommateur [5].

#### **I.1.2. Définition d'un emballage**

Les emballages alimentaires sont essentiels et omniprésents car presque tous les aliments sont emballés d'une manière ou d'une autre. Sans emballage, la sécurité et la qualité des aliments seraient compromises [6]. L'emballage est une structure adaptée à un produit, conçu pour retarder et protéger les aliments contre la détérioration chimique, biologique et physique prolonger la durée de conservation, maintenir, augmenter et assurer la qualité et la sécurité des produits [7]. L'emballage alimentaire peut également être défini comme une couche extérieure supplémentaire d'un produit particulier, qui devrait faciliter sa protection contre les facteurs externes, le mouvement, le stockage pendant la période de la vente et de l'utilisation. Certains exemples de facteurs chimiques qui peuvent affecter négativement les aliments comprennent l'exposition aux gaz, à l'humidité et à la lumière. Les emballages offrent également une protection biologique contre les micro-organismes, les insectes, les rongeurs et autres animaux nuisibles ainsi que la protection physique contre les dommages mécaniques, les chocs et les vibrations pendant le transport et la distribution [8].

#### **I.1.3. Les différents types d'emballage**

Selon jeant il y a trois types d'emballages :

- **L'emballage de vente** (emballage primaire) : conçu de manière à constituer, au point de vente, un article destiné à l'utilisateur final ou au consommateur. Exemple : les pots de yaourts en plastique, en verre ou en carton ciré qui contiennent le produit.
- **L'emballage groupé** (emballage secondaire) : regroupe un certain nombre d'unité de vente, destinées à l'utilisateur final ou au consommateur ; il peut être enlevé du

produit sans en modifier les caractéristiques. Exemple : le carton autour des yaourts les regroupant par lots de 4,8 ou 12.

- **L'emballage de transport** (emballage tertiaire) : facilite la manutention et le transport d'un certain nombre d'unités de vente ou d'emballage groupés en vue d'éviter leur manipulation physique et les dommages liés au transport. Ce sont les cartons, les houssages plastiques qui recourent la palette de produit [9].

#### **1.1.4. Les fonctions de l'emballage**

Parmi les fonctions de l'emballage en site :

- **Une fonction de contenant**: l'emballage est avant tout un récipient, associé à des servitudes métrologiques réglementaires (obligation de l'indication exacte de la masse ou de volume contenu) ;
- **Une fonction de présentation** : visant à retenir l'attention et à séduire l'acheteur dans le linéaire de distribution (c'est la fonction qui intéresse les services marketing)
- **Une fonction d'information** : par l'étiquetage, de plus en plus importante, associée à des servitudes réglementaires quant aux types d'information et à la loyauté des renseignements donnés.
- **Une fonction de service** : dans la mesure où l'emballage apporte un service spécifique : flacon pulvérisateur, flacon saupoudreur, boîte auto-chauffante, etc. La notion de service s'étend également à la commodité d'emploi, notamment à la facilité d'ouverture sans outils particuliers.
- **Une fonction de sécurité alimentaire** : protection vis-à-vis d'une contamination ou d'une pollution délictueuse.
- **Une fonction de protection physique** : vis-à-vis des chocs mécaniques (manutentions, palettisation, transport), des variations de température (emballage isotherme), de la lumière (matériaux filtrant les UV par exemple).
- Enfin, **la fonction principale : celle d'auxiliaire technologique de conservation et de protection de la qualité** du produit alimentaire contre les agents extérieurs d'altération physico-chimique et biochimique des aliments, associée à une obligation d'innocuité toxicologique et d'inertie chimique des matériaux constituant l'emballage vis-à-vis de son contenu (problème de transferts) [10].

### **1.1.5. Les matériaux d'emballages alimentaires**

L'industrie de l'emballage se compose de différents secteurs en fonction des matières utilisées :

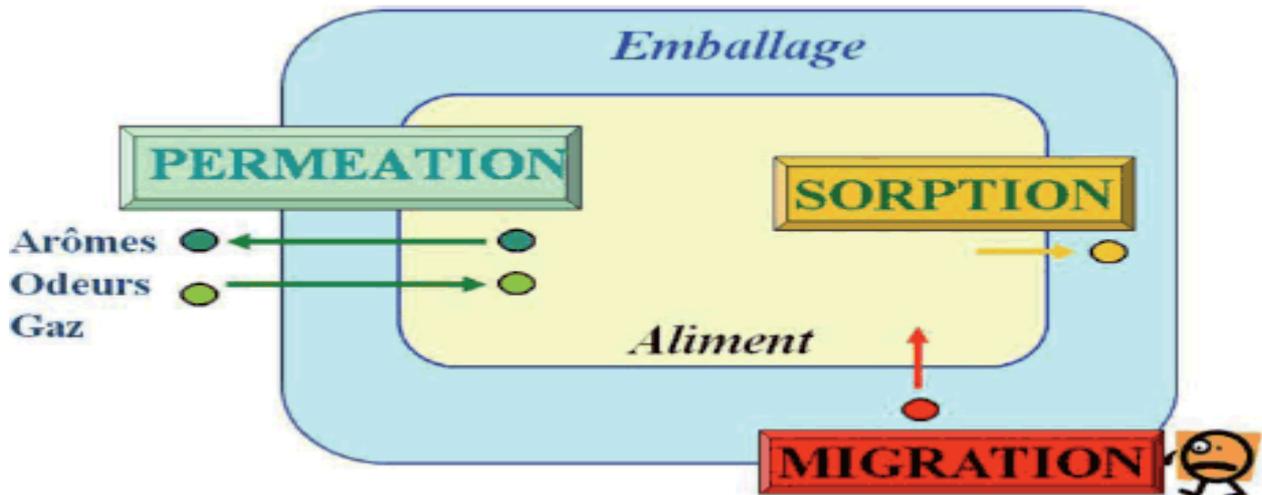
- Le papier et le carton : incluant notamment le carton ondulé et le carton plat (par exemple boîtes de céréales) qui peuvent être recyclé, blanchie ou non blanchie.
- Le verre : transparent et coloré.
- Le métal : canettes métalliques, boîte de conserve.
- Les contenants multicouches et composites : comme le carton de jus, de lait, de crème glacée en carton paraffine.
- Le bois : utilisé pour certains emballages de fromage, ou certaines boites contenant des bouteilles d'alcool.
- Le plastique (PE, PP, PET...selon la composition des polymères) : contenant d'eau de source, de boissons gazeuses, contenants alimentaires [11].

L'emballage plastique est résistant, il évite ainsi des pertes de produit, des risques de dommages pour l'aliment qu'il protège. Il s'est adapté aux cadences de conditionnement de l'industrie agroalimentaire et aux modes de distribution des produits. Les différents matériaux les plus utilisés sont : PET, PS, PP [12].

### **1.1.6. Interaction contenant/contenu dans l'emballage**

Les phénomènes décrits ci-dessous (Figure 1), concernent beaucoup plus les Emballages plastiques qui constituent une part croissante du marché de l'emballage.

Les caractéristiques constitutifs de l'emballage conditionnent ses fonctions, et doivent donc permettre de ralentir l'évolution physico-chimique et microbienne du produit alimentaire [13].



**Figure1** : Transfert de la matière entre aliment et emballage [13].

### ➤ La Perméation

La perméation décrit le phénomène de solubilisation-diffusion de molécules volatiles venant de l'aliment et (ou) de l'extérieur (gaz comme O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He, vapeurs d'eau, composés d'arôme) au travers de l'emballage. Elle nécessite au préalable la sorption des substances concernées (pigments, acides, composés d'arôme...), elles présentent pour cela une affinité chimique avec la nature polymérique de l'emballage. Ainsi du fait de leur faible masse molaire, la sorption des composés d'arôme dans l'emballage se poursuit par leur diffusion dans le matériau, allant dans certains cas jusqu'à la traversée totale du matériau. La perméation peut ainsi provoquer des pertes d'arômes et donc des modifications des propriétés organoleptiques du produit. La perméabilité dépend des caractéristiques physiques du matériau, du pénétrant et des conditions du milieu. [13].

### ➤ La sorption

La sorption est l'assimilation des constituants de l'aliment par la paroi l'emballage plastique suivi de leur pénétration dans le polymère. Le processus de sorption peut induire une perte des arômes de l'aliment et entraîner une modification structurale du polymère. En effet, le vieillissement irréversible du polymère peut être induit par des modifications de la structure chimique des chaînes macromoléculaires et de son état physique. Les phénomènes de sorption sont plus fréquents avec des composés lipophiles, cela est dû à la grande affinité pour la plupart des emballages qui sont aussi peu ou pas polaires (PE, PET, PS, PP)

De plus, si le matériau plastique est recyclé ou réutilisé comme emballage destiné au contact alimentaire, les composés étrangers absorbés dans le polymère sont des éventuels migrants [14].

➤ **La migration**

Le terme migration désigne la masse de ce qui migre dans l'aliment et s'exprime en mg/kg d'aliment ou en mg/dm<sup>2</sup> de surface en contact avec l'emballage [15].

Ce phénomène de migration dépend de la composition du matériau, de sa nature, de sa volatilité, de la concentration de ses molécules mais également de celle de l'aliment [16].

Le processus de migration de l'emballage peut être décrit en quatre situations différentes selon le type d'aliment emballé:

- ✓ Dans le cas où l'aliment serait solide, le migrant ne quitte la paroi que s'il est suffisamment volatil ; il se produit alors une désorption, vaporisation du migrant et sorption par l'aliment.

Lorsque l'aliment est liquide, plusieurs cas de figures peuvent se présenter :

- Le migrant se disperse bien dans l'aliment (soluble), c'est alors la diffusion dans le polymère qui contrôle la vitesse de contamination.
- Le migrant est soluble dans l'aliment, mais ce dernier pénètre en plus dans le matériau provoquant un gonflement du polymère, accélérant et amplifiant la migration.
- Le migrant est peu soluble ou pas soluble dans le liquide, et après une phase initiale de migration, il stagne à l'interface emballage/aliment. [17].

Deux types de migration se distinguent :

- ✓ La migration globale : quantité maximale de substances non volatiles qui migrent dans des aliments, aussi appelée « migrât ».
- ✓ La migration spécifique : désigne la quantité d'une substance particulière qui migre dans les aliments, aussi désignée comme un migrant [18].

La migration globale est l'ensemble des migrations spécifiques. Cette dernière définition montre que lorsqu'il y a un migrant très majoritaire, sa migration spécifique est pratiquement égale à la migration globale [19].

Le migrant potentiel est toute substance présente dans un matériau d'emballage qui peut migrer vers l'aliment. Cependant, seuls les migrants potentiels de masse molaire inférieure à 1000 g/mol sont susceptibles de poser un risque sanitaire [20].

## **1.2 Généralité sur les bio-polymères**

### **1.2.1 Définitions**

Selon *American Society for Testing and Material* (société américaine pour les essais et les matériaux), un plastique dégradé est conçu pour subir un changement important dans sa structure chimique sous des conditions environnementales résultant en une perte de certaines propriétés qui peuvent varier telles que mesurées par des essais normalisés appropriés.

Les plastiques peuvent être désignés comme photodégradables (dû à l'action des rayons UV et des radicaux libres), dégradables chimiquement par hydrolyse ou par oxydation et dégradables mécaniquement par cisaillement et coupure des chaînes (par exemple le broyage) [21]. Entre Octobre 1990 et Juin 1992, une confusion quant à la véritable définition de «biodégradable» conduit à des procès concernant la publicité environnementale trompeuse. Ainsi, il est devenu évident à la ASTM et à ISO que des méthodes de test communes et des protocoles pour les plastiques dégradables soient nécessaires [22]. La biodégradation correspond à la destruction d'un produit par des agents biologiques. Étant donné que la biodégradabilité peut s'effectuer n'importe où (sol, eau, milieu de compostage ou de décharge), un consensus s'est dégagé autour de la notion d'impact sur l'environnement. C'est ainsi que la définition suivante a été adoptée: La biodégradation correspond à la défragmentation, par l'action de micro-organismes, avec perte des propriétés mécaniques ou avec modification chimique. La structure du matériau se simplifie pour finalement se convertir en H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> et/ou en une biomasse nouvelle et éventuellement un résidu non toxique pour l'homme et l'environnement. La biodégradation est donc une dégradation catalysée par des micro-organismes [23].

### **1.2.2. Classification des biopolymères**

Le développement des bioplastiques est encore à son début, il représente approximativement 5 à 10 % du marché du plastique qui est de 200 millions de tonnes par an. Les matières plastiques ou matériaux biodégradables peuvent avoir deux origines:

L'industrie pétrochimique ou les ressources renouvelables [24].

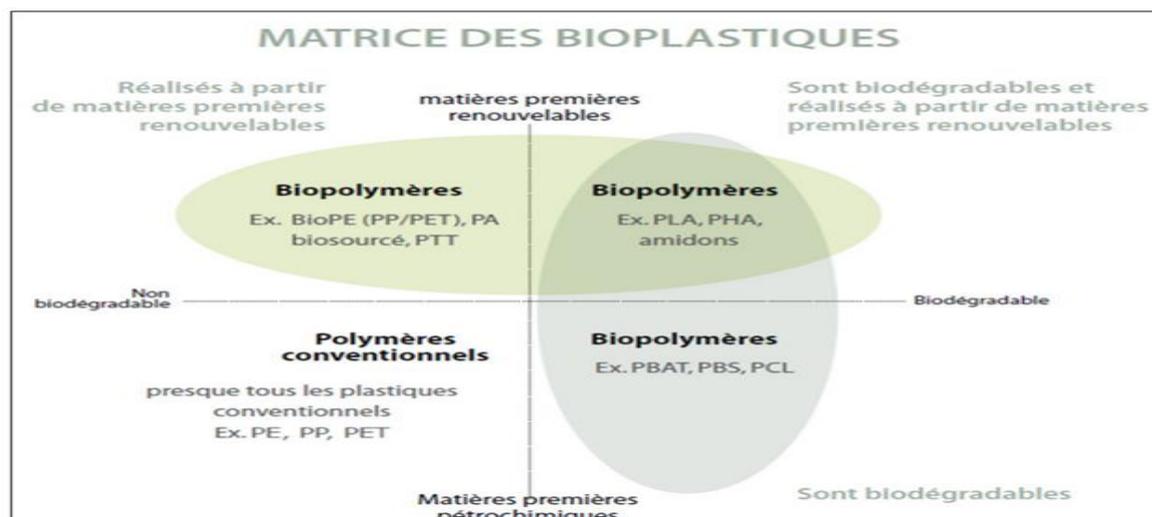


Figure2 : la matrice des bioplastiques [24].

### 1.2.2.1. Polymères biodégradables issus de la pétrochimie

Ces polymères peuvent être divisés en quatre sous-groupes :

- Les **polyesters aliphatiques**, comme l'acide polyglycolique, le polybutylène succinate et le polycaprolactone.
- Les **polyesters aromatiques** ou mélanges de polyesters aliphatiques et aromatiques, tel que le butylène succinate téréphtalate.
- Les **alcools polyvinyliques**.- Les **polyoléfines** (comme le polyéthylène ou le polypropylène) modifiés avec des agents spécifiques sensibles à la température ou à la lumière [24].

### 1.2.2.2. Polymères biodégradables issus des ressources renouvelables

Ils sont généralement classés en trois sous-groupes :

- Les polymères naturels.
- Les polymères d'origine bactérienne.
- les polymères synthétiques [24].

- **Les polymères naturels ou biopolymères et leurs applications**

. Les biopolymères sont synthétisés par les végétaux, les animaux ou les microorganismes et sont souvent divisés en trois sous-groupes : les polysaccharides, les protéines et les élastomères hydrocarbonés.

- **Les polysaccharides** : Ils constituent les biopolymères les plus utilisés et les plus répandus. Parmi ces polymères, on cite l'amidon de maïs, la cellulose et le chitosane.

- **Les protéines** : elles peuvent être extraites des plantes (caféine, gluten de blé) ou des tissus animaux (collagène, gélatine) et produits animaux (caséine).

- **Les élastomères hydrocarbonés** : comme le caoutchouc naturel [24].

- **Les polymères d'origine bactérienne**

Ces polymères sont synthétisés à l'intérieur des bactéries lors de la fermentation et sont accumulés dans le cytoplasme. La fermentation a souvent comme matière première les sucres et l'amidon et donne des polymères tels le PHV (Poly hydroxy valérate et le PHB (Poly hydroxy butyrate) [24].

- **Les polymères synthétiques**

Les monomères dans ce cas sont obtenus par fermentation bactérienne et sont ensuite polymérisés par polycondensation (par chauffage). L'un des exemples les plus connus de ces polymères est l'acide poly lactique (PLA) [25].

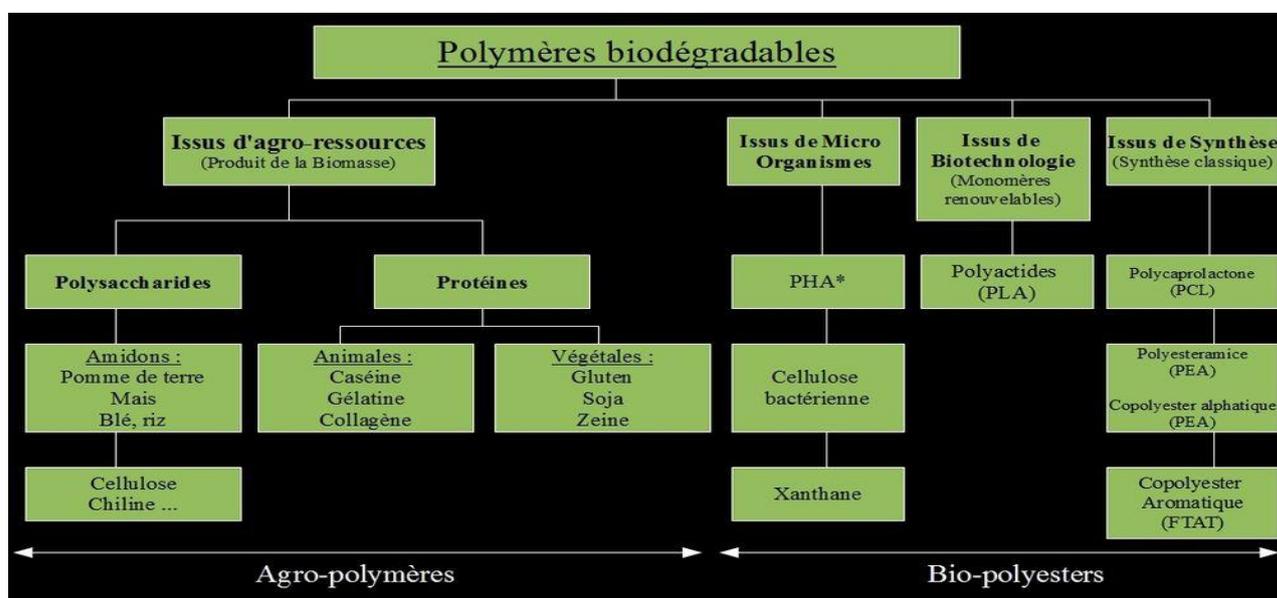


Figure3 : Les différentes familles de bio-polymères [25].

