



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale.. **قسم : بيولوجيا الحيوان**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Toxicologie*

Intitulé :

Evaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits d'olives

Présenté et soutenu par :

Le : 27 /06/2018

HOUDJEDJE Djaber
MEHIMMEDETSI Chouaib

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr MENNAD Ahmed (Pr- UFM Constantine).

Rapporteur : Mme DEKDOUK Nadia (MCA- UAB Batna 2).

Examineurs : Mr BOULKENDOUL Ramzi (MCB- UFM Constantine).

Mme AMRANI Amel (MCA- UFM Constantine).

Année universitaire
2017- 2018

Remerciement

*Avant tout, Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre **Dieu** de nous avoir donné le courage la patience la volonté d'achever ce travail et nous mener vert le chemin du savoir.*

*Nous adressons nos premiers remerciements à notre encadreur Mdm **DEKDOUK Nadia** d'avoir accepté de diriger ce travail, qui nous a donné la chance d'accéder au centre de recherche C.R.Bt Constantine, pour ses conseils et ses remarques qui nous ont été d'une aide précieuse, et sa patience et surtout sa confiance, sans ses orientations et ses précieux conseils, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nos sincères remerciements s'adressent également à Mme **AMEDDAH Souad** notre professeur éminent à UFM Constantine, Chef de spécialité, cette force tranquille qui nous a guidée et encouragée durant notre parcours universitaire en Master.*

*A Ms le directeur **C.R.Bt** Constantine et toutes les équipes laborantins, qui nous a permis d'accéder au ses laboratoires spécialement «2,5,8,9,10,13,24 » et mis à nous disposition les produits et les matériels dont nous avons besoin, sans compter son aimable personnelles.*

Nous tenons à remercier également aux membres du jury :

***Mr. MENNAD Ahmed.** Notre professeur à UFM Constantine.1, en nous faisant l'honneur de présider le jury d'évaluation de ce mémoire.*

*Mr. BOULKENDOUL Ramzi. Notre enseignant aimable MCB- UFM
Constantine.*

Mme. AMRANI Amel. Notre enseignante gentil MCA- UFM Constantine.

*Nous vous remercions vivement de l'honneur que vous nous faites en
acceptant de juger ce travail. C'est pour nous un immense plaisir de vous voir
siéger parmi le jury de notre mémoire.*

*Nous tenons à remercier toutes les personnes qui nous ont soutenues pour la
réalisation de ce projet.*

*Nos remerciements vont également à tous les enseignants qui nous ont suivies
tout au long de notre formation au sein de l'université Frères Mentouri
surtout Mr LALAOUI Korichi et Mme ZAAMA Djamilia et Mme
BOUBEKRI Nassima et Mme TOUR Hanifa et Mr BENREBAI Mouad.
Enfin, nos remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de
près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

*Nous n'oublions pas de remercier vivement Ms Abdessamed Alae Ms Aidi
Bilal et Ms Bensouici Chawki et Ms Hamdi Mehdi et Ms kashi Imad et Ms
Homor Fares et Mlle Maghebonne Ibtissam et Mlle Yakhlef Assia Pour
leurs orientations et aide judicieux, Merci infiniment*

*Nous tiens à remercier nos familles pour leurs soutiens et leurs
encouragements.*

Merci a tout.

Didicace

Je dédie ce travail qui est le fruit des années d'études qui sont pleines de réussite, d'amour, de joie et de bonheur, A toute ma famille et à tous ceux que j'aime.

*Spécialement à ceux qui m'ont aidé dans toutes les phases de ma vie. Et qui s'est sacrifiée pour mon éducation et pour mon bien être ma chère mère **Fatiha**, Et mon cher père **Kacem** pour son soutien tout au long de mon parcours et son encouragement ; toutes les lettres ne seraient trouver les mots qu'il faut, et tous les mots ne seraient exprimer la gratitude.*

*À la joie et le bonheur de ma vie à ma chère **Sarah** et sa famille décente.*

Un grand merci également à ma grand-mère et grand-père qui seraient surement fière de moi.

*A tous mes chers frères « **Ali, Salah, Abdellah** » et sœurs « **Mariem, Housna, Amina** ».*

*A mon frère et mon binôme : **Chouaib Mehimmedetsi** qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et ces années universitaire.*

A tous mes amis proche et la promotion 2017-2018.

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

Que dieu les garde tous et les protège.

HOUDJEDJE Djaber

Dédicace

Mes très chers parents,

Mon cher père ABBOUD et ma chère mère ZOHRA, je tiens à vous remercier pour votre remise de diplômes, merci et reconnaissance pour votre soutien moral et matériel tout au long de mes études.

A mes chers frères et ma chère sœur et à toute la famille

A mes chers amis, Smail, Kador, Djaber.....