### 1.2.3. Propriétés des bio-polymères

Par leur structure chimique, les biopolymères présentent des propriétés particulières et intéressantes utilisés dans des domaines très variés tels que l'emballage, l'agriculture, la construction, l'automobile, l'électronique et le textile. Ils sont également employés pour des applications à forte valeur ajoutée dans le domaine médicale (implants vasculaires, fils de suture, vis et broches, ligaments artificiels...) [26].

Le tableau suivant représente les différentes propriétés des bio-polymères et leurs Applications ciblées :

**Tableau 1** : propriétés spécifiques de quelques bio-polymères et les applications attendues.

| Biopolymères                 | Propriétés particulières                          | Applications ciblées                |
|------------------------------|---|-------------------------------------|
| Polymère à base d'amidon     | Antistatiques, anti condensation, toucher naturel | Emballages, sacs, films de paillage |
| Polymère à base de cellulose | Transparence, antistatique                        | Fibres, épaississant                |
| Polymère à base de protéine  | Comestible, perméabilité, sélective au gaz        | Galénique, emballages alimentaires  |
| Polymère à base d'huile      | Siccativité                                       | Peinture, vernis                    |
| Polymère de synthèse (PLA)   | Anti condensations, brillances, antibactériens    | Emballages, fibres textiles         |

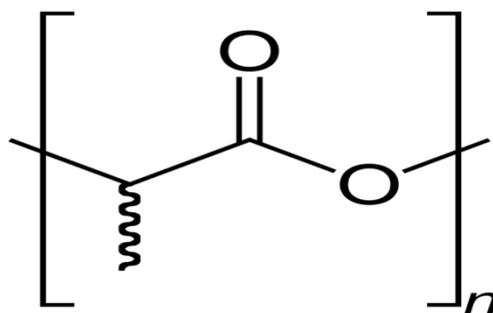
### 1.3. Poly (acide lactique) PLA

#### 1.3.1 Définition

Le poly (acide lactique) ou acide poly lactique ou polyacide (PLA) représenté en (figure 4) est un polyester aliphatique biodégradable qui appartient à la famille des Thermoplastiques et qui a reçu un intérêt considérable comme alternative aux polymères non biodégradables [27].

Les propriétés de biodégradabilité du PLA permettent de limiter l'influence du PLA sur l'environnement. Sa dégradation ultime conduit à la formation d'eau et de dioxyde de carbone qui pourront réintégrer la biomasse [28].

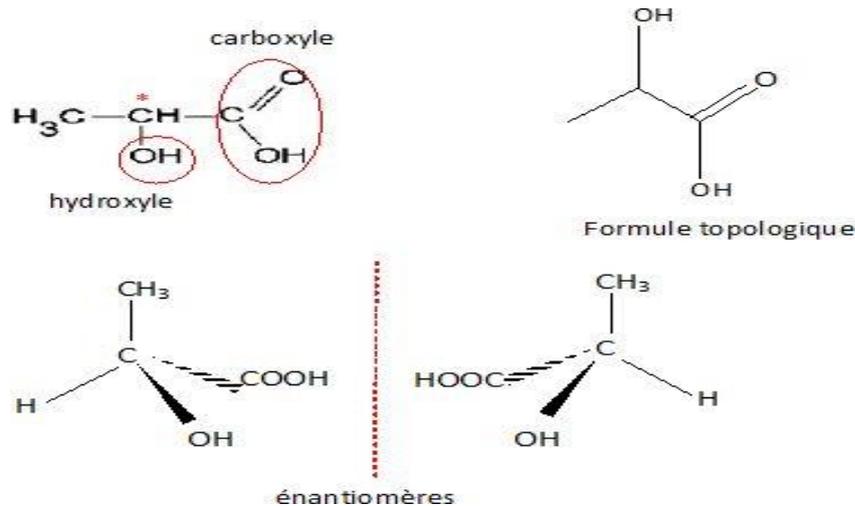
Depuis quelques dizaines d'années, le PLA est utilisé dans le domaine biomédical et chirurgical et notamment comme fils de suture [29]. Le PLA était réservé à ces domaines d'application en raison de l'augmentation du prix de celui-ci. Mais depuis quelques années, plusieurs études ont été prises afin d'améliorer le procédé de synthèse du PLA [30], et ceci dans la perspective d'étendre les domaines d'application à ceux de textile et de l'emballage où le PLA serait une alternative viable aux polymères conventionnels issus de la pétrochimie (tel que le propylène, le polyamide etc...) [31].



**Figure4** :structure chimique du poly(acide lactique).

### 1.3.2. Composition chimique

L'acide lactique ou (2-hydroxypropanoïque),  $\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$ , est le plus simple des acides hydroxycarboxyliques qui possède un atome de carbone asymétrique, il a été découvert par le chimiste Wilhelm Scheel en 1780, qui a isolé l'acide de lait, ces molécules existent sous forme de deux énantiomères de configuration opposées D et L en terme de configuration relative et S et R en terme de configuration absolue comme le montre la figure suivante [32].



**Figure 5 :** Les monomères optiques de l'acide lactique [32].

### 1.3.3. Source de l'acide lactique

C'est un produit de fermentation de dextrose qui est une matière première 100% agricole, annuellement renouvelable, dérivée souvent du maïs. En général, la majorité des sources simples obtenues à partir de sous-produits agricoles peuvent être utilisées pour cette production

Ces sources incluent :

- ✓ Le maltose, la gélose et le dextrose de maïs ou de l'amidon de pomme de terre ou de riz ;
- ✓ Le saccharose de la betterave ou de la canne à sucre ;
- ✓ Le lactose de lactosérum de fromage.

Actuellement, le meilleur marché le plus abondant est le dextrose du maïs [33].

### **1.3.4. Propriétés du PLA**

#### **1.3.4.1. Propriété mécanique et physique**

Les propriétés du PLA sont dépendantes de la masse moléculaire, la stéréochimie et la teneur en D-L'acide lactique. En effet, un D-PLA ou L-PLA homopolymère peut développer une structure cristalline alors qu'un polymère atactique dont le teneur en L-acide lactique est inférieure à 93% reste amorphe [34].

A température ambiante le PLA est un thermoplastique transparent, avec un module d'élasticité de 3500N/mm<sup>2</sup> (relativement élevé, comparé aux thermoplastiques utilisés dans l'emballage comme le PET, le PS et la PP). La densité du LPLA cristallin est 1,290 et celle du LPLA amorphe est 1,248 [35].

Le polymère à base d'acide lactique n'est pas soluble dans l'alcool (éthanol, méthanol) et l'eau. Le PLA amorphe présente un module de traction entre 2,05 et 3,25 GPa. La masse molaire du polymère amorphe a une influence sur la résistance aux chocs et résistance à la flexion qui a été multipliée par 1.5 à 2 quand la masse molaire a été portée de 23 000 à 66000 g/mol [36].

#### **1.3.4.2. Propriétés thermiques**

Les poly (acide lactique) énantiomériquement purs sont semi-cristallins avec une température de cristallisation ( $T_c$ ) d'environ 110 °C, une température de transition vitreuse ( $T_g$ ) de 60°C et une température de fusion ( $T_f$ ) de 180°C. Les polymères préparés à partir de méso-lactide ou d'un lactide racémique sont en générale des polymères amorphes qui n'ont pas de température de fusion ( $T_f$ ). Le PLA est stable thermiquement jusqu'à 300°C. A des températures supérieures, la dégradation de PLA entraîne la formation d'espèces volatiles et d'un résidu carboné qui serait composé principalement de carbones insaturés [36].

**Tableau 2.** Propriétés mécaniques et thermiques du PLA [36].

| Propriétés                           | Mesures   |
|--------------------------------------|-----------|
| Masse volumique (g/cm <sup>3</sup> ) | [1-24]    |
| Température vitreuse (°C)            | [60-65]   |
| Température de fusion (°C)           | [138-150] |
| Module de Young (MPa)                | [20-50]   |
| Resistance (MPa)                     | [45]      |
| Allongement à la rupture (%)         | [9]       |

### 1.3.5. Applications du PLA

Les polymères biodégradables suscitent un immense intérêt dans des divers et importants domaines. Dans de nombreux cas le polymère peut être mélangé avec autre composant polymériques ou non polymérique pour obtenir le comportement désiré.

La raison est que son coût élevé de départ n'a jamais été un frein à son usage puisque il sert pour des applications à haute valeur. En effet leurs propriétés de biocompatibilité et de biorésorbabilité associées à leur résistance mécanique sont très importantes pour assurer les fonctions attendues. Ainsi qu'il offre des caractéristiques uniques de biodégradabilité, de protection de l'environnement et de mise en œuvre. Cela lui confère des applications potentielles telles que les produits agricoles. Ils sont actuellement utilisés aussi dans les domaines du textile et de l'emballage. Des bouteilles d'eau et de lait, des gobelets jetables et divers emballages alimentaires, et, pour des applications en médecine, en chirurgie et aussi en pharmaceutique, tel que les fixations

orthopédiques, attaches, vis et broches, ligaments et tendons artificiels, matrice de régénération de tissu galénique [37].

### **1.3.5.1 Application textile**

Les fibres PLA s'emploient dans des structures textiles très variés par le liage thermique, le cardage, le tricotage et le tissage. La diversité des filaments obtenus sous différentes morphologie et formes avec de bonnes propriétés mécaniques a conduit à cette large gamme d'applications. Les applications principales des fibres et des non-tissés de PLA ne sont pas limitées aux vêtements et à l'ameublement comme garnissage de couette, draps, couverture, matelas et tapis.

Cette fibre est en effet résistante aux ultraviolets, ce qui devrait la rendre performante pour les textiles de maison. En effet, certains fabricants pensent l'utiliser en mélangeant à la laine ou du coton, pour des vêtements de sport extrême ou la lingerie. Des vêtements ont déjà été réalisés en utilisant cette matière en 100% "fibre de maïs" ou en mélange avec du coton, de la laine, ou de la viscose [37].

### **1.3.5.2. Application médicale**

L'acide poly lactique est un polymère biodégradable, biocompatible en plus de sa résistance mécanique élevée et ses propriétés de moulage excellentes, ce qui permet son utilisation pour les applications biomédicales et pharmaceutiques. Puisque le PLA est assimilé par le corps humain, il a été utilisé pour des applications importantes dans le système de libération des médicaments. L'aspect intéressant du polymère est que la matière subie une hydrolyse de la liaison ester de la chaîne principale est conduit à la formation d'acide lactique non toxique, qui est ensuite consommé par le métabolisme des glucides dans le corps [38].

Ces propriétés mécaniques et sa capacité d'absorption font du polymère de PLA un candidat idéal pour les des fils de structures résorbables (chirurgie d'œil, chirurgie de conjonction, chirurgie de poitrine et d'abdomen), pour des implants osseux ou des tissus mous (fixation orthopédique, attaches, vis et broche), peau artificielle, matériel de préparation chirurgicale [39].



**Figure6** : Types de matériaux en PLA utilisés dans le domaine de la médecine [39].

### 1.3.5.3 Emballages

Au cours de ces dernières années, l'utilisation du PLA en tant que matériau d'emballage a augmenté dans toute l'Europe, Etats-Unis et le Japon [40]. Il est transparent, économiquement acceptable, ce qui est important pour les applications d'emballage. Il offre une bonne durée de conservation, par ce qu'il se dégrade lentement par hydrolyse dans des conditions d'emploi de nombreux emballage. En raison du mécanisme de dégradation, le PLA convient idéalement à plusieurs applications dans les environnements où la récupération n'est pas pratique, comme les films plastique employés en agriculture. Le compostage des articles déjà utilisés du PLA est également une solution fiable. Les films et les emballages de PLA disponible dans le commerce peuvent fournir de meilleures propriétés mécaniques que le polystyrène (PS) et ils ont des propriétés comparables à celle de polyéthylène téréphtalate (PET) [41].

Les PLA sont utilisés actuellement pour les bouteilles d'eau, les pots, les couvertures jetables, les emballages alimentaires dans l'industrie des boissons, les suremballages, les pellicules plastiques et le service de table (les gobelets, les assiettes et les ustensiles jetables) [41].



**Figure7** : Types de matériaux en PLA utilisés dans le domaine de l'emballage alimentaire [41].

**I.4. Olea europaea****I.4.1.L'olivier****I.4.1.1.Classification botanique**

L'olivier appartient à la famille des oléacées, genre *Olea* qui comprend 35 espèces [42]. La seule espèce portant des fruits comestibles est L'*Olea europea* a été nommée par Linné en raison de son aire géographique [43]. C'est l'unique espèce du bassin méditerranéen représentative du genre *Olea*. On distingue deux Sous-espèces, l'olivier cultivé ou olivier commun (*Olea europea sativa*.) et l'olivier sauvage ou oléastre (*Olea europea sylvestris*.) [44].

La classification de l'olivier est représentée comme suit selon Conquis (1981) :

**Règne** :Plante

**Sous règne** :Tracheobionate

**Division** :Magnoliphytes

**Embranchement** : Spermaphytes

**Sous embranchement** : Angiospermes

**Classe** : Dicotylédones

**Sous classe** : Astéridées

**Ordre** :Lamiales

**Famille** : Oléacées

**Genre** : *Olea*

**Espèce** : *europea*[44]

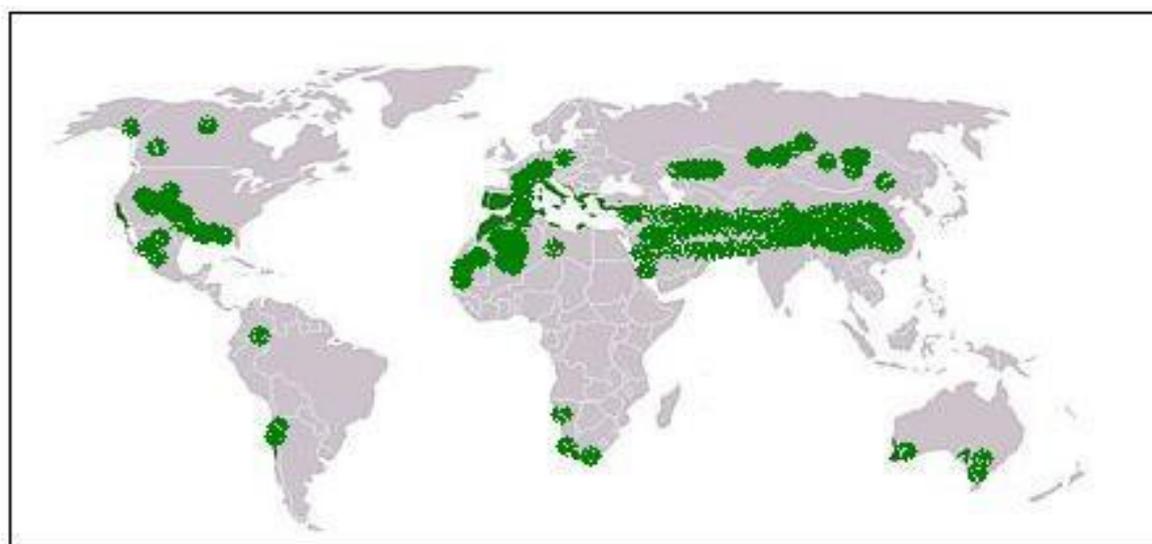


**Figure 8** : Olivearrie [44].

## I.4.2. Répartition géographique

### I.4.2.1. Dans le monde

La zone naturelle de répartition géographique de l'olivier dans le monde se situe principalement entre le 26<sup>e</sup> et le 45<sup>e</sup> degré de latitude nord et sud (Fig.9), ce qui explique son introduction avec succès en Chine, au Japon, aux Etats Unis (Californie), et au Mexique pour l'hémisphère nord, en Australie, en Afrique du Sud et dans divers pays de l'Amérique du Sud pour l'hémisphère Sud [46].



**Figure 9 :** Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde [46].

En Afrique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Tunisie, Maroc, Algérie, Libye, Egypte, Afrique du Sud et Angola. Les pays d'Europe qui cultivent l'olivier sont par ordre d'importance : L'Espagne, l'Italie, la Grèce, le Portugal, l'Albanie, Chypre, la France, la Solvénie et Malte. Au Moyen Orient et en Asie, les pays cultivateurs d'olivier sont par ordre d'importance Turquie, Syrie, Palestine, Liban, Israël, Jordanie, Irak, Iran et Chine. En Amérique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Argentine, Mexique, Chili, Pérou, Uruguay, Brésil et Etats Unis (Californie). L'Australie fait partie des nouveaux producteurs. Cependant, environ 97% des 850 millions d'oliviers, qui couvrent une superficie de 9500000 hectares, dans le monde poussent en région méditerranéenne [45]. Le bassin méditerranéen reste une zone privilégiée par rapport au reste du monde pour la culture de l'olivier grâce à son climat adéquat tant au niveau de la température mais aussi au niveau de l'hydrométrie [45] (fig.10).

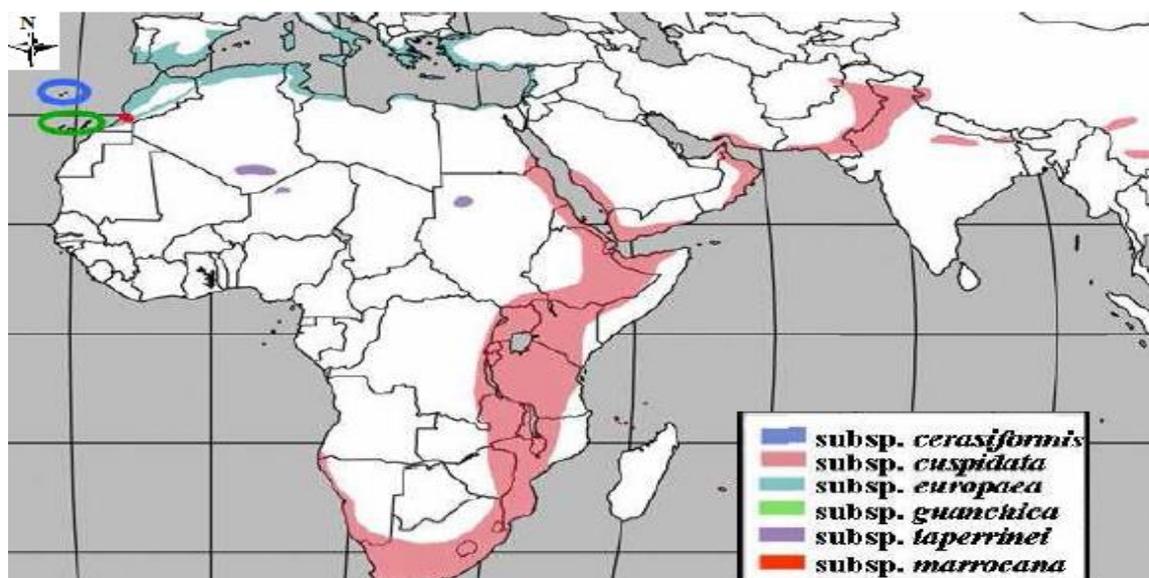


Figure 10 : Distribution naturel du complexe *Olea europaea* dans le monde [45].