Chouaib

^ **ehp**Liste des abréviations

¹O₂	Oxygène singulet
³O₂	Oxygène triplet
4- HNE	4-hydroxynonenal
A Tn	Acide Tannic
A.Asc	Acide Ascorbique
ABS	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
AE	Extrait d'olive petite forme d'éthyle acétate
AE/AN	Extrait d'olive petite forme d'éthyle acétate fraction d'Acétonitrile
AGE	Glycation avancé
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdienne
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdienne
AP-1	Activateur protein-1
ATP	Adénosine Triphosphate
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHT	Hydroxytoluene butylé
BSA	Bovine serum albumin biochemical grade
C	Carbon
C.R.Bt	Centre de Recherche en Biotechnologie
°C	Degré celsius
CAT	Catalases
CI50	Concentration inhibitrice à 50%.
COX	Cyclo-oxygénase
COX 2	Cyclo-oxygénase type 2.
Cu	Cuivre

Cu / Zn-SOD	Superoxyde dismutase de cuivre et de zinc
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant capacity
Cys	Cystéine
DO	Densité optique
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EC50	Concentration effectrice à 50%
EM	Extrait méthanolique
EM/AN	Extrait d'olive petite forme méthanolique fraction d'Acétonitrile
ENA	Espèce Actif d'azote
EOA	Espèces réactives de l'oxygène
EtOH	Ethanol
EVOO	Huile d'olive extra vierge
FAD	Flavonyl
FCR	Folin-Ciocalteu réactif
Fe	Fer
FeCl3	Chlorure de fer
Fe-SOD	Superoxyde dismutase de fer
GC	Glucocorticoïdes
Gly	Glycine
GPX	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion réduit
GST	Glutathion S-transférase
H+	Proton
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HO	Hème oxygénase

HO• :	Radical hydroxyle
HOCL :	Hypochlorite
HSF-1 :	Facteur de choc thermique
HSP :	Protéine de choc thermique
I% :	Pourcentage d'inhibition
LDL :	Lipoprotéine de faible densité
M :	Métal
MAO :	Monoamine Oxydases
MCF-7 :	Adinocarcinome du sein humain
MDA :	Malonaldéhyde
MeOH :	Méthanol
Mn :	Manganèse
Mn-SOD :	Superoxyde dismutase de manganèse
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné
Nc :	Neocupronin
Ni-SOD :	Superoxyde dismutase de nickel
NO :	Nitrique oxyde
NO• :	Dioxyde d'azote
NOS :	Nitriques oxydes synthèses
NOX :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné oxydase
O2•- :	Radical superoxyde (anion superoxyde)
ONOO• :	Peroxynitrite
ONOOH :	Nitroperoxyde
PGE2 :	Prostaglandines E2
PGI2 :	Prostacycline
PH :	Potentiel d'Hydrogène

Pro	:	Protéine
R²	:	Corrélation
RO₂'	:	Radical peroxy
SD	:	Standard deviation.
Se	:	Sélénium
SH	:	Sulfhydryle
SOD	:	Super Oxyde Dismutase.
TBARS	:	Thiobarbituriques acides
TCA	:	Tri-chloro acetic acide
TRX	:	Thiorédoxine
UV	:	Ultra-violet
Vit	:	Vitamine
XDH	:	Xanthine déshydrogénase
XO	:	Xanthine oxydase
Zn	:	Zinc

Liste des figures

Figure 1 : Formation d'HO· Après la réaction de fenton et d'hyper-Weiss.....	4
Figure2 : La mitochondrie système producteur d'O ₂ ⁻	8
Figure 3 : Le métabolisme des purines par XO.....	9
Figure 4 : Les monoamines oxydases et la production de H ₂ O ₂	10
Figure 5 : Production d'oxydants par le phagocyte activé.....	11
Figure 6 : Formation les ROS par le rayonnement électromagnétique.....	11
Figure 7 : Peroxydation lipidique induite par le radical HO·	13
Figure 8 : Mécanisme de l'autoxydation des acides gras par l'oxygène triplet et l'oxygène singulet.....	14
Figure 9 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	15
Figure 10 : différent pathologie causée par les ROS.....	17
Figure 11 : Les formes différentes de SOD.....	19
Figure 12 : Cycle de recyclage du Glutathion.....	20
Figure 13 :L'implication du GST dans la réaction de S-glutathionylation.....	22
Figure14 :L'effet antioxydant des vitamines.....	24
Figure 15 : <i>Olea europaea</i> L.....	26
Figure 16 : Distribution géographique	28
Figure 17 : Coupe transversale de l'olive	28
Figure 18 : Structure chimique des flavonoïdes	30
Figure 19 :Mécanisme d'action antioxydante d'un cathecal	31
Figure 20 : Mécanisme d'action antioxydante d'aminophenol	31
Figure 21 : Mécanisme d'action antioxydante d'hydroquinone	32
Figure 22 : Mécanisme d'action antioxydante de 4-aminophenol	32
Figure 23 : Structure chimique de l'oleupeine et l'hydroxytyrosol... ..	34
Figure 24 : Fruits d' <i>Olea europaea</i> fraiche et lyophilisée	40
Figure 25 : Préparation d'extrait méthanolique (EM)	41
Figure 26 : Préparation d'extrait d'acétate éthyle (AE)	42
Figure 27 : Fractionnement des extraits EM/AN et AE/AN.....	43
Figure 28 : Réaction de DPPH.....	44

Figure 29 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de BHA, BHT et de la fraction acétonitril d'extrait d'éthyle acétate (AE/AN).....	50
Figure 30 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de BHA, BHT et de la fraction d'extrait méthanolique d'olives (EM/AE).....	50
Figure 31: IC50 des fractions acétonitril des extraits d'éthyle acétate (AE/AN) et méthanolique (EM/AE) d'olives, BHA et de BHT	51
Figure 32: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, Tanin et de la fraction acétonitrile d'extrait de l'éthyle acétate d'olives (AE/AN).....	52
Figure 33: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, Tanin et de la fraction acétonitrile d'extrait méthanolique d'olives (EM/AN).....	53
Figure 34: EC50 des fractions acétonitril des extraits d'éthyle acétate (AE/AN) et méthanolique (EM/AE) d'olives, Acide ascorbic (A Asc) et d'Acide tannic (A Tn).....	54
Figure 35: Réduction du CUPRAC par les fractions acétonitrile des extraits éthyle d'acétate et méthanolique d'olives, BHA et BHT	55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Relation entre les maladies et le stress oxydant.....	17
Tableau 2 : Structure et classe des composés phénoliques	30
Tableau 3 : Constituants du fruit d'olivier	34
Tableau 4 : Utilisation d' <i>Olea europaea</i> dans la médecine traditionnelle	35
Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA par les extraits....	56
Tableau 6 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA par le Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA par le Diclofenac sodium	56

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité les plantes et la phytothérapie ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire, cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive. L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations récoltées au cours du temps retrouvé les plantes qui soignent et finalement de guérir plusieurs maladies.

L'*Olea europaea* est l'une des plantes médicinales les plus utilisées en médecine traditionnelle. Cette plante est réservoir de composés naturels aux effets bénéfiques. Certains composés identifiés dans les extraits de ses fruits, tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes sont doués d'une activité antioxydante et anti-inflammatoire extrêmement importante.

Dans le Coran (souret « El Nour », la Lumière), Dieu évoque les bienfaits et les bénéfices de cet arbre : *« Allah est la lumière des cieux et de la terre. Sa lumière est semblable à une niche où se trouve une lampe. La lampe est dans un (récipient de) cristal et celui-ci ressemble à un astre de grand éclat ; son combustible vient d'un arbre béni : un olivier ni oriental, ni occidental dont l'huile semble éclairer sans même que le feu la touche. Lumière sur lumière. Allah guide vers sa lumière qui Il veut. Allah propose aux hommes des paraboles et Allah est Omniscient ».*

Au cours du temps, les radicaux libres, les espèces oxygénées activées (EOA), le stress oxydant et les antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. En 1991, **Sies** a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié, soit à une production excessive d'EOA, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante. Le tabagisme, une consommation excessive d'alcool, et l'inflammation chronique ...etc, autant de sources de production d'EOA. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante.

Si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses. Un stress oxydant «pathologique» est ainsi potentiellement impliqué dans de nombreuses affections (plus de 200 ont été recensées) ou dans le développement de complications associées à celles-ci (ex. diabète). A titre d'exemple,

l'oxydation des lipides est un facteur favorisant la survenue de maladies cardiovasculaires tandis que celle de l'ADN se retrouve dans diverses étapes qui conduisent au développement de cancers (**Defraigne et Pincemail, 2008**).

Ces dernières années, beaucoup de recherches se sont orientées vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté et l'efficacité des substances utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage (**Cheriti et al., 2016**). Afin que d'orienter la recherche vers les nouveaux agents thérapeutiques anti-inflammatoires qui présentent un minimum des effets indésirables, c'est la thérapie naturelle basée sur les métabolites secondaires (**Kpéra et al., 2004 ; Yougbaré-Ziébrou et al., 2016**), tels que les polyphénols et les flavonoïdes des fruits ,d'olive , fondée sur l'utilisation des drogues extraites essentiellement des plantes et des produits d'origine animal,