### I.4.2.2. En Algérie

L’Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est plus propice à la culture de l’olivier. Le patrimoine oléicole Algérien est estimé à 32 millions d’oliviers, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. Cette filière se concentre dans certaines wilayas comme Bejaia, Tizi-Ouzou et Bouira qui a produit à elle seules en 2008 ,179180 hectolitres d’huile sur une superficie de 108893 ha, soit 51% de la production nationale et environ 44% du verger national oléicole. Ces trois wilayas sont spécialisées beaucoup plus sur la production d’huile [46].

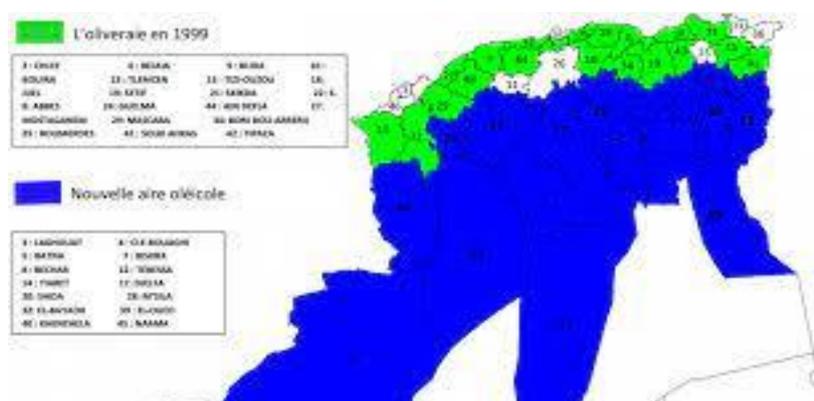


Figure 11 : Carte oléicole d’Algérie [46].

## **I.5. Les feuille d'olivier**

### **I.5.1. Biomasse énorme**

L'industrie oléicole engendre, en plus de l'huile d'olive comme produit principal, des sous-produits de type liquide (margines) et solide (grignons, feuilles et brindilles).

Durant la récolte, des feuilles pourront être cueillies avec les olives. Ces sous-produits sont écartés des olives dans les oliveraies mais aussi dans les huileries. Ils sont estimés à 10% de la masse globale des olives récoltés [46]. A cette quantité s'ajoute la biomasse de la taille (). En effet, après la récolte des olives, les oliviers subissent en général une taille sévère un an sur deux et une taille légère l'année suivante. Un olivier laisse en moyenne 25 Kg des feuilles et des brindilles annuellement, soit 15 millions de tonnes dans le monde.

La valorisation de ces résidus, engendrés en grande quantité, est devenue une nécessité pour améliorer la rentabilité du secteur oléicole [46].

### **I.5.2. Composition des feuilles d'olivier**

#### **a) Feuilles d'olivier cultivé**

Les feuilles fraîches d'olivier sont caractérisées par une matière sèche aux alentours de 50%. Le Tableau III montre sa composition chimique globale selon différents auteurs. La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, âge des plantations [47].

Les feuilles sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tel que les tannins) et principalement par des polysaccharides (tel que cellulose, hémicelluloses). La teneur en protéine est faible dans les feuilles d'olivier. La composition en acides aminées, qui est particulièrement diversifié. Le minéraux le plus abondant dans les feuilles est le fer avec une concentration de 273 g/ Kg de matière sèche [48].

**Tableau 3.** Composition chimique global des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g) selon plusieurs auteurs [48].

| Composition (en %) | Boudhrioua et al, 2009 | Erbay et Icier, 2009 | Martin-Garcia et al, 2006 | Garcia et al, 2003 | Fegeros et al, 1995 |
|--------------------|------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|
| Eau                | 46,2-49,7 a            | 49,8 a               | 41,4 a                    | Nd                 | 44,0 a              |
| Protéines          | 5,0-7,6 a              | 5,4 a                | 7,0 b                     | Nd                 | Nd                  |
| Lipides            | 1,0-1,3 a              | 6,5 a                | 3,2 b                     | 6,2 b              | Nd                  |
| Minéraux           | 2,8-4,4 a              | 3,6 a                | 16,2 b                    | 26,6 b             | 9,2 b               |
| Carbohydrates      | 37,1-42,5 a            | 27,5                 | Nd                        | Nd                 | Nd                  |
| Fibres brutes      | Nd                     | 7,0 a                | Nd                        | Nd                 | 18,0 b              |
| Cellulose          | Nd                     | Nd                   | Nd                        | 19,3 b             | 11,4 b              |
| Hémicellulose      | Nd                     | Nd                   | Nd                        | 25,4 b             | 13,3 b              |
| Lignin             | Nd                     | Nd                   | Nd                        | 30,4 b             | 14,2 b              |
| Polyphénolstotaux  | 1,3-2,3 b              | Nd                   | 2,5 b                     | Nd                 | Nd                  |
| Tannins solubles   | Nd                     | Nd                   | Nd                        | Nd                 | 0,3 b               |
| Tannins condensés  | Nd                     | Nd                   | 0,8 b                     | Nd                 | 1,0 b               |

a correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse fraîche des feuilles d'olivier.

b correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier.

nd : valeur non déterminée.

### b) Feuilles d'olivier sauvage

La matière sèche des feuilles d'olivier est de 58,6%. (Tableau III). Sa composition en matières azotées totale est basse, elle est de 7,0 g /100M.S. Généralement elles contiennent des quantités remarquable en arginine, leucine et de la valine, mais des teneurs faibles en tyrosine et cystéine. la teneur en matières grasses (MG) oscille autour de 5 à 7% [49].

**Tableau 4.**Composition chimique des feuilles d'olivier sauvages "Olea europaea varsylvestris" [49].

| Composition chimique      | teneures% |
|---------------------------|-----------|
| Matière sèche             | 58,81     |
| Matière grasse            | 3,21      |
| Protéine                  | 7,00      |
| Histidine                 | 3,80      |
| Arginine                  | 11,10     |
| Arginine                  | 4,17      |
| Valine                    | 9,02      |
| Méthionine                | 1,82      |
| Isoleucine                | 1,00      |
| Leucine                   | 5,33      |
| Phénylalanine             | 4,31      |
| Lysine                    | 4,74      |
| Acide- glutamique         | 4,49      |
| Serine                    | 6,30      |
| Glycine                   | 4,59      |
| Alanine                   | 1,47      |
| Les poly phénols totaux g | 2,53      |
| Flavonoïdes               | 58        |
| Oleuropeine               | 2,27-13,4 |

### I.5.3. Usage traditionnel des feuilles d'olivier

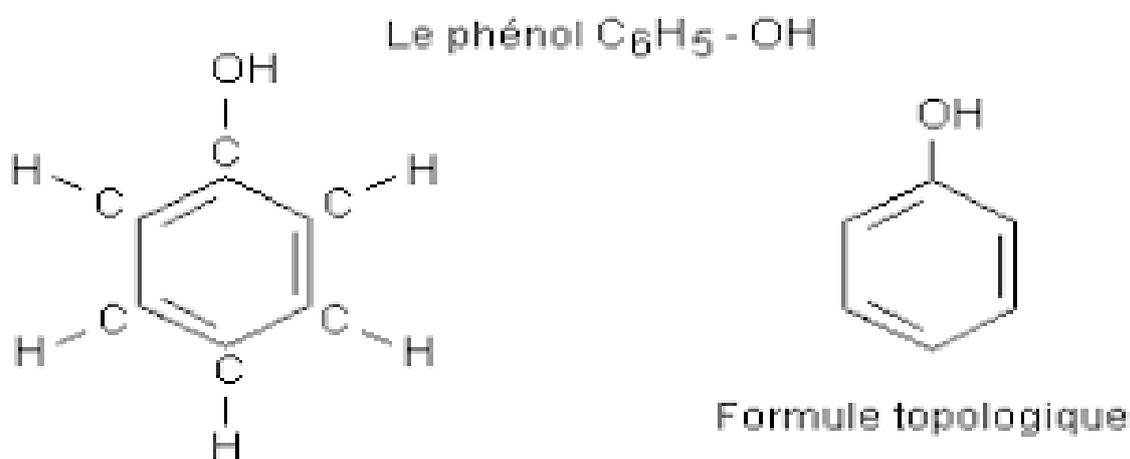
Les feuilles d'olivier sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle modérée. L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète (au cours de la grossesse ou en cas d'obésité), elles ont été utilisées aussi comme remède de la fièvre et de Malaria [49].

### I.6. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier

#### I.6.1. Généralité sur les composés phénoliques

##### I.6.1.1. Définition et localisation des composés phénoliques

Les composés phénoliques, métabolites secondaires, forment le groupe des composés organiques phytochimiques le plus important dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante [50]. L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) [51].



**Figure 12 :**Formules brute et chimique d'une fonction phénol [51].

### I.6.1.2. Activités biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont connus par leurs rôles physiologiques très importants aussi bien dans le règne végétal qu'animal. En raison de leur structure, les composés phénoliques sont capables de se fixer sur certaines enzymes et protéines, et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques : ils joueraient un rôle dans les chaînes d'oxydo-réduction et modifieraient certaines réactions concernant la croissance, la respiration et la morphogénèse [52].

Dans le règne végétal, ces substances sont souvent impliquées dans les mécanismes de défenses élaborés par les végétaux contre la prédation par des insectes, des herbivores et contre les infections et les agressions microbiennes multiples [52]. Outre, les composés phénoliques seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation [53].

Les composés phénoliques sont aussi responsables des propriétés sensorielles des plantes telles que la couleur, le goût et parfois l'odeur. En phytothérapie, l'effet de nombreuses plantes médicinales est attribué en tout ou partie aux composés phénoliques dans ces plantes. Ces substances possèdent des activités biologiques qui les rendent bénéfiques à la santé humaine (Fig. 13). Beaucoup d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) [54].

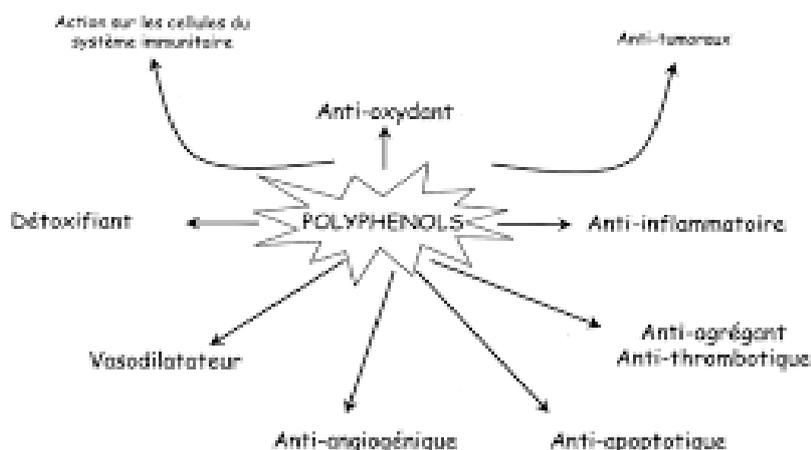


Figure 13 : Effets biologiques des polyphénols [55].

Les activités biologiques relatives à ce type de composés sont relativement diversifiées. Chaque classe chimique de polyphénols semble être utilisée pour ses vertus spécifiques [55]. Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur activité antimicrobienne et antioxydante, ce dernier est d'un intérêt général avec les récentes découvertes sur la prévention des cancers [56]. Certains d'entre eux, tel que les coumarines, possèdent des propriétés anti-inflammatoires. D'autres, tel que les lignanes, que les lignanes, possèdent des propriétés cytostatiques [57]. Les flavonoïdes, une vaste famille de composés phénoliques, protègent les tissus végétaux contre les rayons UV. La principale activité leur étant attribuée est une propriété « Vitaminique P » : ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et les rendent plus résistants. Certains possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiants, diurétiques, antibactériens, antiviraux et parfois cytostatiques. Ils agissent aussi parfois comme piègeurs de radicaux libres et comme inhibiteurs enzymatiques. [58]

Les composés des autres familles de ce groupe (anthocyanosides, tannins et polyacétates) présentent fréquemment des propriétés thérapeutiques similaires à celles des flavonoïdes et des composés phénoliques en général [59].

#### **1.6.2.1. Composition des feuilles d'olivier en composés phénoliques**

La teneur en composés phénoliques dans les feuilles d'olivier varie entre 2,8 mg/g de matière sèche [60] et 44,3 mg/g de matière sèche. Elle peut même dépasser les 450 mg/g de matière sèche. La variation de la concentration des composés phénoliques dans les feuilles d'olivier, citée dans la littérature, dépend de la variété de l'olivier, des conditions climatiques, de l'époque de prélèvement des échantillons des feuilles, de l'âge des plantations et des échantillons des feuilles. En plus de ces facteurs de variabilité, il s'ajoute l'effet de la méthode de préparation des feuilles d'olivier (déshydratation et broyage), du procédé et des techniques d'analyses qualitative et quantitative des composés phénoliques. Les composés phénoliques dans les feuilles d'olivier sont très divers et leurs structures sont très variables. Les feuilles d'olivier contiennent des monomères et des polymères phénoliques. La composition phénolique des feuilles d'olivier a fait l'objet de nombreuses études [61].

### **I.6.3.1. Préparation pré-extraction des échantillons de plante**

La première étape de l'étude des plantes médicinales telle que *Persea americana* est la préparation d'échantillon, ce qui permet de préserver les biomolécules dans les plantes avant l'extraction. La préparation des extraits des différentes parties de la plante telle que les feuilles et les grains, peuvent être effectuée à partir des matières végétales fraîches ou séché [71].

Les différents traitements des matières végétales comme le broyage et le séchage ont une influence sur le rendement en composés phytochimiques dans les extraits finaux [71].

Cependant, certains traitements s'avèrent très utiles avant l'extraction. En effet, le broyage par exemple permet d'avoir des particules plus fines et plus homogènes conduisant à un meilleur contact de surface avec les solvants d'extraction. Cette réduction de la taille des particules augmente le contact de surface entre les échantillons et les solvants d'extraction. Pour une extraction efficace durant le processus de l'extraction, le solvant doit entrer en contact avec les analyses cibles. Une taille de particule inférieure à 0,5 mm est idéale [71].

### **I.7. Les techniques d'extraction des polyphénols**

L'extraction des principes actifs à partir de la matière végétale, notamment des polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant et antibactérien, est une étape très importante aussi bien dans l'isolement que dans l'identification des composés phénoliques. En conséquence, de nombreux auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction des composés phénoliques.

La solubilité des composés phénoliques dans un solvant dépend de leur nature chimique, qui varie de simples composés à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, et tanins [63].

### **I.8. Méthodes d'extraction des composés phénoliques**

#### **I.8.1. Infusion**

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper dans le but d'extraire leurs principes médicinaux. Elle convient pour l'extraction de parties délicates ou finement hachées

des plantes: fleurs, feuilles, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles [64].

### **I.8.2.Décoction**

Elle convient pour l'extraction de matières végétales dure ou très dure : bois, racines, écorce ou des plantes avec des constituants peu solubles (ex : l'acide silicique). Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour bien extraire les principes médicinales [65].

### **I.8.3.Macération**

La macération est également appelée extraction à froid. Le processus de macération est utilisé pour séparer les différents constituants et ingrédients des plantes sous forme d'extrait brut. Il existe plusieurs modes de macération qui utilisent différents solvants, macération à l'éthanol, macération au chloroforme et macération à l'eau distillée (macération simple) [66].

Néanmoins, dans ce processus, la matière végétale entière ou réduite en poudre grossière est placée dans un récipient bouché avec le solvant et laissé à température ambiante pendant une période d'au moins 3 jours sous agitation fréquente jusqu'à dissolution de la matière soluble. Le mélange est ensuite filtré, le marc (la matière solide humide) est pressé et les liquides combinés sont clarifiés par filtration ou décantation après repos [67].

### **I.8.4.Distillation**

La distillation est un processus ancien puisque les premières traces connues remonteraient à 5000 ans dans la vallée de l'Indus [73]. Cette technique d'extraction est connue depuis l'antiquité, a été transmise par les Arabes et a été perfectionnée par les industriels de Grasse (Alpes-Maritimes). Cette méthode, une des plus anciennes mais aussi une des plus simples, est depuis peu délaissée au profit de nouveaux procédés de distillation pour des raisons de qualité et de coût de production [74].

### **I.8.5.Soxhlet**

L'extraction par l'appareil Soxhlet (nous allons l'appeler simplement Soxhlet) est une méthode simple et convenable nous permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première, d'où vient son efficacité élevée. Cependant, le Soxhlet possède quelques désavantages comme, par exemple, le temps d'extraction relativement long, la possibilité de dégradation des composés

à cause d'une surchauffe locale, le choix limité du solvant, les difficultés d'utilisation de mélanges de solvants, etc [72].

### **I.9. Autres techniques**

De nombreuses substances sont extraites de produits naturels d'origine végétale, animale ou minérale. Il existe de nombreux procédés dont certains sont très anciens et autres sont modernes. Ces techniques sont très utilisées dans différents domaines, en ce qui concerne la matière végétale, il existe plusieurs techniques permet l'extraction des molécules bioactifs à savoir [68].

- Ultrasons (Sonication) : est un processus qui utilise l'énergie acoustique et des solvants pour extraire les composés cibles de diverses matrices végétales [69].
- Micro-ondes : sont des radiations électromagnétiques d'une fréquence de 0,3 à 300 GHz[70].
- Extraction accélérée par solvant (ASE) : est une technique qui utilise une petite quantité de solvant, ce qui fait d'elle une méthode très efficace [71].

De plus, plusieurs recherches ont été menées dans le but d'éviter certains inconvénients des procédés d'extractions conventionnels et ont conduit aux développements de nouvelles méthodes d'extraction [68].

Chapitre II  
**Chapitre II**  
Matériels et méthodes  
**Matériels et méthodes**

## Chapitre II.

### Matériels et Méthodes

#### II.1. Présentation des produits utilisés

##### II.1.1. Acide poly lactique (PLA)

L'acide polylactique (*anglais : polylactic acid*, abrégé en PLA) est un polymère biodégradable en compostage industriel (à une température supérieure à 60 °C).

Le PLA est donc l'un de ces polymères, dans lequel les longues molécules filiformes sont construites par la réaction d'un groupe acide d'une molécule d'acide lactique sur le groupe hydroxyle d'une autre pour donner une jonction ester. Dans le corps, la réaction se fait en sens inverse et l'acide lactique ainsi libéré est incorporé dans le processus métabolique normal. On obtient un polymère plus résistant en utilisant l'acide glycolique, soit seul, soit combiné à l'acide lactique [75].



**Figure14:** PLA sous forme de granulés

Les principales propriétés du PLA prises sur la fiche technique sont notées dans le tableau suivant :

**Tableau 5** : Les principales propriétés physiques du PLA

| Propriétés générales                      | Unité    | Valeur      |
|---|----------|-------------|
| Densité                                   | /        | 1.26        |
| MFI (190 °C, 2.16 Kg)                     | g/10 min | 5-9         |
| Dureté (15s)                              | Shore D  | 80          |
| Propriétés optiques                       | /        | transparent |
| Température de fusion                     | °C       | 170-180     |
| Contrainte de traction au seuil élastique | MPa      | 20          |
| Contrainte de traction à rupture          | Mpa      | 62.3        |

### II.1.2.Extrait des feuilles d'olivier

C'est le principe actif ajouté au biopolymère (PLA) pour lui conférer des activités biologiques.

Comme bon nombre d'autres végétaux, les feuilles d'olivier contiennent des molécules antioxydantes : flavonoïdes, phénols... Ces composés actifs aident à lutter contre l'excès de radicaux libres dans l'organisme. Les antioxydants de la feuille d'olivier permettent de prévenir et de lutter contre les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme. Les antioxydants sont présents dans les polyphénols et donc, dans les végétaux. La feuille d'olivier en est une source extrêmement intéressante [76].

### II.1.3. Chloroforme

C'est un produit chimique fourni par BIOCHEM Chemopharma.

Il est utilisé comme solvant pour la préparation des solutions du PLA et de propolis dont les caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes :

- ✓ Formule chimique :  $\text{CHCl}_3$  ;

- ✓ Masse moléculaire :  $M = 119.38 \text{ g/mol}$  ;
- ✓ Température de l'ébullition :  $62 \text{ °C}$  ;
- ✓ Température de fusion :  $-64 \text{ °C}$  ;
- ✓ Densité :  $1,478 \text{ g/cm}^3$  ;
- ✓ Pureté : 99 %.

#### II.1.4. Alcool éthanolique

C'est le solvant utilisé pour extraire les composés bioactifs des feuilles d'olivier dont les propriétés physico-chimiques sont les suivantes :

- ✓ Formule chimique :  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  ;
- ✓ Masse moléculaire :  $M = 46.07 \text{ g/mol}$  ;
- ✓ Pureté : 96 %

### II.2. Matériel biologique

Pour étudier l'activité antimicrobienne des feuilles d'oliviers et des films préparés, quatre souches bactérienne : *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ; *Bacillus subtilis* ATCC14579 ; *Klebsiella Pneumoniae* 2042 ; et deux souches fongique : *Penicillium Sp*; *Aspergillus niger* sont utilisées.

#### II.2.1. Souches bactériennes

##### -*Staphylococcus aureuse*

Les staphylocoques sont des bactéries de forme sphériques (coques) aéro-anaérobies facultatifs à Gram positif, résistantes dans le milieu extérieur et peu exigeantes en culture [77].

*Staphylococcus aureus* communément appelé staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène du genre *staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisés et dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles. L'homme est le principal réservoir, mais ces bactéries sont également retrouvées dans l'environnement (eau, air, surfaces et aliments) et chez l'animal notamment l'élevage [78].

**- Bacillus subtilis**

Est une bactérie à Gram positif vivant dans le sol et qui fait partie du groupe des Firmicutes comprenant : les **Bacilli (Bacillus, Listeria, Enterococcus, Streptococcus, Staphylococcus)** ; les Clostridia ; les Mollicutes [79].

**- Klebsiella Pneumoniae**

Le genre Klebsiella de la famille des entérobactéries comporte cinq espèces dont l'espèce type est Klebsiella Pneumoniae. Les klebsiella sont des Enterobacteriaceae, bacilles gram négatif, immobiles et capsulées. Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des animaux et de l'homme en tant que bactéries commensales. Elles sont abondantes dans le sol et les eaux [80].

**II.2.2. Souches fongiques****- Aspergillus niger**

Aspergillus niger, est un champignon filamenteux qui se développe sur la matière organique.

Dans la nature, on le trouve dans le sol et la litière, dans le compost et sur le matériel végétal en décomposition. Aspergillus niger est capable de se développer sur une large gamme de températures allant de 6 à 47 ° C, avec une température optimale relativement élevée entre 35 et 37 ° C. Cette espèce se développe dans les céréales et les denrées alimentaires et elle est présente dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air [81].

**- Penicillium Sp**

Les Penicillium sont des champignons filamenteux, polyphages, ils peuvent être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les matières organiques en décomposition, le compost, les denrées alimentaires et les céréales. Les espèces du genre Penicillium se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des Aspergillus [82].

**II.3. Méthodes expérimentales****II.3.1. Nettoyage et broyage des feuilles d'olivier**

A l'aide d'un hachoir électrique les feuilles d'olivier brutes préalablement lavées et séchées dans une étuve à 45°C sont transformées en poudre fine.

### II.3.2. Extraction des feuilles d'olivier

20 g d'échantillon de poudre des feuilles d'olivier sont broyés et dissous dans 200 ml d'éthanol à 96% sous agitation continue pendant 24h. La suspension est filtrée avec un papier Wattman N°1 et centrifugé à 6000t/min pendant 2min. Le surnageant obtenu est évaporé dans un rota vapeur à 45°C (fig. 15). Enfin, l'extrait est versé dans une boîte stérile et conservé à l'abri de la lumière et chaleur.



**Figure15** : Evaporateur rotatif (rota vapeur).

### II.3.3. Techniques de caractérisation

- Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (IRTF) et l'Ultra-violet UV ;
- Evaluation de l'activité antioxydante ;
- Test d'activité antibactérienne ;
- Test d'activité antifongique.

#### II.3.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge est une technique d'analyse utilisée pour l'identification des groupements fonctionnels qui apparaissent sous forme de bande d'absorption. Le spectre infrarouge IR est étudié dans une gamme de fréquence allant de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$  les bandes les plus caractéristiques se distinguent dans trois régions différentes :

- ❖ 4000  $\text{cm}^{-1}$  à 1500  $\text{cm}^{-1}$  : contient les bandes d'allongement correspondant au principal groupement OH, CO, NH<sub>2</sub> etc.
- ❖ 1500  $\text{cm}^{-1}$  à 600  $\text{cm}^{-1}$  : c'est une région complexe appelé empreinte digital du composé dans laquelle se situe de nombreuses vibrations de déformation ainsi que des bandes d'allongement des liaisons CO tel que les esters, les éthers et alcools.
- ❖ 1000  $\text{cm}^{-1}$  à 600  $\text{cm}^{-1}$  : c'est une zone très utilisée pour la détermination des structures éthylique et aromatique.

Dans cette présente étude les spectres IR de la poudre des feuilles d'olivier, d'extrait éthanolique des feuilles d'olivier et les films PLA /EFO ont été enregistré sur un spectrophotomètre de type SHIMADZU FTIR -8400 S, piloté par un ordinateur muni d'un logiciel de traitement avec une résolution de 4 $\text{cm}^{-1}$  dans la région 400  $\text{cm}^{-1}$  à 4000 $\text{cm}^{-1}$ . L'analyse de la poudre des feuilles d'olivier est réalisée sur des mélanges de cette dernière et de KBr sous forme de pastilles de proportion 0,02 et 0,08 mg respectivement, préparées sous une pression de l'ordre de 90 KN [82].



**Figure16** : Appareil Infrarouge.

### II.3.3.3. Evaluation de l'activité antioxydant de l'extrait des feuilles d'olivier

#### II.3.3.3.1. Dosage des composés phénoliques

##### a) Dosage des polyphénols par l'UV Visible

###### • Principe

Les polyphénols sont dosés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu.

Cette méthode est basée sur les réactions d'oxydoréduction, le réactif de Folin Ciocalteu, acide de couleur jaune, est utilisé comme oxydant, il est constitué d'un mélange d'acides phosphotungsténique et phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène qui absorbent à 760nm. Une mesure colorimétrique effectuée à cette longueur d'onde permet ainsi d'apprécier le taux de polyphénols totaux (PT) présents dans l'échantillon. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en composé phénoliques oxydés [83].

###### • Mode opératoire

Un volume de 200 µl de l'extrait brut éthanolique est introduit dans des tubes à essai, le mélange (1ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5%) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 minutes à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6504 UV/VIS.

##### b) Dosage des flavonoïdes

###### • Principe

Le principe repose sur la formation d'un complexe jaunâtre, lors de l'ajout du chlorure d'aluminium. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'Aluminium et les flavonoïdes, qui est le résultat de la fixation des ions ( $Al^{3+}$ ) sur les atomes d'oxygène présents sur les atomes de carbone 4 et 5 des flavonoïdes agissant comme donneurs d'électrons (fig. IV.3) [84].

La formule du complexe entre le chlorure d'Aluminium et un composé phénolique O-hydroxy carbonyle se présentant comme suit :

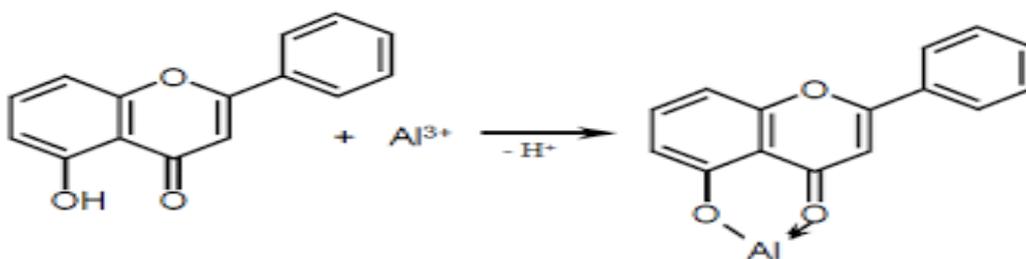


Figure 17 : Réaction de chlorure d'aluminium et des flavonoïdes [84].

### • Mode opératoire

500  $\mu$ l de l'extrait brut méthanolique des feuilles convenablement dilué sont mélangés avec 1500  $\mu$ l d'eau distillée, suivis de 150  $\mu$ l de nitrite de sodium ( $NaNO_2$ ) à 5%. Après 5 min, 150  $\mu$ l de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) à 10% (m/v) est rajouté au mélange. Après 6 min d'incubation à la température ambiante, 500  $\mu$ l d'hydroxyde de sodium ( $NaOH$ ) à 4% est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est exprimée en microgramme ( $\mu$ g) équivalent de la catéchine par milligramme de la matière végétale sèche ( $\mu$ g EC/mg) [85].

### C) dosage des Tanins Condensés

#### • Principe

Les quantités des tanins condensés sont estimées en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide. Avec la vanilline chlorhydrique, les tanins condensés donnent une coloration rouge qui présente un maximum d'absorption aux environ de 550nm [85].

#### • Mode opératoire

Un volume de 50  $\mu$ l de l'extrait brut est ajouté à 1500  $\mu$ l de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750  $\mu$ l de l'acide chlorhydrique concentré ( $HCl$ ) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante

pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6504 UV/VIS. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en microgramme ( $\mu\text{g}$ ) équivalent de la catéchine par milligramme de la matière végétale sèche ( $\mu\text{g EC/mg}$ ) [85].



Figure 18 : Appareil d'UV.

#### II.3.3.3.2. Mesure de l'activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante de l'extrait des feuilles d'olivier est évaluée en utilisant le test de piégeage du radical diphényle picrylhydrazyle (DPPH $\cdot$ ) [86].

##### Test de piégeage du radical DPPH.

##### • Principe

La réduction du radical libre DPPH $\cdot$  (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) par un antioxydant peut être suivit par spectromètre UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm ; provoqué par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. De couleur violette se réduit en 2,2-Diphényle picrylhydrazone de couleur jaune (figure19) [86].

aux, 2004).

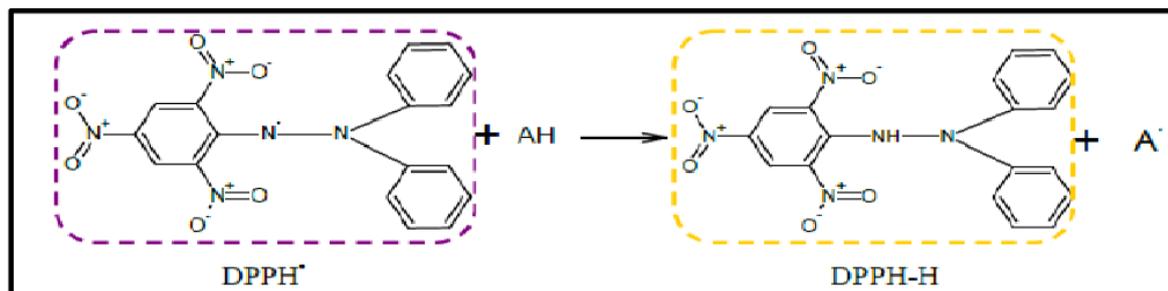


Figure 19 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant [87].

### • Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol ( $6 \times 10^{-5}$  M). 25  $\mu$ l des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 975  $\mu$ l de solution méthanolique de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle contenant la solution de DPPH et d'éthanol est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

Le contrôle : est préparé de la même façon sauf que l'extrait est remplacé par le solvant : 975  $\mu$ l de solution méthanolique de DPPH + 25  $\mu$ l d'éthanol, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min. Le blanc : pour réglage d'appareil est constitué par 1 ml d'éthanol [88].

### • Expression des résultats

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$I (\%) = \left( \frac{\text{AbsTémoin} - \text{Abst}}{\text{AbsTémoin}} \right) \times 100 \text{ Où :}$$

- **I %** : Inhibition des radicaux libres en pourcentage ;
- **Abs Témoin** : Absorbance du témoin (absorbance du radical DPPH + méthanol) ;
- **Abs teste** : Absorbance de l'échantillon.

### II.3.3.4. Test d'activité antimicrobienne

Après la stérilisation des films en utilisant une lampe UV, l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier (EFO) est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide. Cette méthode consiste à déposer à la surface d'un milieu géloséensemencé par les microorganismes à tester, des disques chargés de l'extrait, puis les boîtes sont portées à l'incubation [89].

Les souches microbiennes utilisées dans ce test sont présentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 6 :** Les souches microbiennes testées

| Microorganismes | Souches testées  |
|-----------------|--|
| Bactéries       | -Staphylococcus aureus<br>-Bacillus subtilis.<br>-Klebsiella pneumoniae. |
| Champignons     | -Penicillium Sp.<br>-Aspergillus niger.                                  |

#### II.3.3.4.1. Activité antibactérienne

##### a) Préparation des suspensions bactériennes

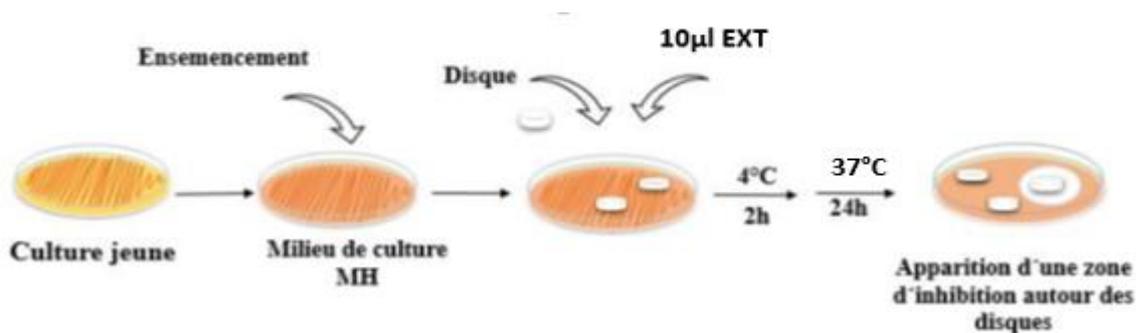
À partir d'une culture bactérienne jeune de 24 heures, 3 à 5 colonies bien isolées ont été prélevées dans 10ml de bouillon nutritif pour préparer une suspension bactérienne de 10<sup>8</sup> UFC / ml suivis d'une agitation à l'aide d'un vortex [90].

##### b) Ensemencement

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage. Le milieu de Mueller-Hinton auquel est additionnée 5 % de tween 80 est coulé dans des boîtes de pétri. Les boîtes sont refroidies et séchées à température ambiante puis sontensemencées par des suspensions bactériennes à l'aide d'écouvillons stériles. L'écouvillon est imbibé de la suspension bactérienne puis essoré contre la paroi interne du tube à essai.

L'ensemencement se fait par des stries serrées, de haut en bas et l'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. L'écouvillon est par la suite passé sur toute la périphérie de la gélose. Les

disques préparés de papier wattman N°3 de 6 mm de diamètre stérilisés à 180°C pendant 30 minutes ont été déposés sur le milieuensemencé à l'aide d'une pince stérile (3 disques dans chaque boîte). 10 µl d'extrait éthanolique des feuilles d'olivier (0.85g/ml dans le DMSO) ont été injectés sur les disques déposés et les disques témoins ont reçu 100µl de DMSO (fig.19). Les boîtes sont ensuite mises dans le réfrigérateur à 4°C /2h puis incubées à 37°C pendant 24 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions autour des disques [91].



**Figure 20 :** Mise en évidence de l'effet antibactérienne de l'extrait des feuilles d'oliviers.

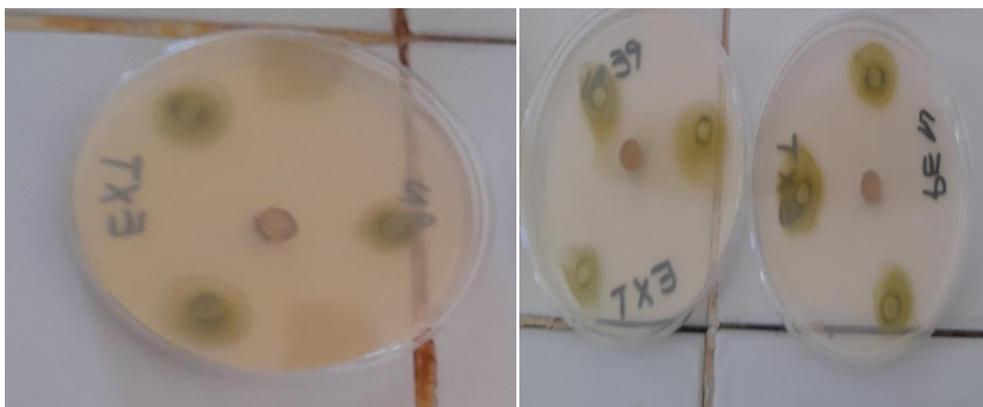
### II.3.3.5. Activité antifongique

#### a) Préparation des cultures fongique

Les cultures fongiques sont préparées par ensemencement d'une suspension sporale sur milieu PDA, puis incubée à 25 °C pendant 3 à 7 jours.