L'*Olea europaea* est caractérisée par leur richesse en principe actifs et en substances telles que les poly phénols et les flavonoïdes qui sont dotée des propriétés importantes et différentes. Les principales classes de phénols dans l'olive sont des acides phénoliques, des alcools phénoliques, des flavonoïdes et des secoiridoïdes (**Silva et al., 2006**). Acides phénoliques, alcools phénoliques et flavonoïdes se produisent dans de nombreux fruits et légumes appartenant à diverses familles botaniques, alors que secoiridoïdes sont exclusivement présent dans la famille Oleaceae. Acides phénoliques dans les olives comprennent gallique, p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, les acides syringique, caffeique, férulique, p-coumarique et sinapique (**Balasundram et al., 2006**) Tyrosol [(p-hydroxyphényl) éthanol] et hydroxytyrosol [(3,4-dihydroxyphényl) éthanol] sont les phénoliques les plus abondants alcools dans les fruits des olives (**Alagna et al ., 2012**). Les flavonoïdes comprennent le flavonol glycosides tels que la lutéoline-7-glucoside et la rutine ainsi que les anthocyanines, la cyanidine 3-O-glucoside et la cyanidine 3-orutinoside (**Vinha et al., 2005**). L'oleuropéine et le verbascoside sont les principaux secoiridoïdes présents dans les olives. L'intérêt croissant dans les polyphénols d'olive est due au fait qu'ils peuvent jouer un rôle important dans la santé humaine.

Notre travail s'effectué au sein du centre de recherche en biotechnologie (C.R.Bt) à Nouvelle Ville à Constantine - Algérie.

Notre intérêt s'est porté à L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits d'olives en réalisant :

- 1- L'extraction des extraits d'ethyl acetate et methanolique d'olives
- 2- L'étude de l'activité antioxydante *in vitro* via les tests de :
 - 2-1- L'effet scavenger du radical DPPH
 - 2-2- Le pouvoir réducteur
 - 2-3- L'effet inhibiteur de CUPRAC
 - 2-4- L'activité anti-inflammatoire *in vitro*

Partie I

Etude bibliographique

Chapitre 1 :
Stress oxydant et
Antioxydants

ZC /1. Stress oxydant et Antioxydants

1.1. Définition du stress oxydant

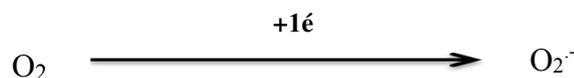
Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre les oxydants et les activités antioxydantes réduite d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (**Barouki, 2006**). L'augmentation des pro-oxydants et / ou la diminution des antioxydants déclenchent une cascade de réactions oxydatives peut entraîner des destructions tissulaires et provoquer des lésions au niveau des structures cellulaires (**Iuchi, 2012 ; Pincemail *et al.*, 2014**).

1.2. Les espèces réactives d'oxygène(EAO)

1.2.1. Les dérivés d'oxygène radicalaire

➤ Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est un radical libre négatif de charge, c'est une forme ionisée d'une molécule de dioxygène formée par une capture d'électrons, ayant des moitiés relativement longues (supérieures à quelques dizaines de secondes) avec une faible réactivité avec les composés organiques (**Favier, 2003 ; Scheibmeir *et al.*, 2005**).



➤ Radical hydroxyle (HO^{\cdot})

Le radical hydroxyle est le type le plus instable et le plus interactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. Il est le plus toxique pendant le stress oxydatif car sa demi-vie est limitée (10 à 10 secondes dans les systèmes biologiques). La propagation limitée de cette radical lui permet d'interagir avec de nombreuses espèces moléculaires dans le voisinage (protéines, graisses, ADN ...) causant des dommages cellulaires multiples (**Kohen et Nyska, 2002 ; Favier, 2003**).

Le radical hydroxyle est produite intracellulaire, soit après une réaction d'hyper-Weiss, soit après une réaction de fenton, qui nécessite des catalyseurs métalliques (Figure 1) (**Kohen et Nyska, 2002**).

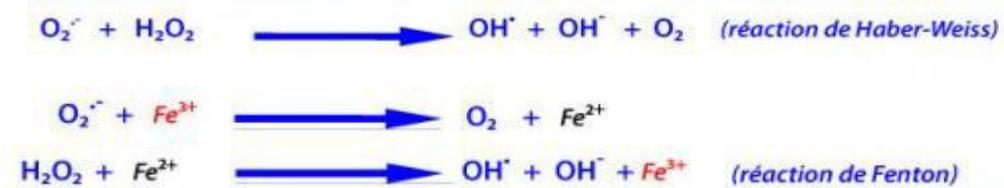


Figure 1 : Formation d'HO· Après la réaction de fenton et d'hyper-Weiss (Kohen et Nyska ,2002)

1.2.2. Les dérivés d'oxygène non radicalaire

➤ Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

C'est la forme « excitée » de l'oxygène moléculaire qui est très instable et extrêmement réactif, a une durée de vie très limitée. Au contact des molécules de son environnement, notamment les molécules d'eau, il se désactive en libérant de l'énergie (Cillard et Cillard, 2006).

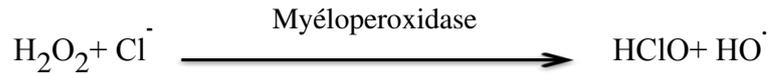
➤ Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Également appelée dioxyde de dihydrogène ou « eau oxygénée » est très soluble dans l'eau, n'est pas un radical libre au sens propre mais sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. En effet, en faible concentration, il ne présente pas de toxicité pour la cellule. Cependant, en forte concentration, il induit une cytotoxicité par le biais des dérivés radicalaire qu'il génère, il devient toxique (Kohen et Nyska ,2002).