#### b) Ensemencement

Le protocole d'ensemencement est similaire à celui cité dans la section (IV.III.3.4.1.b), le milieu de culture utilisé est le milieu PDA additionné de 5 % de tween 80. Dans ce tests, l'inoculum est prélevé par un écouvillon à partir d'une boîtes contenant l'espèce fongique à tester, puis le frotter à trois reprises sur toute la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60 ° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Une fois les boîtes sont ensemencées et les extraits sont déposés, les boîtes sont incubées à 25 °C pendant 48 h jusqu'à 72 h (fig.20). Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés [91].



**Figure 21 :** Mise en évidence de l'effet antifongique de l'extrait des feuilles d'oliviers.

#### II.3.4. Préparation des essais (films de PLA / feuilles d'olivier)

Les films de PLA ont été produits par la méthode casting.

1 g de granulés de PLA a été ajouté à 50 ml de chloroforme. Sous agitation constante pendant environ 8 h jusqu'à la dissolution complète des granulés de PLA. Les différentes masses d'EFO (0,03g, 0,06g et 0,09g) sont ajoutés puis on agite pendant 1h. Les solutions résultantes ont été versées dans des boîtes de Pétri en verre (diamètre: 100 mm, profondeur: 15 mm) [92].

##### II.3.4.1. Test d'absorption d'eau

Le test d'absorption d'eau consiste à évaluer la quantité d'eau que l'échantillon peut absorber en fonction du temps d'immersion.

- Découpés les films destinés à la mesure de l'absorption d'eau sous forme de carrées de 15 cm de côté ;
- Laisser sécher dans une étuve pendant 24h à 50 °C ;
- Après séchage à l'étuve transporter les échantillons dans un dessiccateur (afin d'éviter l'absorption d'humidité trouvée dans l'aire), puis les peser avec une précision de l'ordre de 0.1 mg ;
- Immerger dans l'eau distillée (ou de pureté équivalente) et laisser :
  - Soit à 23°C pendant 24h (méthode1) ;
  - Soit bouillante pendant 30min (méthode2) ;
- Les films sont régulièrement prélevés de l'eau, ensuite essuyer avec du papier absorbant l'excès d'eau puis pesée à nouveau ;

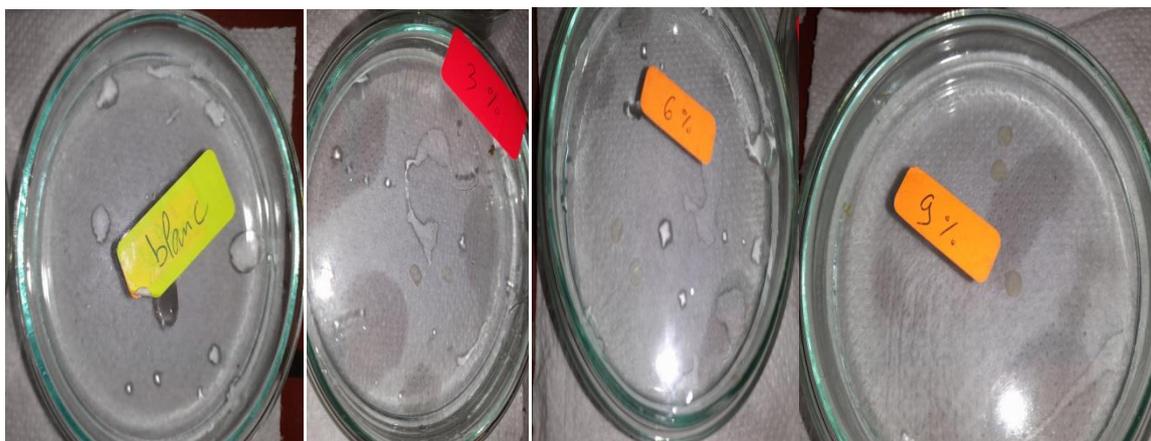
La masse mesurée est  $m_h$  chaque valeur de  $m_h$  est une valeur moyenne de 3 mesures.  
Le pourcentage d'eau absorbée est déterminé par la formule suivante :

$$\%Abs = \frac{m_h - m_s}{m_h} * 100$$

Avec :

$m_h$  : masse humide

$m_s$  : masse sèche



**Figure 22 :** Test d'absorption d'eau.

#### II.3.4.2. Test de traction

- **Principe**

L'essai consiste à soumettre une éprouvette à un effort de traction sur un axe en vue de déterminer une ou plusieurs caractéristiques mécanique.

#### **Domaine d'application**

Le présent document définit le mode opératoire à suivre pour déterminer les propriétés en traction d'un échantillon de produit fini ou semi fini d'un film plastique ou composite à base de plastique dont l'épaisseur est  $< 1\text{mm}$ .

Les propriétés que cette méthode nous permet de définir sont :

- Le module de traction
- Le module sécant à 1% d'allongement
- La limite d'élasticité (résistance élastique)

- L'allongement à la limite d'élasticité
- Contrainte nominale (résistance à la traction)
- Allongement à la contrainte nominale
- Résistance à la rupture
- Allongement à la rupture

L'essai effectué à la vitesse constante nous permet de tracer la courbe contrainte/allongement grâce aux valeurs recueillis de l'extensomètre et de la cellule de charge.

### **Moyens**

- Machine de traction universelle Zwickroell avec testcontrol
- Cellule de charge 500N
- Extensomètre classe I
- Logiciel test expert II
- Cutter
- Règle métallique gradué
- Gabarit de coupe 20 mm

### **Remarque**

Les éprouvettes doivent être prélevées d'un échantillon exempt de pile, froissement ou contaminé, distribué sur toute la largeur du film uniformément.

Pour le bon déroulement du test nous avons besoin d'au moins 5 éprouvette dans chaque direction (transversale/longitudinal) et doivent être identifié en conséquence lors du prélèvement.

### **Mode opératoire**

- Mettre sous tension la machine et lancer le logiciel test expert
- Vérifier le bon fonctionnement de tous les organes de sécurité (voir manuel d'utilisation Zwick Roell)
- Valider les paramètres d'essai a l'onglet Assistant
  - Essai préliminaire :

Position initiale:75 mm

Pré charge : désactivé

- Paramètre :

Type de courbe : automatique

Module de traction :  $v=100\text{mm/min}$  ; Méthode : Régression ; Début :  $\epsilon=0.005\%$  ; fin :  $\epsilon=0.25\%$

Contrainte élastique :  $v=100\text{mm/min}$  ; chute de force : 1% ; sensibilité : 0.5% ; fin :  $\epsilon=25\%$

Seuil de rupture : à 10% de chute de force max

Aspect Média : Désactivé (non équipé)

Paramètre PV

- Rappeler l'outillage a la position initial et placer l'éprouvette entre les pinces de préhension de manière à ce qu'elle soit droite et non tendu (la valeur de force lu a cette étape de l'essai doit être  $<0.5\text{N}$ )
- Fermer Barrière de protection et démarrer l'essai
- A l'arrêt lors de la rupture attendre que l'outillage soit en position initial pour avoir la barrière de protection et retiré l'éprouvette rompu
- Recommencer pour chaque éprouvette

**Remarque :** Les éprouvettes de direction différente doivent être enregistrées dans des sous-séries différentes

### **Test aberrant**

Si le test est interrompu, l'éprouvette glisse entre les pinces ou la courbe présente un départ parabolique l'éprouvette doit être remplacé et ne doit pas être prise en compte dans les résultats de l'essai.

En outre un test Grubbs avec une signifiante  $\alpha=5\%$  et appliqué pour toutes les valeurs des résultats d'une même sous série (résultats inscrit dans les statistiques).

### **Détermination du module sécrant a $\epsilon=1\%$**

Pour chaque essai.

$$E1\% = \sigma_x / 0.01$$

### Détermination du module de traction

$$E_t = \frac{\sigma_{0.25\%} - \sigma_{0.05\%}}{0.002}$$

### Estimateur du module de Young

Remarque : A n'utilise que pour un test comparatif  $E = \sigma / \varepsilon$

#### II.3.4.3. Test d'activité antibactérienne

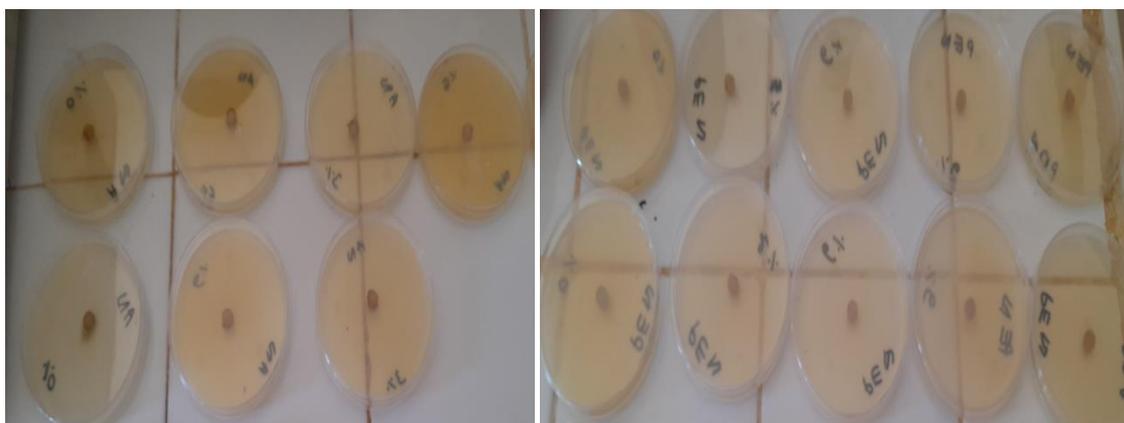
- **Méthode d'ensemencement en surface**

Quatre souches bactériennes dont trois à gram + (*Staphylococcus aureus*, et *Bacillus subtilis*) et une souche à gram négatifs (*Klebsiella pneumoniae*.) sont utilisés pour évaluer l'activité antibactérienne des films. Le test de diffusion sur agar, selon la méthode de Kirby Bauer, permet d'évaluer l'activité antimicrobienne des films par la formation d'une zone d'inhibition de la croissance des microorganismes. Les films sont testés sous forme de pastilles de 6mm de diamètre découpées à l'emporte-pièce. Trois pastilles sont testées pour chaque échantillon. Elle sont préalablement stérilisées par immersion dans l'éthanol pendant 5 min, puis séchées à température ambiante [91].

#### II.3.4.4. Activité antifongique :

On suit le même protocole appliqué pour l'extrait (II.3.3.5. **Activité antifongique**).

Par contre on remplace les disques d'extrait par des disques de films de 6 mm de diamètre.



**Figure 23:** Mise en évidence de l'effet antifongique des films.

Chapitre III  
Chapitre III  
Résultats et Discussion  
Résultats et Discussion

## Chapitre III. Résultats et Discussion

### III .1. Résultats de la teneur en composés phénoliques EFO

#### III.1.1. La teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux d'EFO a été effectuée par la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ( $\mu\text{m}$  EAG/mg d'extrait), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ( $y = 0,0099x - 0,024$   $R^2 = 0,993$ ) (Annexe I). Les constituants phénoliques totaux de l'extrait ont été trouvés avec une valeur de  $603 \mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait, cette dernière est élevée par rapport à celle de la théorie ( $450 \mu\text{g}$  EAG/mg) et cela due à plusieurs facteurs (la région, la méthode, le moment de la récolte etc...) (figure 24).

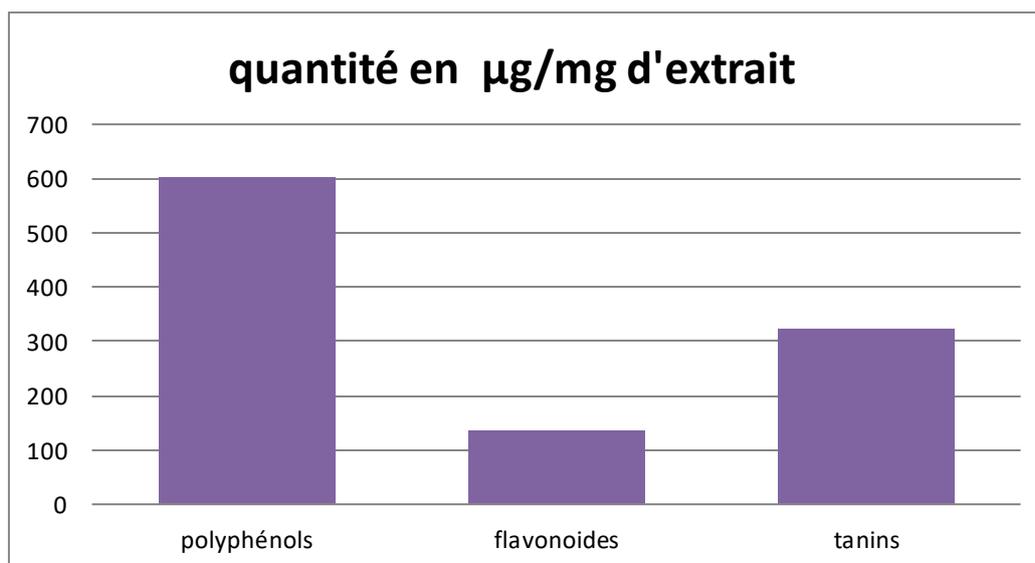
#### III.1.2. La teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux a été effectuée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). Les résultats obtenus sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent de quercétine par mg d'extrait ( $\mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait) en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la quercétine ( $y = 0,0344x + 0,0181$   $R^2 = 0,9992$ ) (Annexe II). La teneur a été estimée à  $135 \mu\text{m}$  EAG /mg d'extrait (figure 24).

#### III.1.3. La teneur en tanins condensés

La méthode pour déterminer la teneur en tanins condensés consiste à dépolymériser les tanins en milieu acide, et après réaction avec la vanille, à les transformer en anthocyanidols.

Les résultats obtenus sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent de catéchine/mg d'extrait ( $\mu\text{g}$  EC/mg d'extrait), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de catéchine ( $y = 0,000618x + 0,000199$   $R^2 = 0,9899$ ). la teneur a été estimée à  $322 \mu\text{g}$  EC/mg d'extrait (figure 24) [94].



**Figure 24 :** Histogramme de teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier.

Les résultats de cette étude ont démontré que l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier très riche en polyphénols, en flavonoïdes et tanins.

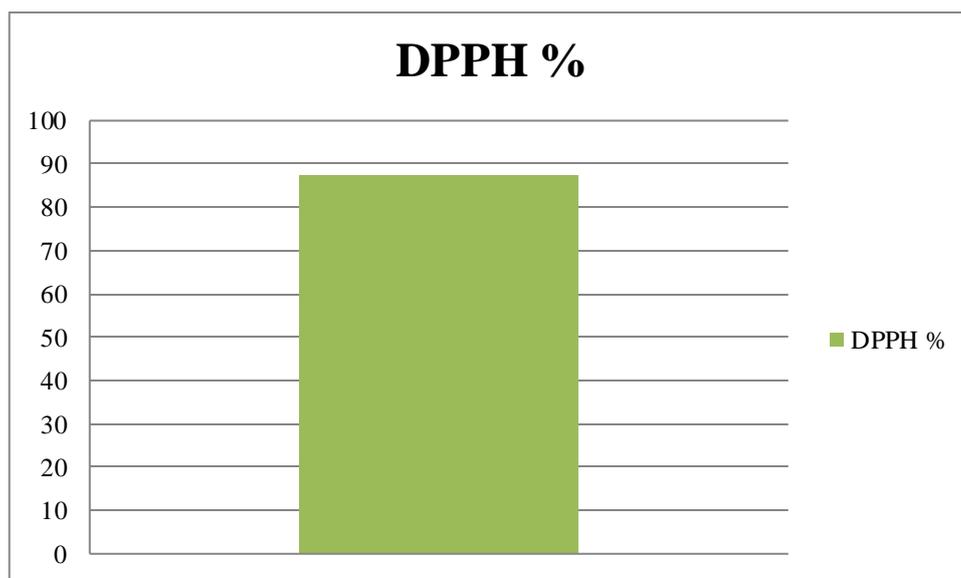
Les investigations faites sur la détermination de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et de tanins de l'extrait des feuilles d'olivier sont nombreuses, et les résultats sont différents d'une étude à l'autre. L'extrait éthanolique des feuilles d'olivier présente une teneur en polyphénols totaux de 603 µm EAG/mg, une teneur en flavonoïdes de 135 µm EQ /mg d'extrait, et une teneur en tanins de 322 µm EQ/mg d'extrait [95].

On peut conclure que l'extrait des feuilles d'olivier constitue une source prometteuse en composés phénoliques. La quantité de ces derniers dépend d'un nombre de facteurs tels que : l'origine géographique et botanique, le moment et la méthode de la récolte, le solvant et la méthode utilisés pour l'extraction [96].

### III.1.4. Activité antioxydante

#### III.1.4.1. Effet de piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydante est réalisée par la méthode du radical (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) DPPH qui est une méthode piégeage du radical libre stable DPPH par une molécule antiradicalaire, le choix de ce test est basé sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical. Le résultat du test au DPPH de l'extrait des feuilles d'oliviers est présenté dans le graphe suivant :



**Figure 25 :** Histogramme de DPPH de l'extrait éthanolique de l'extrait des feuilles d'olivier.

Les résultats du test DPPH de l'extrait des feuilles d'oliviers se caractérisent par une importante activité de piégeage du radical DPPH (87,67 %). L'augmentation de l'activité anti oxydante dans notre extrait s'explique par la richesse de ce dernier en poly phénols.

Le taux de l'activité antioxydante de l'extrait des feuilles d'olivier dépend de plusieurs facteurs tels que : l'origine géographique et botanique, le moment de la récolte, et le solvant ainsi que la méthode utilisée pour l'extraction [97].

### III.1.5. Résultats d'analyse spectrométrique à transformation de Fourier IR

La figure (26) représente les spectres IR-FT de la poudre et l'extrait des feuilles d'olivier.

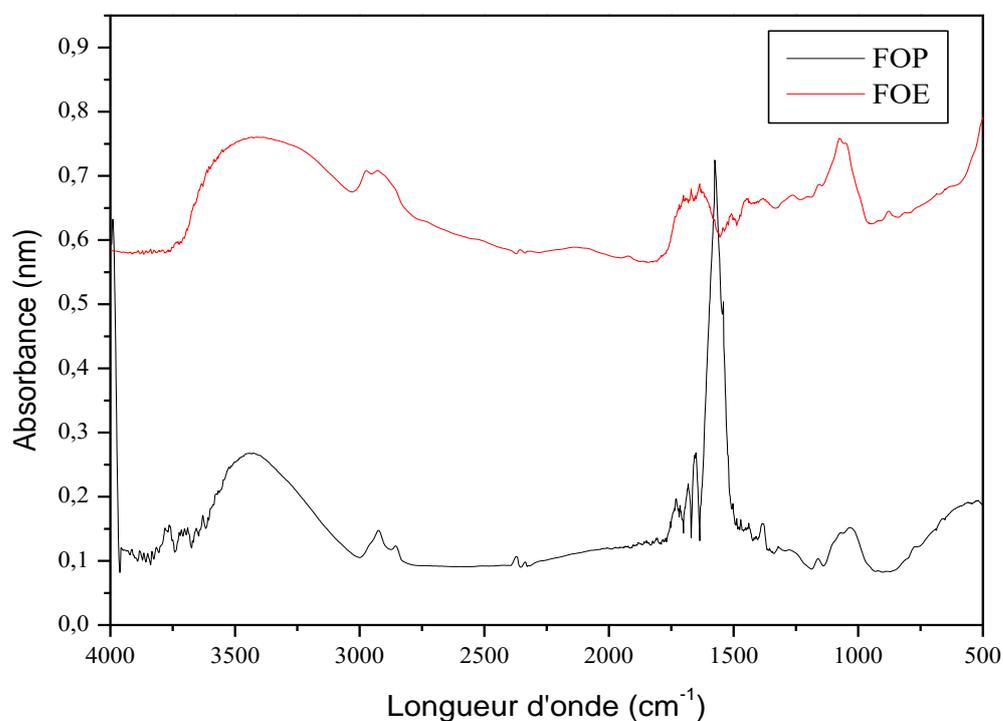
D'après notre spectre IR-FT on remarque que la poudre et l'extrait des feuilles d'olivier ont une presque la même structure. Cependant, on remarque que l'intensité des différentes bande d'absorption d'extrait a légèrement augmenté à celle de la poudre des feuilles d'olivier. Cette différence est due au solvant d'extraction utilisé.

Pour les deux spectres, on remarque:

- Une large bande d'absorption située entre  $3450\text{ cm}^{-1}$  qui est attribuée aux vibrations d'élongation des groupements -OH d'alcool (phénol).
- Deux pics centrés à  $2970$  et à  $2920\text{ cm}^{-1}$  attribués aux vibrations des groupements C-H.
- Une bande située aux alentours de  $1700\text{ cm}^{-1}$  qui attribuée aux vibrations des groupements C=O des acides carboxyliques et des acétones aromatiques.

- Un pic à  $1650\text{ cm}^{-1}$  aux vibrations d'élongations des liaisons C=C des alcènes.
- Un pic situé à  $1434\text{ cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations de déformations des groupements C-H.
- Une large bande à  $1050$  et à  $1450\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations d'élongations des liaisons C-O des acides et des esters présents dans les feuilles d'olivier (éther).
- Un pic situé à  $879\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations d'élongations des liaisons C-C des alcanes [98].

D'après ces résultats obtenus on conclut que notre extrait est riche en polyphénols.



**Figure 26 :** Spectre infrarouge d'extrait et la poudre des feuilles d'olivier.

### III.1.6. Résultats d'évaluation de l'activité antibactérienne

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien des extraits isolés des feuilles d'olivier (*Olea europaea* var. *Europeae*) par la méthode d'ensemencement sur un milieu gélosé solide (Mueller-Hinton).

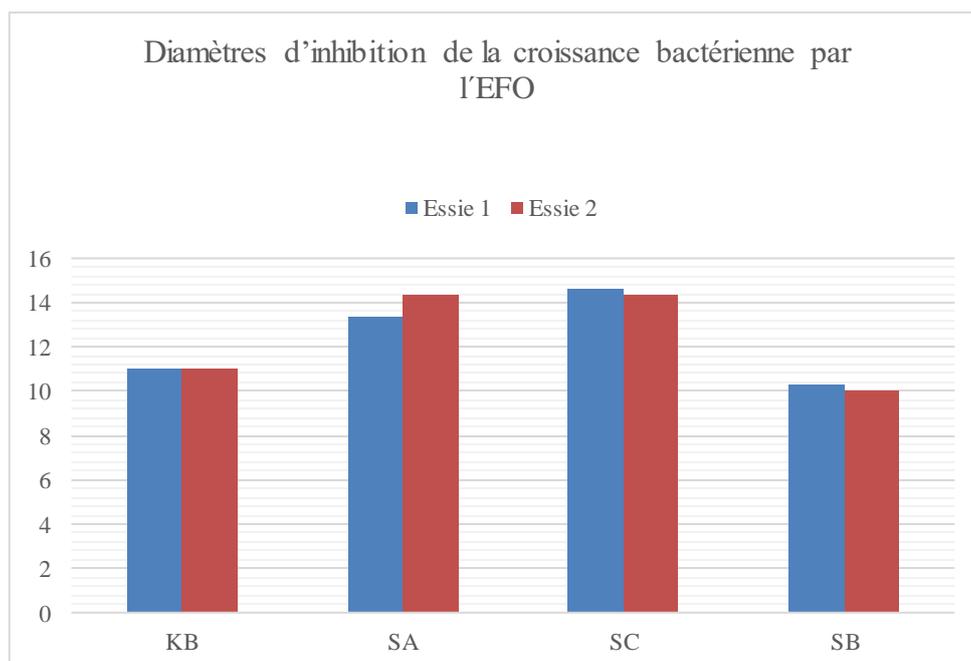
L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de quatre (04) souches référenciées dont Trois (03) bactéries Gram + et une (01) bactérie Gram -.

Après incubation à 37°C pendant 24h. Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier sont représentés dans les figures et le tableau suivants :

**Tableau 7:** Activité anti bactérienne par l'EFO.

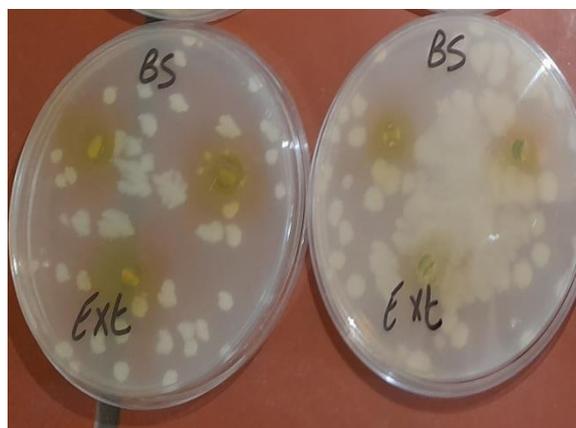
|           | Diamètre en (mm) |          |      |    |
|-----------|------------------|----------|------|----|
|           | Essaie 1         | Essaie 2 | DMSO | MH |
| <b>KB</b> | 11               | 11       | -    | -  |
| <b>SA</b> | 13,33            | 14,33    | -    | -  |
| <b>SC</b> | 14,66            | 14,33    | -    | -  |
| <b>SB</b> | 10,33            | 10       | -    | -  |

(-)Absence d'activité antibactérienne

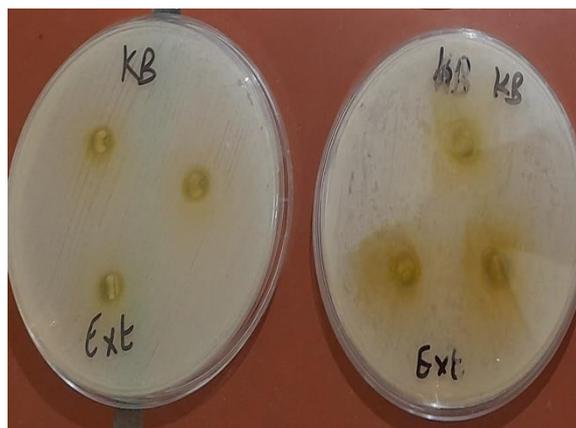


**Figure 27:** Histogramme des diamètres d'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO.

Les tests d'activité antimicrobienne ont permis de mettre en évidence la présence d'une importante activité sur les différentes souches testées. Les zones d'inhibition et leurs diamètres sont présentés dans les figures ci-dessous.



**Figure 28 :** Image de l'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO pour la bactérie *Bacillus subtilis*.



**Figure 29 :**Image de l'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO pour la bactérie *Klebsiella pneumoniae*.



**Figure 30:**Image de l'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO pour la bactérie *Staphylococcus clinique*.



**Figure 31 :**Image de l'inhibition de la croissance bactérienne par l'EFO par la bactérie *Staphylococcus aureus*.

Les résultats des essais antimicrobiens vis-à-vis les espèces, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*; *Klebsiella pneumoniae*. Révèlent une variation des valeurs d'inhibition par les extraits testés. Montrent que l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier présente une activité antimicrobienne sur la souche à Gram négatif à savoir : *Klebsiella pneumoniae* et les souches à Gram positif à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* [99].

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition analysés montrent que l'extrait des feuilles d'olivier est significativement plus actif avec (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) (souche à Gram+), avec des zones qui varient de 13.33 mm à 14.33 mm, 14.66 mm à 14.33 mm et 10 mm à 10.33 mm respectivement. Alors que sur la souche *Klebsiella pneumoniae* (souche à Gram-) l'effet est moins important avec une moyenne de 11 mm.

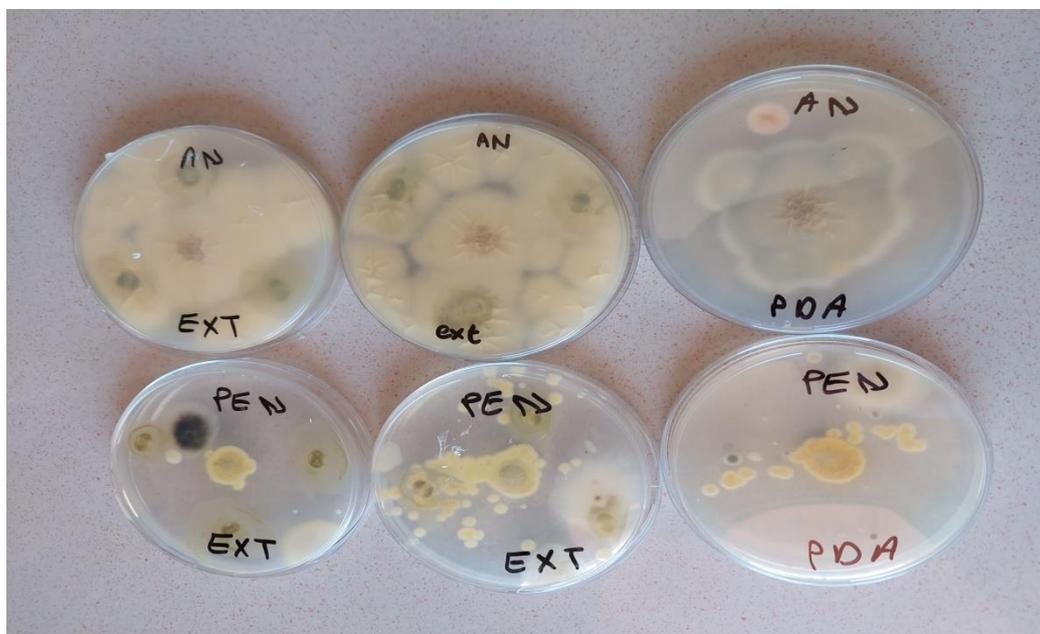
Ces résultats se concordent avec ceux obtenus par plusieurs auteurs qui ont montré que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif aux extraits des feuilles d'olivier. Nos résultats, sont également en accord avec ceux de Seguin (2011) qui ont montré que les feuilles d'olivier possèdent un effet inhibiteur important sur *Staphylococcus aureus* (souche à Gram+), alors que sur la souche *Klebsiella pneumoniae* (souche à Gram-) l'effet est moins important.

Les feuilles d'olivier possèdent une activité antibactérienne en particulier contre les bactéries à Gram positif, cette activité est due aux flavonoïdes et acides aromatiques [100]. La faible sensibilité des bactéries Gram négatif à l'égard de l'extrait éthanolique de l'EFO serait due à leur membrane externe qui empêche le passage des feuilles d'olivier [101]. Ces différences dans l'activité antimicrobienne de l'extrait des feuilles d'olivier peuvent être liées à son origine botanique, au solvant d'extraction, la concentration de l'extrait dans le DMSO ou aux microorganismes testés [102].

### III.1.7. Résultats d'évaluation de l'activité antifongique de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier

Afin d'étudier et d'évaluer l'activité antifongique de l'extrait éthanolique de l'extrait des feuilles d'olivier, deux souches fongiques dont. *Aspergillus niger* et *penicillium sp* sont utilisés.

Les résultats du test d'activité antifongique illustrés dans les figures ci-dessus ont révélé que l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier n'a donné aucune activité antifongique contre: *Penicillium Sp* et *Aspergillus Niger*.



**Figure 32 :** Images du test d'inhibition de la croissance antifongique par l'extrait des feuilles d'olivier.

L'absence de l'activité antifongique est due à plusieurs facteurs tels que la méthodologie, les micro-organismes testés et les extraits utilisées (Pattnaik et al., 1996). Les différences d'activité antifongique d'extrait des feuilles d'olivier peuvent être attribuées aux différences de composition chimique et à la concentration de l'extrait utilisé [103] d'une part, et d'autre part à la région botanique et aux conditions climatiques de la région des feuilles d'olivier utilisée, mais aussi à le moment de la récolte[104].

## III.2. Films PLA / EFO

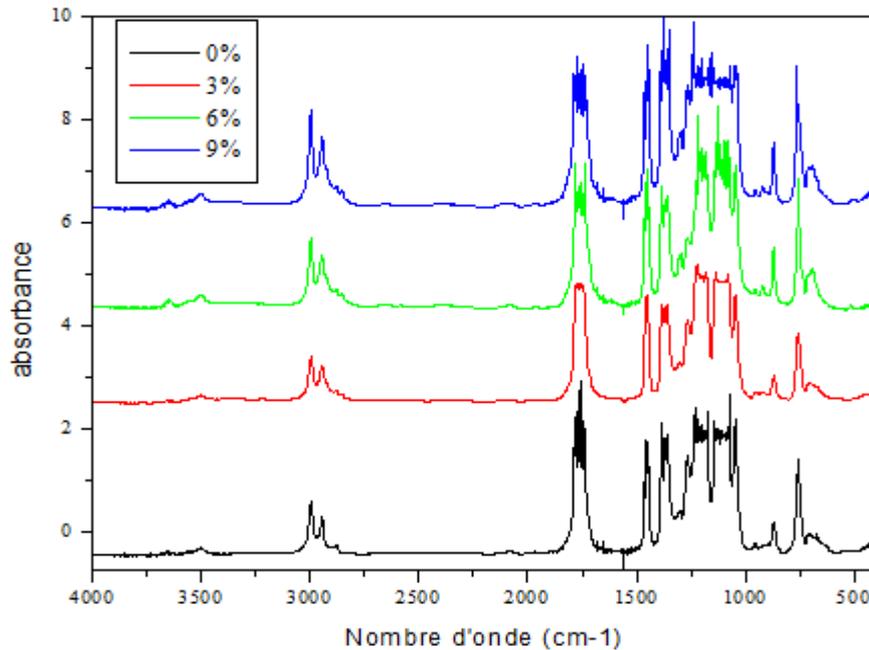
### III.2.1. Analyse spectrométrique à transformation de Fourier IR

La figure (III.33) représente les spectres IR-FT des films à base de PLA et d'extrait des feuilles d'olivier. Les spectres des films à base de PLA ont révélé la présence de plusieurs pics ainsi que des bandes d'absorption, on cite notamment

- Deux pics centrés situés à 3000  $\text{cm}^{-1}$  et 2965  $\text{cm}^{-1}$  attribués aux vibrations d'élongations des groupements  $-\text{CH}$  ;
- Deux pics situés à 1750  $\text{cm}^{-1}$  et 1760  $\text{cm}^{-1}$  attribués aux vibrations d'élongations des groupements carbonyles  $-\text{C}=\text{O}$  ;
- Un pic centré est situé à 1450  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations d'élongations des liaisons  $-\text{C}-\text{H}$  ;
- Une bande d'absorption centrée à 1300  $\text{cm}^{-1}$  attribués aux vibrations d'élongation des liaisons  $-\text{C}-\text{O}$  ;
- Un pic situé à 1050  $\text{cm}^{-1}$  attribué aux vibrations d'élongations des liaisons  $-\text{C}-\text{O}$  ;
- Un pic centré situé 867  $\text{cm}^{-1}$  est attribué aux vibrations des liaisons  $-\text{C}-\text{C}$  ;
- Deux bandes d'absorptions centrées à 3650  $\text{cm}^{-1}$  et 3500  $\text{cm}^{-1}$  qui sont attribués aux vibrations d'élongations des groupements alcools et phénols de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier.
- Une bande d'absorption centrée à 3280  $\text{cm}^{-1}$  attribué aux vibrations d'élongations des liaisons  $\text{O}-\text{H}$  alcool du glycérol ainsi de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier.
- Une large bande d'absorption située aux alentours 1660 -1580  $\text{cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations d'élongations des groupements  $\text{C}=\text{C}$  aromatiques de l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier.

- Un pic centré à 1370  $\text{cm}^{-1}$  attribué aux vibrations d'élongations des groupements nitro C-NO<sub>2</sub> aromatiques à l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier [105].

On remarque que les bandes et les pics sont presque les mêmes pour tt les films. La différence dans l'absorbance est due aux quantités d'extrait ajouté aux films.

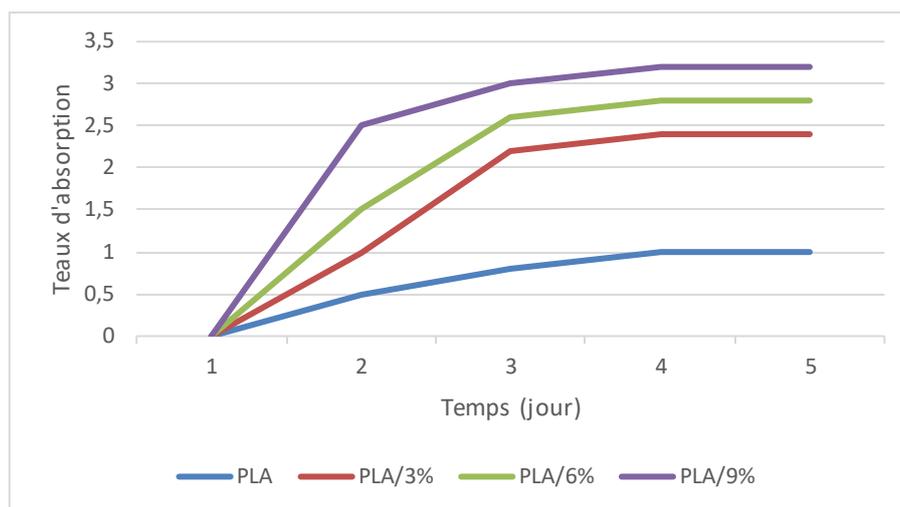


**Figure 33:** Spectre infrarouge films PLA/EFO.

### III.2 .2. Taux d'absorption d'eau

D'après les résultats obtenus sur le test d'absorption d'eau on constate que masse des films n'augmente pas durant les 24h de l'analyse, pour tous les échantillons (PLA vierge et les composites PLA chargés de l'extrait des feuilles d'oliviers à différentes concentrations 3%,6%,9%).