➤ Hypochlorite (HOCl) et inflammation

Au cours de l'inflammation, un ensemble des oxydants sera produits. L'activation des cellules phagocytaires à la fois *in vivo*, entraîne la libération de l'enzyme hème myéloperoxydase, Cette enzyme catalyse la réaction de H_2O_2 avec des concentrations physiologiques de Cl^- pour donner l'oxydant puissant hypochlorite (HOCl) (Park *et al.*, 2008).

Cependant, une production excessive ou mal placée de HOCl peut causer des dommages tissulaires et ce processus est considéré comme important dans la progression d'un certain nombre de maladies incluant l'athérosclérose, l'inflammation chronique et certains cancers (Hawkins *et al.*, 2003).



1.2.3. Les espèces réactives d'azote

➤ Nitric oxyde (NO[•])

Le radical oxyde nitrique (NO[•]) ou monoxyde d'azote est produit par diverses cellules à partir de l'arginine et de l'oxygène dans une réaction catalysée par des NO synthases constitutives et induites. Le radical NO[•] représente la principale espèce radicalaire contenant un atome d'azote qui dans les conditions aérobies est capable de réagir avec l'oxygène moléculaire pour donner naissance au radical dioxyde d'azote (NO₂[•]) (Astier *et al.*, 2017).



➤ b. Peroxynitrite (ONOO⁻)

C'est un radical très actif formé suite à la réaction d'O₂⁻ avec le monoxyde d'azote radicalaire NO[•] (Pacher *et al.*, 2007).



Bien que le peroxynitrite soit un oxydant puissant, l'anion (ONOO⁻) réagit également directement avec les nucléophiles, molécules à charge positive partielle (Pacher *et al.*, 2007).



1.2.4. Autres formes radicalaires

D'autres formes radicalaires peuvent être retrouvées dans les milieux biologiques. Il s'agit en particulier des radicaux alkyle (R[•]), alkoxy (RO[•]) et alkyl peroxy (ROO[•]),

généérés à la suite de l'action oxydante de radicaux libres oxygénés (superoxyde, hydroxyle) sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés, les glucides, les protéines ou les acides nucléiques. Ces radicaux « secondaires » sont moins réactifs mais plus sélectifs que les radicaux primaires. Ils sont à l'origine de processus de réactions radicalaires en chaîne, et en particulier des réactions participant à la lipoperoxydation des membranes cellulaires (**Vergely et Rochette, 2003**).

1.3. Les sources des radicaux libres

1.3.1. La chaîne respiratoire de mitochondries

La production d'ATP par la phosphorylation oxydative mitochondriale est basée sur la réduction de l'oxygène moléculaire, qui peut produire des sous-produits toxiques tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Seul le complexe IV (cytochrome c oxydase) de chaîne respiratoire est capable de réduire complètement l'oxygène moléculaire en eau et a donc une fonction antioxydante dans la chaîne respiratoire, tandis que le complexe I (NADH ubiquinone oxydoréductase) et le complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase) contribuent à la formation de radicaux superoxydes due à une réduction incomplète de l' O_2 (**Pascual-Ahuir et al., 2017**).

L' $O_2^{\cdot-}$ est produite à la fois dans la matrice et dans l'espace inter membranaire (Figure2) (**Russell et Cotter, 2015**).

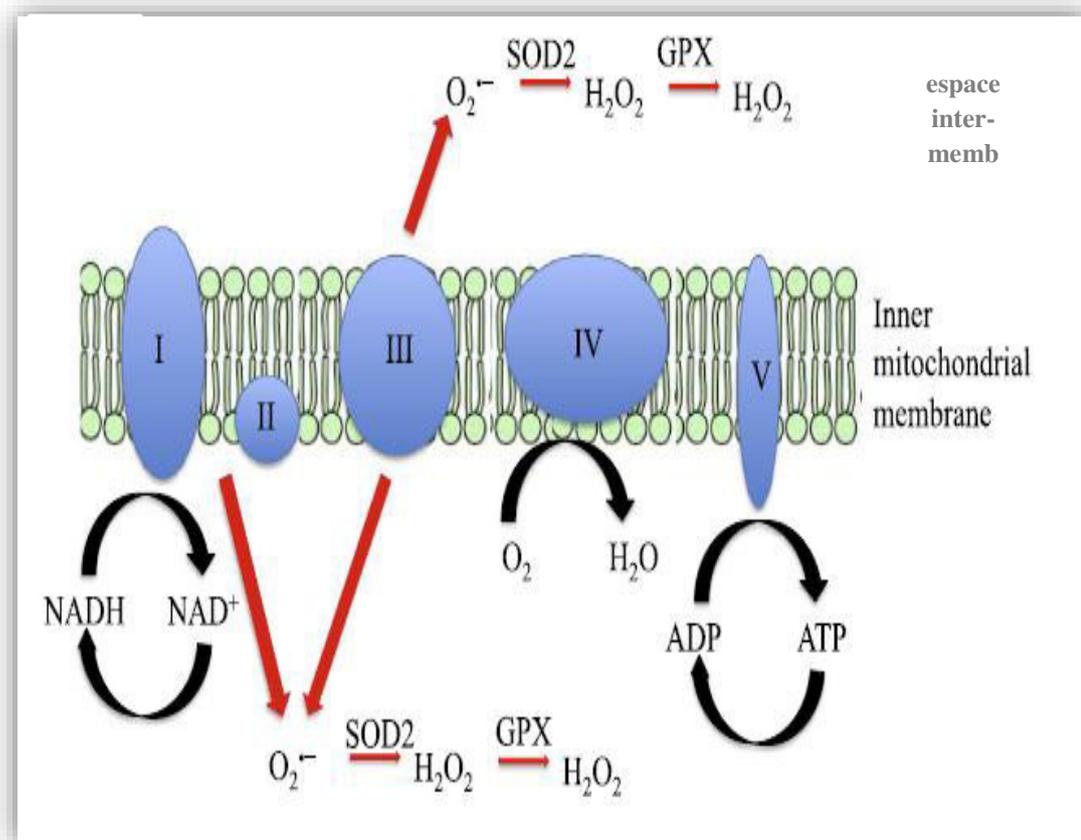


Figure2 : La mitochondrie système producteur d'O₂⁻ (Russell et Cotter, 2015)

1.3.2. Les Oxydases

➤ Les NADPH oxydases (NOX)

La NOX a été initialement étudiée dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes, mais elle existe également dans toutes les autres cellules non phagocytaires où elle participe à la signalisation cellulaire.

La NOX est localisée dans la membrane cytoplasmique et dans certains granules spécifiques des neutrophiles substrats (Briones et Touyz, 2010 ; Migdal et Serres, 2011).

➤ La Xanthine oxydase (XO)

La xanthine oxydase, qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines, oxydase joue un rôle important dans la production des ROS, particulièrement O₂⁻ et H₂O₂ (Figure 3) (Sachdev et Davies, 2008).

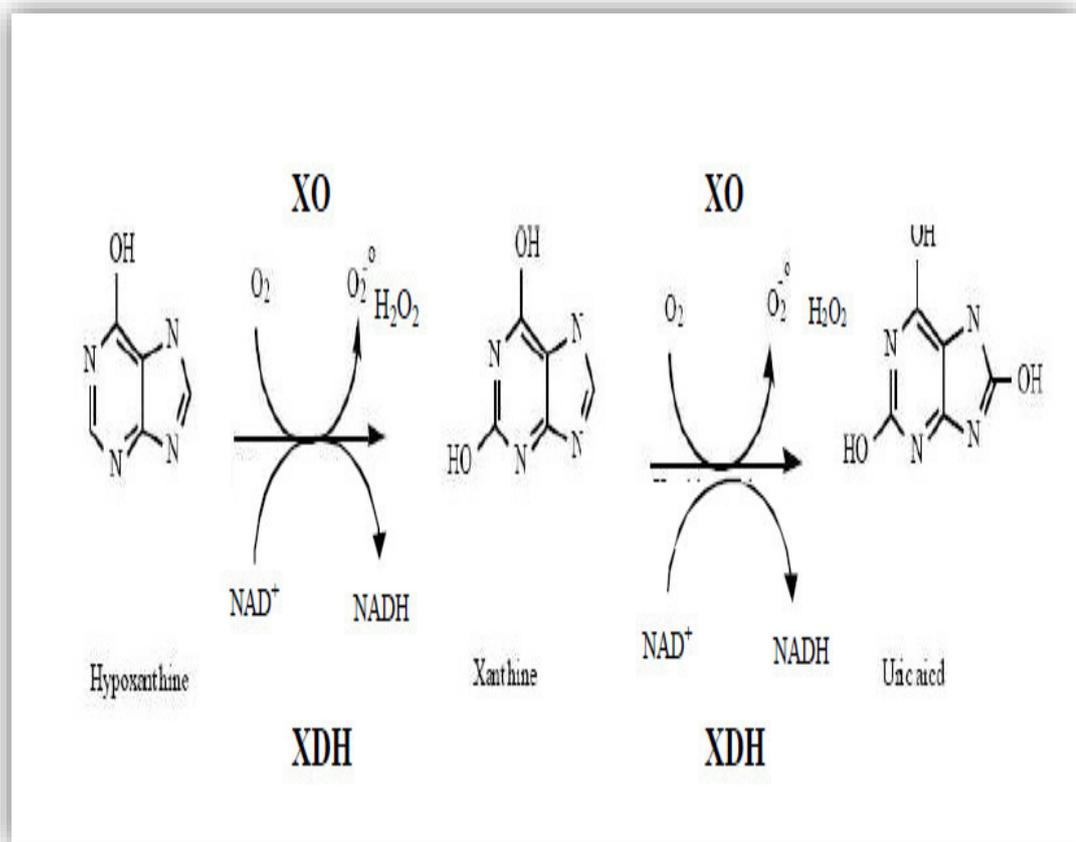


Figure 3 : Le métabolisme des purines par XO (Sachdev et Davies, 2008)