La figure suivante montre la variation du taux d'absorption d'eau en fonction du temps du PLA vierge, PLA/EFO pour différentes concentration.



**Figure 34 :** variation du taux d'absorption d'eau en fonction du temps du PLA vierge, PLA/EET pour différentes concentration.

A partir de ces figures, on constate que le taux d'absorption d'eau augmente rapidement pendant le premier jour, pour tous les échantillons (PLA et les composites PLA chargé des feuilles d'olivier à différentes concentrations) puis elle varie lentement pendant les 4 jours suivants pour se stabiliser au bout de 6eme jour. Par comparaison des taux d'absorptions d'eau, on peut constater que la matrice PLA seule enregistre un taux d'absorption ne dépassant pas 1.2% et cela est attribué au caractère hydrophobe de polymère. Par incorporation d'extrait des feuilles d'olivier dans la matrice du PLA le taux d'absorption d'eau deviennent de plus en plus important au fur et à mesure que l'on augmente la concentration de l'extrait des feuilles d'olivier et la valeur maximale obtenue est voisine de 3.5% pour l'échantillon le plus concentré (9% d'extrait de FO). Ce changement de caractère vis-à-vis de l'eau est probablement dû à la nature chimique des différents constituants d'EFO contenant des groupements hydroxyles, ces derniers forment avec les molécules d'eau des liaisons hydrogènes, donc plus le taux de l'extrait est élevé, plus la concentration en OH- s'accroît et par conséquent le taux d'absorption devient plus important [106].

Wong et al., (1992), ont rapporté que l'utilisation des composés hydrophiles entraîne une variation de la micro structure du film, incluant ainsi une diminution de la densité et une formation de pores et des bulles d'airs, qui peuvent être l'origine de la diminution des propriétés de barrière des films [106].

### III.2.3 Résultats du test d'attraction

Dans ce tableau sont résumés les résultats du test de traction pour le PLA vierge ainsi que pour les différents pourcentages d'extrait de feuille d'olivier à savoir **3 % 6 % et 9 %** dans le PLA.

**Tableau 9** : comparaison des propriétés mécanique

| <b>% D'EXTRAIT DE FEUILLE D'LIVIER</b> | <b>MODLE DE YOUNG (MPa)</b> | <b>CONTRAINTE A LA RUPTURE (MPa)</b> | <b>ALLONGEMENT A LA RUPTRE (%)</b> |
|--|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| <b>PLA a (0%)</b>                      | 263                         | 15                                   | 5.4                                |
| <b>PLA a (3%)</b>                      | 239                         | 37.1                                 | 4.5                                |
| <b>PLA a (6%)</b>                      | 230                         | 22.1                                 | 3.6                                |
| <b>PLA a (9%)</b>                      | 212                         | 10.3                                 | 3.2                                |

On remarque du tableau comparatif que quand l'extrait de feuille d'olivier augmente l'élongation à la rupture diminue cette dernière joue le rôle d'une charge renforçante pour une meilleure rigidité.

Pour l'extrait à **3%** et à **6%** on remarque clairement la hausse de la contrainte a la rupture qui est du à l'augmentation de la rigidité même si on a une légère diminution de module du probablement à la réticulation des chaînes moléculaires.

Cependant pour le PLA a **9%** d'extrait les trois caractéristiques montre une baisse de propriétés mécanique assez importante cela explique que à 9% d'extrait du renfort le PLA perds de ses propriétés contrairement aux autres pourcentages cités.

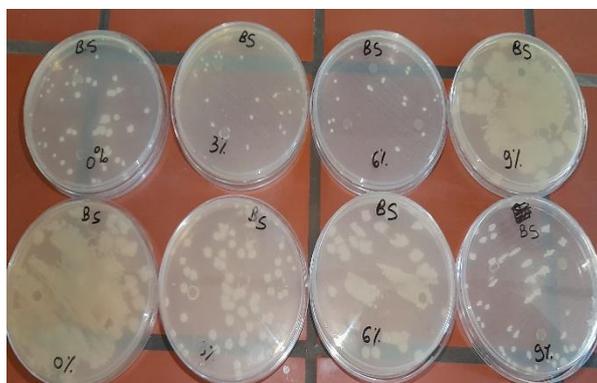
Nous avons conclu que le PLA possède des propriétés mécaniques correctes, mais que l'allongement à la rupture doit être amélioré pour pouvoir rivaliser avec les polymères pétrochimiques classiques. Pour ce faire, plusieurs voies ont été étudiées : la plastification, la modification de la structure chimique du PLA et le mélange avec d'autres polymères ou des charges renforçâtes.

### III.2.4. Résultats du test d'activité antibactérienne des films

Les essais de pouvoir antimicrobien ont été réalisés par la méthode de diffusion sur agar. C'est un test préliminaire et qualitatif, recommandé par la pharmacopée française afin d'avoir une idée sur le potentiel inhibiteur.

La méthode de diffusion des disques nous a permis de vérifier le pouvoir antibactérien des films PLA /EFO vis-à-vis les espèces microbiennes choisies (Figures 39, 40, 41, 42).

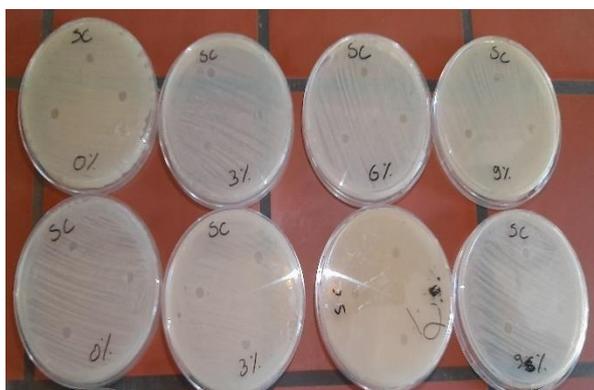
Dans cette investigations, les films PLA /EFO, de différents concentrations 0%, 3%, 6% et 9% n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la croissance des souches bactériennes (*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*). Nos résultats ne concordent pas avec ceux trouvés dans le test d'activité antibactérienne des extraits. Cela est peut être associé a une mauvaise adhésion entre l'extrait des feuilles d'olivier qui contient des molécules hydrophiles et le PLA hydrophobe. L'absence de l'effet inhibiteur peut être aussi explique par la mise en contact de l'extrait et le chloroforme (probabilité de la destruction de certain agent actif) [107].



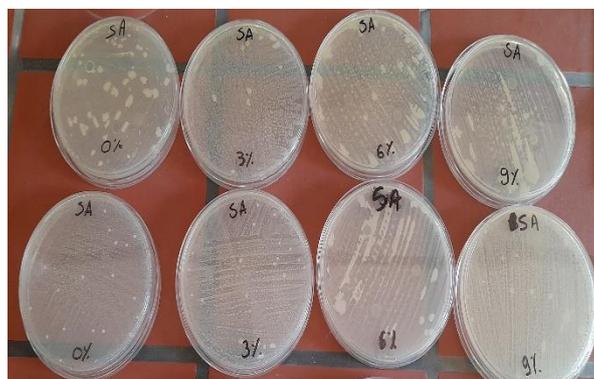
**Figure 39** : les résultats antibactériens des films pour la bactérie *Bacillus subtilis*.



**Figure 40 :** les résultats antibactériens des films pour la bactérie *Klebsiella pneumoniae*.



**Figure 41:** les résultats antibactériens des films pour la bactérie *Staphylococcus clinique*.



**Figure 42:** les résultats antibactériens des films pour la bactérie *Staphylococcus aureus*.

### III.2.5. Résultats du test d'activité antifongique des films

Les films PLA ont été utilisés comme témoin.

Dans le cas des films PLA, aucune activité antifongique n'a été enregistrée contre toutes les souches fongiques testées.

Dans cette investigation, les films PLA/EFO (0%, 3%, 6%, 9%) n'ont pas présenté une activité antifongique contre toutes les souches testées (*Aspergillus niger*, *penicillium sp.*).



**Figure 43 :** Résultats antifongique des films pour la souche *penicillium sp.*



**Figure 44 :** Résultats antifongique des films pour la souche *Aspergillus niger*.

Dans cette investigation, les films PLA /EFO, avec les différentes concentrations de 0%, 3%, 6% et 9% n'ont montré aucun effet antifongique sur la croissance des souches (*Aspergillus niger*, *penicillium sp.*).

Une étude, menée par (A. HARRAR) a montré que la structure chimique des constituants d'extrait influence directement sur l'activité antifongique et que la réduction de l'activité se

produit généralement entre les molécules actives et les composés non oxygénés, qui réduisent leur solubilité et donc leur efficacité [108]. Cela est peut être expliqué aussi par la nature de l'extrait, la variété de la plante, les protocoles d'extraction ou la région de la récolte qui influencent de manière significative sur les activités biologiques des extraits.

Conclusion

## Conclusion

Le PLA offre de grandes possibilités dans une large gamme d'applications de produits d'emballage alimentaire et rivalise avec le polystyrène et le polyéthylène. Ainsi, l'objectif principal de cette étude était de développer un emballage biodégradable actif en ajoutant l'extrait des feuilles d'olivier pour la libération des agents antimicrobiens afin de contrôler en permanence le processus de détérioration dans les aliments.

Plusieurs techniques de caractérisation ont été utilisées afin de recueillir le maximum d'information sur l'extrait des feuilles d'olivier et les films composites PLA/EFO.

Le dosage des composés phénoliques a montré :

- la richesse de notre extrait en polyphénols, flavonoïdes et les tanins avec des taux de 565.47 µg EAG/mg, 135.32 µg EQ/mg et 332.331 EAG respectivement, ces derniers sont plus importantes comparé à ceux donnés par la littérature (450 µg EAG/mg). On constate donc que ce taux dépend de la région, la récolte, la saison...) de plus il possède un taux très élevé en activité anti oxydante avec une valeur de 87.67%.

- l'analyse de la Spectroscopie infrarouge montre des pics et bandes d'absorption qui correspondent aux : flavonoïdes, les alcanes et les acides carboxyles ....

L'extrait éthanolique des feuilles d'olivier possède un effet antibactérien vis-à-vis les souches bactériennes testées (*staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *klebsiella sp*). Par contre n'a aucune activité antifongique vis-à-vis les souches fongique testées (*penicillium sp*, *aspergillus niger*). Et cela est due probablement à la concentration de l'extrait utilisé (dilution dans le DMSO).

Le changement de caractère lors d'absorption vis-à-vis de l'eau est probablement dû à la nature chimique des différents constituants d'EFO contenant des groupements hydroxyles, ces derniers forment avec les molécules d'eau des liaisons hydrogènes, donc plus le taux de l'extrait est élevé, plus la concentration en OH- s'accroît et par conséquent le taux d'absorption devient plus important.

Pour le test de traction, l'extrait à 3% et à 6% on remarque clairement la hausse de la contrainte à la rupture qui est due à l'augmentation de la rigidité même si on a une légère diminution de module du probablement à la réticulation des chaînes moléculaires. Cependant pour le PLA à 9% d'extrait les trois caractéristiques montrent une baisse de propriétés mécanique assez importante cela explique que à 9% d'extrait du renfort le PLA perd de ses propriétés contrairement aux autres pourcentages cités. Plus on rajoute l'extrait plus le module de Young diminue.

La caractérisation avec l'IFTR ont presque les mêmes bandes et pics y'a une légère différence cela est due à la concentration des films on extrait utilisé.

Pour l'activité antibactérienne et antifongique n'a révélé aucune activité. Cela est peut être associé à une mauvaise adhésion entre l'extrait des feuilles d'olivier qui contient des molécules hydrophile et le PLA hydrophobe.

# Références Bibliographiques

## **Références bibliographiques**

- [1] N. Keklik, M. Demirci, V. Puri, Inactivation of *Listeria monocytogenes* on unpackaged and vacuum-packaged chicken frankfurters using pulsed UV-light, *Journal of Food Science* 74, M431-M439, 2009.
- [2] [https://www.usherbrooke.ca/environnement/fileadmin/sites/environnement/documents/Essais2012/Lapointe\\_R\\_06-09-2012\\_.pdf](https://www.usherbrooke.ca/environnement/fileadmin/sites/environnement/documents/Essais2012/Lapointe_R_06-09-2012_.pdf)
- [3] Djelalli Souad, Elaboration caractérisation et biodégradabilités des mélanges PEBD/PLA et PEBD/EGMA/PLA, thèse de doctorat, Université de setif 1, 2014.
- [4] De Lima GG, De Souza RO, Bozzi AD, Poplawska MA, Devine DM, Nugent MJD. (2016). Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 1248-1257.
- [5] Aboutayeb R. (2011). Emballages alimentaires, sciences et techniques des industries agroalimentaires.
- [6] Robertson, G. L. (2009). *Food packaging and shelf life: a practical guide*. CRC Press.
- [7] Cyrek, P. (2015). Opakowanie jako źródło informacji o produktach żywnościowych. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego. Problemy Zarządzania, Finansów i Marketingu, (Marketing przyszłości. Trendy. Strategie. Instrumenty. Komunikacja marketingowa przedsiębiorstw z otoczeniem)*.
- [8] Ciechomski, W. (2008). Opakowanie jako instrument promocji. *LogForum*, 4(4).
- [9] Jeant R., Groguenec T., Schuch P., Brule G., 2007. *Science des aliments ; biochimie, microbiologie, procédés produits*. Lavoisier. Volume 2 technologie des produits alimentaires. Paris. p 407-436.
- [10] CNE., 2011. L'emballage et la santé, l'hygiène et la sécurité. Siret n°41513678700025 APE : 913. Paris. P2-3.
- [11] Alonso-Salces RM, Cugnata NM, Guaspari E, Pellegrini MC, Aubone I, De Piano FG, Antunez K, Fuselli SR. (2017). Natural strategies for the control of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review *Apidologie*, 1-14.

- [12] Drescher N, Klein AM, Neumann P, Yañez O, Leonhard SD. (2017). Inside honeybee hives: impact of natural propolis on the ectoparasitic mite varroa destructor and viruses. *Insects*, 8, 15.
- [13] Berlinet C., 2006. Etude de l'influence de l'emballage et de la matrice sur la qualité de jus d'orange. thèse de doctorat en science alimentaires. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires (ENTSTA). France. P 8-10.
- [14] Afrouzan H, Zakeri S, Mehrizi AA, Molasalehi S, Tahghighi A, Shokrgozar MA, Eshaghi A, Djadid N.D. (2017). Anti-Plasmodial Assessment of Four Different Iranian Propolis Extracts. *Archives of Iranian Medicine*, 20, 270-281.
- [15] Boussoum M.O., 2012. Etude de méthodes de traitement pour diminuer la migration à partir des emballages en PVC. Thèse de magister en chimie de l'environnement. Ecole Nationale polytechnique (ENP). P 1.
- [16] Hamani A.B., Elkarari H., Gigon J., Girardon S., Prost-Dumont S., 2006. Interaction matériaux-aliments. Interaction matériaux aliments : valorisation scientifique ou marketing ? Master professionnel QUALIMAPA. P 28-38.
- [17] Kouame A.E.F., 2004. Etude de la migration des antioxydants phénoliques dans la boisson en sachet (Abidjan-Côte d'Ivoire). Thèse de doctorat en pharmacie. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. N°26. P39-40.
- [18] LNS., 2014. Phénomène de migration des matières plastiques au contact des aliments et réglementation. Intervention de Patrick Sauvegrain (Laboratoire National de métrologie et d'Essais). Paris. P1.
- [19] Multon J.L., Bureau G., 1998. L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Lavoisier. Paris. P77-967.
- [20] Pennarum P.V., 2005. Migration à partir de bouteilles en PET recyclé. Elaboration et validation d'un modèle applicable aux barrières fonctionnelles. Thèse de doctorat en chimie. Université Reims Champagne-Adrenne. France. P25.
- [21] Baley, C., Grohens, Y., et Pillin, I., "State of the art regarding biodegradable composites". *Revue des Composites et des Matériaux Avancés*, 14(2): p. 135-166, 2004.

- [22] M. Kolybaba, L.G. Tabil, S. Panigrahi, W.J. Crerar, T. Powell, B. Wang. Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future, presentation at the CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting, 2003.
- [23] El Hadji Babacar, Nouveaux matériaux composites thermoformables à base de fibres de cellulose, thèse de doctorat, 2008.
- [24] Valentina Siracusa, Pietro Rocculi, Santina Romani et Marco Dalla Rosa. Biodegradable polymers for food packaging: a review, Trends in Food Science & Technology, 19, 634-643, 2008.
- [25] Gupta B, Revagade N, Hilborn J. Poly (lactic acid) fiber: an overview. Prog Polym Sci; 32:455-82, 2007.
- [26] L. BOUZIDI ; S. CHANOUNE, (Elaboration et caractérisation d'un Composite Totalement Biodégradable), Université A.MIRA-BEJAIA, 2017.
- [27] S. Lee, characterization and processing of biodegradable polymer blends of poly(butylene succinate adipate), Korea-Australia Rheology journal, 7, 71-772, 2005.
- [28] POSS Molecules, [www.read.com /products/polymeric/poss.html](http://www.read.com/products/polymeric/poss.html).
- [29] Hybrid Plastics, [www.Hybridplastics.com](http://www.Hybridplastics.com)
- [30] A. Morgan, W. Gilman, characterization of polymer-layered silicate (caly) nanocomposites by transmission electron microscopy and X-ray diffraction, A comparative study journal of applied polymer science, 87.1329-1338, 2003
- [31] D. Garlotta, A literature review of poly (lactic acid), Journal of polymer and the environment, p 63-84.
- [32] R.J. Crawford, *Rotational Molding of Plastics second edition*. 1996: Research Studies Press LTD, J. Wiley & Sons Inc, 1996
- [33] B. Linnemann, S. Harwoko, T. Gries, polylactide fibers (PLA), Chemical fibers international, 53, 426-433.
- [34] A. Sodergard, M. Stolt, properties of lactic acid based polymers and their correlation with Composition, progress in polymer science, 27, 1123-1163, 2002.
- [35] H. Tsuji, Ikada. Y, characterization from the melt of poly (lactide) with different optical purities and their blends, macromolecular chemistry and physics, 197, 3483-3499, 1996.

- [36] H. Askanian, étude de la durabilité de matériaux respectueux de l'environnement biocomposites, Thèse docteur, université BLAISE PASCAL, pagination multiple, 2011.
- [37] E. Vink, R. Ra'bago, D. Glassner, B. Springs, R.P. O'Conner, J. Kolstad, R. Gruber, the sustainability if nature works TM polylactide fibers: an update of future, Macromolecular bioscience; Initiated by the 1st international conference on bio-based polymer, 2003.
- [38] B. Gumptra, N. Revaagde, Atthoff, J. Hilborn, preparation of poly (lactic acid), Influence of draw ratio on fiber properties, Journal of applied polymer science. 100, 1239-1246, 2005.
- [39] F. Mano, Y. Wang, Role of thermal history on the thermal history on the thermal behavior of poly (Llactic acid) studies by dsc and optical microscopy, Journal of thermal analysis and calorimetry, 80, 171-175, 2005
- [40] R. Auras, B. Harte, S. Selk, An overview of polylactides as packaging materials. Macromolecular science. 4, 835-865, 2004.
- [41] R. Datta, M. Henry, lactic acid: recent advances in products, processes and technology, Journal of chemical technology and biotechnology, 81, 1129-1129, 2006
- [42] CORDERIRO A.I., SANCHEZ-SEVILLA J.F., ALVAREZ-TINAUT M.C., GOMEZ-JIMENEZ M.C., 2008. Genetic diversity assessment of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 52 (4):642-647p.
- [43] BERTON C., BESNARD G., BERVILLÉ A., 2006a. Using multiple types of molecular markers to understand olive phylogeography. In: *De l'olivier à L « oleastre : Origine et domestication de Olea europaea L. dans le Bassin méditerranéen*. Cahiers agricultures vol. 15, n°4.
- [44] Guignard and Dupont., (2004) ; *Botanique : systématique moléculaire*. 13<sup>ème</sup> Eds, Masson France, P 164-179.
- [45] Verdier, E., (2003). *L'Huile d'olive*.
- [46] Lazzeri, Y., (2009) ; *Les défis de la mondialisation pour l'oléiculture méditerranéenne, L'olivier en Méditerranée*. In *Conférence Centre Culturel Français de Tlemcen-Algérie*. 1–24.
- [47] Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S., (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108, 253-262

- [48] Nefzaoui ,A., (1995) ; Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course.Syria 12-23 March 1995.
- [48] Fegeros, K., Zervas, G., Apsokardos, F., Vastardis, J., Apostolaki, E. (1995). Nutritive evaluation of ammonia treated olive tree leaves for lactating sheep. *Small Ruminant Research*, 17, 9-15.
- [49] Garcia-Verdugo ,C. , Forrest ,A.,Balaguer, L.,Fay ,C.,Vargas ,P.,(2010) ;.Parallel evolution of insular *Olea europaea* subspecies based on geographical structuring of plastid ADN variation and phenotypic similarity in leaf traits.*Bot.J.Linn.Soc.*,162 :54-63.
- [50] Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E. Sapirstein, H.D., (2005). Phenolic Content and antioxidant activity of Pearled Wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem.*, 82(4), 390-393.
- [51] Bruneton, J., (1993). *Pharmacognosie. Technique et documentation-Lavoisier*, Paris, p.278.
- [52] Lo Scalzo, R., Scarpati, M.L., Verzebgnassi, B., Vita, G., (1994). *Olea europaea* chemical repellent to *Dacis oleae* females. *J. Chem. Ecol.*, 20, 1813-1923.
- [53] Ozkaya, M.T, et Celik, M., (1999). Quantitative analysis of phenolic compounds in olive cuttings. *Acta Horticulturae*, 474, 477-480.
- [54] Leong, L.P., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 76, 69-75
- [55] Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 51, 304-315.
- [56] Karakaya, S., (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (6), 453- 64.
- [57] Fylaktakidou, K.C., Hadjipavlou-Litina, D.J., Litinas, K.E., Nicolaidis, D.N., (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr. Pharm. Des.* 10 (30), 3813-3833.
- [58] Habtemariam, S., (2003). Cytotoxic and cytostatic activity of erlangerins from *Commiphora erlangeriana*. *Toxicon.* 41 (6), 723-7.
- [59] Bruneton, J., (1993). *Pharmacognosie. Technique et documentation-Lavoisier*, Paris, p.278.

- [60] Altiok, E., Baycin, D., Bayraktar, O., Ulku, S., (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Sep. Purif. Technol.*, 62(2), 342-348.
- [61] Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P., Kefalas, P., (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392(5), 977-985.
- [62] Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P., Kefalas, P., (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392(5), 977-985.
- [63] Souhila, M., Mustapha, K., et Nacérah, M. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, P 35 à 40
- [64] Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A et Fandiño I. (2007). The Use of Essential Oils in Ruminants as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop*. November 13-14, Grantville (PA). p. 87-100.
- [65] E.Hurtado-Fernandez ,M.Gomez-Romero , A. Carrasco-Pancorbo, A. Fernandez-Gutierrez, Application and potential of capillary, electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 1130–1160, 2010
- [66] rshad, S., Mahmood, M., and Perveen, F. (2012). In Vitro Anti-Bacterial Activities of Three Medicinal Plants Using Agar Well Diffusion Method. *Research Journal of Biology*, Vol. 02, Issue 01, pp. 1-8
- [67] Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology
- [68] Neïla, B., R. (2012). Extraction, identification et caractérisation des molécules bioactives de la graine et de l'huile de *Silybum marianum*. Étude de leurs activités antioxydante et antitumorale. [en ligne] thèse de doctorat en science biologique. France : université de Lorraine. Disponible sur : <<https://hal.univ-lorraine.fr/te1-01749373/document>>

- [69] Ebringerová, A., & Hromádková, Z. (2010). An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides. *Open Chemistry*, 8(2). Doi: 10.2478/s11532-010-0006-2
- [70] Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105–113. Doi:10.1002/pca.631
- [71] Azwanida NN. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03). Doi: 10.4172/2167-0412.1000196
- [72] Penchev, P.I. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat, université de toulouse. 229p.
- [73] De Sousa D.P. *Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects*. Nova Science Publishers (2012). 1ère éd. 236p.
- [74] Duval L. *Les huiles essentielles à l'officine*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie. Université de Rouen, 2012.
- [75] [https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide\\_poly lactique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_poly lactique)
- [76] <https://www.naturaforce.com/soigner-lhypertension/feuilles-dolivier/>
- [77] Licitra G. (2013) .Etymologia : Staphylococcus .*Emerging Infections Diseases* ,19 ,1553.
- [78] Wertheim Hf, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. (2005) .The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *Lancet Infect Dis*, 5, 62-751.
- [79] <https://www.google.com/search?q=bassillus+subtilis&oq=bassillus+subtilis&aqs=chrome..69i57j46i13j0i1317.35851j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
- [80] Miller VL, Lawlor MS, Hsu J, Rick PD. ( 2005) .Identification of Klebsiella Pneumoniae virulence determinants using an intranasal infection model .*Molecular Microbiology* , 58, 1054-1073.
- [81] Morin O. (1994). *Aspergillus* et aspergillose : biologie. Edition techniques Encyclopédie Médico-chirurgicale (Elsevier Paris), Maladies infectieuses, 8-600-A-10.

- [82] Pitt, JI. (1988). An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycology* ,65, 1135-1157.
- [83] Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic photungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16,144-158.
- [84] Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic photungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16,144-158.
- [85] Simona belviso...et al, phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process, *food research International* 51(2013) 39-45)
- [86] Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity .*Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
- [87] Endo T, Fukunaga T, Yoshimura T, Esumi K. (2006). Scavenging DPPH radicals catalysed by binary noble metal-dendrimer nanocomposites. *Journal of colloid and interface Science* ,302 ,516-521.
- [88] LEMJALLAD Lamiaa Etude phytochimique et évaluation de différentes activités des extraits de *pimpinella anisum*.(2015)
- [89] Belaiche P (1979). Les techniques de laboratoire et l'aromatogramme. In : traité de la phytothérapie et l'aromathérapie, 121-132.
- [90] Karabay-Yavasoglu NU, Sukatar A, Ozdemir G, Horzum Z. (2007). Antimicrobial Activity of volatile components and various extracts of the red agla *Jania rubens*. *Phytotherapie research*, 21 ,153-156.
- [91] Khodayri M, Basti AA, Khanjari A , Misaghi A, Kamkar A, Shotorbani PM, Hamed H .(2018). Effect of poly (lactic acid) films incorporated with different concentrations of *Tanacetum balsamita* essential oil, propolis ethanolic extract and cellulose nanocrystals on shelf life extension of vacuum-packed cooked sausages .*Food packaging and shelf life*, 19,200-209.
- [92] Chibani N, Djidjelli H, Dufresne A, Boukerrou A, Samira N.( 2014) .Study of Effect of Old Corrugated Cardboard in Properties of Polypropylene Composites : Study of Mechanical

Properties , Thermal Behavior ,and Morphological Properties .Journal of Vinyl and Additive Technology , 1,1-8.

[93] Birck .C (2014) .Conception et caractérisation des films antibactériens à base de poly (alcool vinylique) pour l’emballage à contact alimentaire, these de doctorat, Université de Lille 1.

[94] Thomas MICHEL, Nouvelles méthodologies d’extraction, de fractionnement et d’identification : Application aux molécules bioactives de l’argousier(*Hippophae rhamnoides*).thèse, université d’Orléans, 2011.

[95] Segueni N. (2011). Contribution à l’étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis, thèse de doctorat, université Mensouri de Constantine.

[96] Ratajczak I, Waskiewicz A, Wozniak M, Mrowczynska L, Rogozinski M. (2019) .The role of seasonnality on the chemical composition, antioxydant activity and cytotoxicity of polish propolis in human erythrocytes .Revista Brasileira de Farmacognosia.

[97] castroML,Nascimento AM, Ikegari M, Costa-Neto CM, Alencar SM , Rosalen PL .(2001) .Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type6.Biorganic and medical chemistry ,17, 5332-5335.

[98] Bankova VS, Castro SL et Marcucci MC. (2000).Propolis recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 31, 3-15.

[99] Syed Ishtiaq Anjum , Amjad Ullah , Khalid Ali Khan , Mohammad Attaullah, Hikmatullah Khan ,Hussain Ali , Muhammad Amjad Bashir, Muhammad Tahir , Mohammad Javed Ansari, Hamed A. Ghramh , Nuru Adgaba , Chandra Kanta Dash.(2018).Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. Saudi Journal of Biological Sciences

[100] Marcucci MC, Ferreres F,Garcia-Viguera C, Bankova VS ,De Castro SL, Dantas AP, Valente PHM , Paulino N .(2001). Phenolic compound from Brazilian propolis with pharmalogical activities.Journal of Ethnopharmacology, 74,105-112.

[101] Tegos G, Stermitz F.R, Lomovskaya O, Lewis K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46 (10), 3133-3141.

- [102] Ugur A, Arslan T. (2004). An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 7, 90-4.
- [103] Paviani LC, Dariva C, Marcucci MC, Cabral FA. (2010) .Supercritical Carbon Dioxide Selectivity to Fractionate Phenolic Compounds from the Dry Ethanolic Extract of propolis .*Journal of Food Process Engineering*, 33, 15-27.
- [104] Lima G, De Curtis F, Castoria R, Pacifica S, De Cicco V. (1998) .Additives and natural products against post harvest pathogen compatibility with antagonistic yeasts .*Journal of Plant Pathology*, 80, 259.
- [105] Ulloa P, Vidal J, López de Dicastillo C, Rodriguez F, Guarda A, Cruz RMS, Galotto MJ (2018). Development of poly (lactic acid) films with propolis as a source of active
- [106] Wong, D. W., Gastineau, F. A., Gregorski, K. S., Tillin, S. J., & Pavlath, A. E. (1992). Chitosan-lipide films: microstructure and surface energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(4), 540-544
- [107] compounds : Biodegradability, physical, and functional properties. *Journal of applied polymer science*, 136, 1-11.
- [108] O. YuyueQina, L. Wenhui, D. Liub, Y. Minglong , L. Lin, Development of active packaging film made from poly (lactic acid)incorporated essential, journal home page.

# Annexes

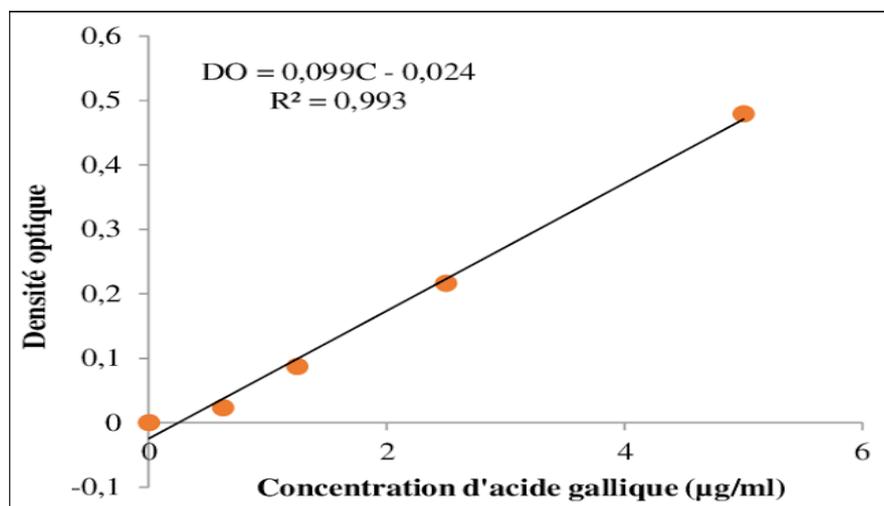
## Annexes

## Annexes

## Courbes d'étalonnage des composés phénoliques

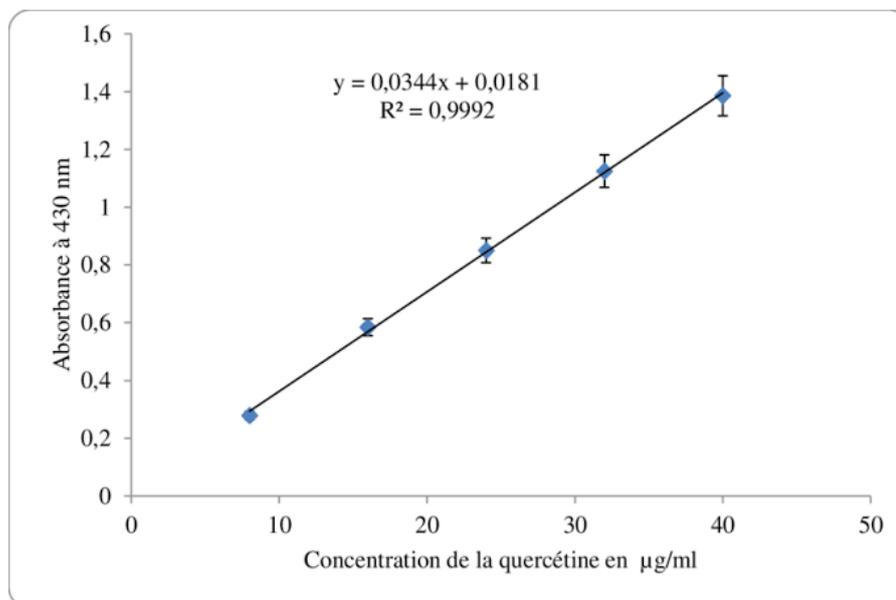
## Annexe I: courbe d'étalonnage

➤ Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



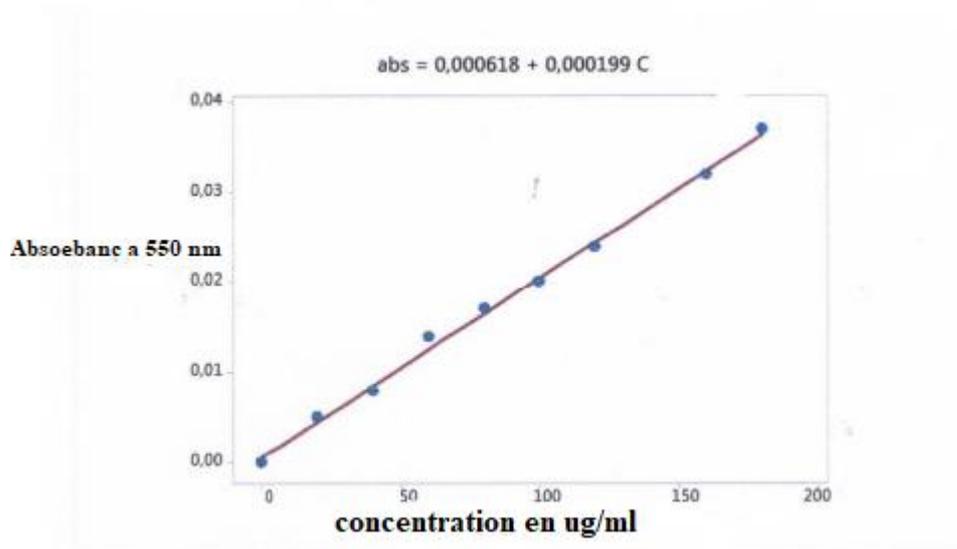
## Annexe II: courbe d'étalonnage

➤ Courbe d'étalonnage de la quercétine



*Annexe III: courbe d'étalonnage*

- Courbe d'étalonnage de la catéchine



## Résumé

L'objectif de ce travail est d'élaborer un matériau d'emballage alimentaire à base de PLA et d'extrait des feuilles d'olivier. On l'a utilisé comme un principe actif pour les films.

Les films de PLA / EFO ont été préparés par un mélange de PLA, chloroforme, et différentes concentrations de l'extrait éthanolique (3%,6%,9%). L'extrait est soumis à plusieurs analyses: caractérisation structurale par IR-TF, le dosage des polyphénols, flavonoïdes, tanins et DPPH. Pour les films; la spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (IRTF), le test d'absorption d'eau et test de la traction. Ces derniers ont été également testés pour leur effet antibactérien utilisant la méthode d'ensemencement en surface à l'égard de *staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *klebseillasp*. Et antifongique à l'égard de *penicillium sp*, *aspergillus niger*. Les résultats obtenus ont montrés que l'extrait éthanolique des feuilles d'olivier possède un effet antibactérien contre les souches testés par contre aucune activité antifongique. Les films élaborés n'ont aucun effet inhibiteur contre les souches testés.

Mot clés : PLA, films, extraction, *Olea europaea*, activité anti bactérienne.

## Abstract

The objective of this work is to develop a food packaging material based on PLA and olive leaf extract. It has been used as an active ingredient for films. The PLA / EFO films were prepared by a mixture of PLA, chloroform, and different concentrations of the ethanolic extract (3%, 6%, 9%). The extract is subjected to several analyses: structural characterization by IR- TF, dosage of polyphenols, flavonoids, tannins and DPPH. For movies; Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), water absorption test and tensile test. The latter were also tested for their antibacterial effect using the surface seeding method against *staphylococcus aureus*, clinical *staphylococcus*, *Bacillus subtilis*, *klebseillasp*. and antifungal against *penicillium sp*, *aspergillus niger*. The results obtained showed that the ethanolic extract of olive leaves has an antibacterial effect against the strains tested, but no antifungal activity. The films produced have no inhibitory effect against the strains tested.

Keywords: PLA, films, extraction, *Olea europaea*, antibacterial activity.