➤ **Les enzymes monoamine oxydases (MAO)**

Au niveau mitochondrial, il existe une classe d'enzymes appelées monoamine oxydases, qui résident dans la membrane mitochondriale externe. Les monoamines oxydases A et B (MAO-A et MAO-B) sont des enzymes d'une importance primordiale dans la régulation des catécholamines et d'autres amines biogènes chez les mammifères (Damien *et al.*, 2017).

Les MAO utilisent un cofacteur FAD pour catalyser la désamination oxydative de plusieurs monoamines, incluant non seulement les neurotransmetteurs, mais aussi les amines exogènes ingérées avec des régimes normaux (tyramine), produisant H_2O_2 et les aldéhydes correspondants comme sous-produits (Damien *et al.*, 2017).

La MAO-A métabolisant plutôt la sérotonine alors que la MAO-B a une préférence pour la phényl éthylamine, tandis que les catécholamines peuvent être oxydées par les deux iso formes (Figure 4) (Damien *et al.*, 2017).

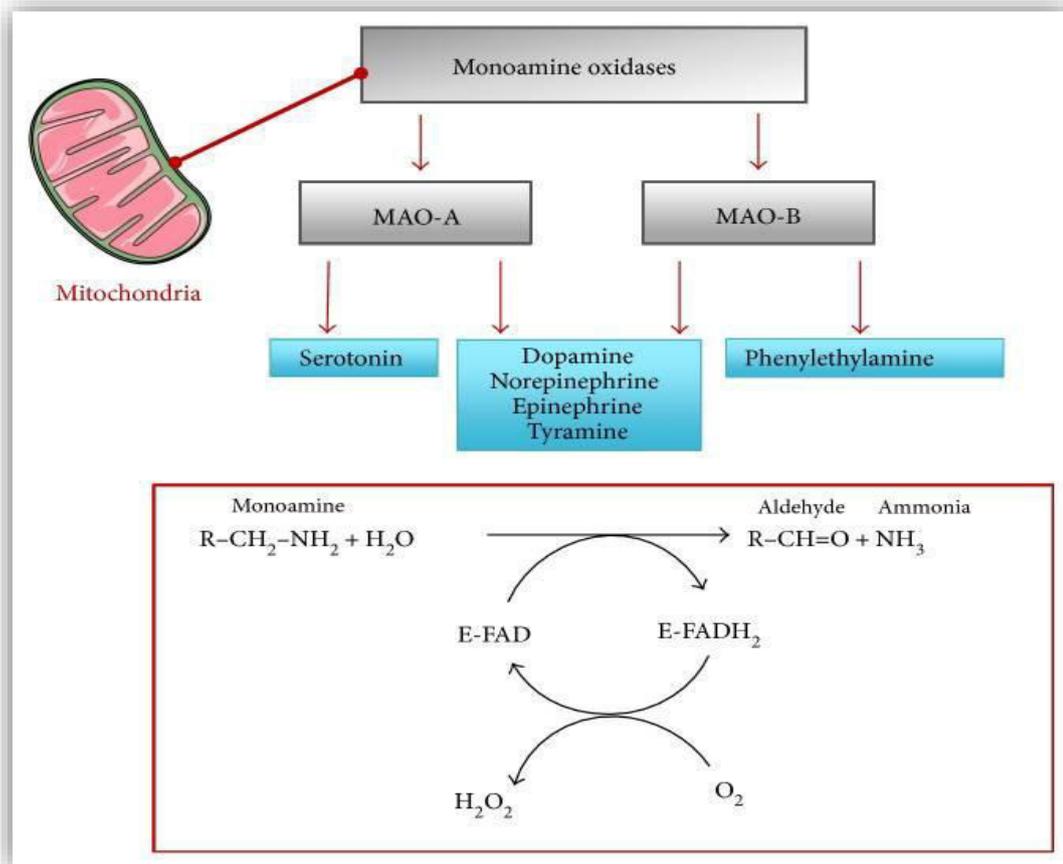


Figure 4 : Les monoamines oxydases et la production de H₂O₂ (Damien *et al.*, 2017)

1.3.3. L'inflammation

Au cours de l'inflammation, un ensemble des oxydants et des radicaux libres sera produits (Figure 5) (Morena *et al.*, 2002).

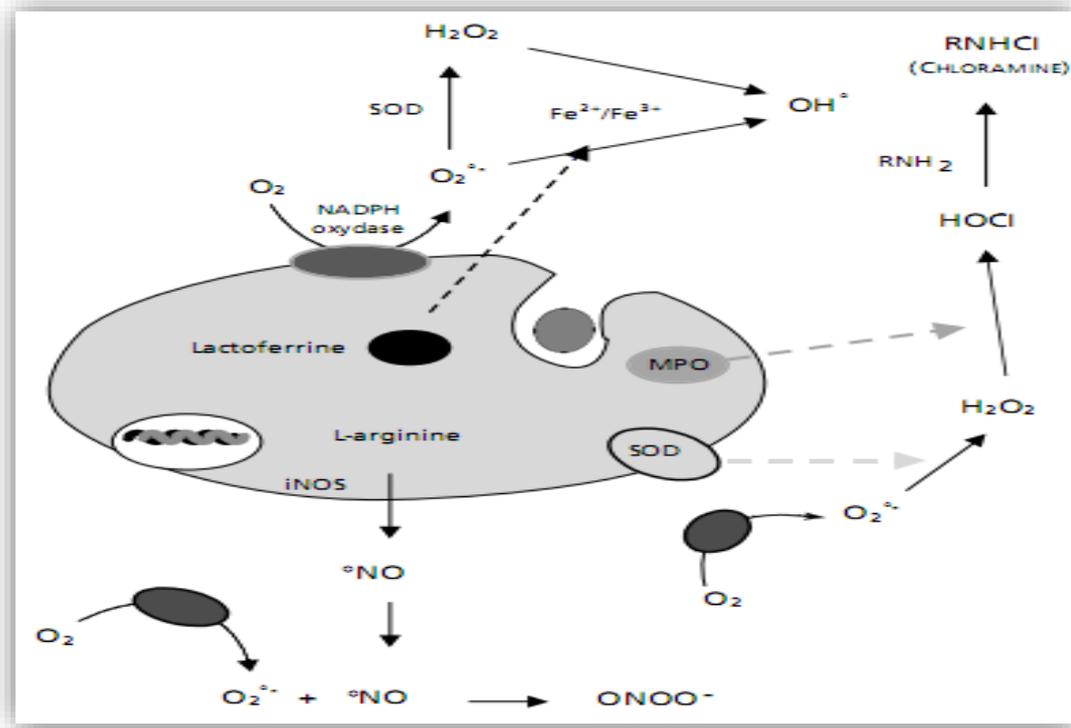


Figure 5 : Production d'oxydants par le phagocyte activé (Morena *et al.*, 2002)

1.3.4. Pro-oxydants environnementaux:

Les pro-oxydants environnementaux tels que les pesticides, les métaux lourds, la fumée de cigarettes, les polluants, la poussière (d'amiante, de silice), et les composés induits par la prise de certains médicaments, par le rayonnement électromagnétique (radiation ionisante, lumière ultraviolette), ou lors d'un coup de chaleur (Figure 6) (Bennamara, 2017).

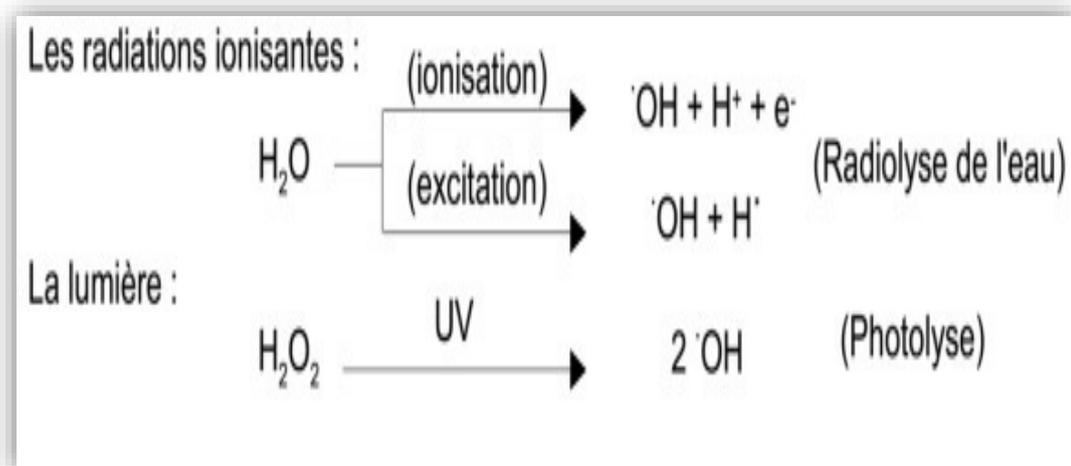


Figure 6 : Formation les ROS par le rayonnement électromagnétique (Bennamara, 2017)

1.4. Rôle physiologique des espèces réactives :

La production des EOA et des ENA est permanente et physiologique, elle n'est pas limitée aux conditions pathologiques, car ces espèces réactives participent à de nombreuses fonctions biologiques (**Koechlin, 2006**).

Ces espèces réactives ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO^{\cdot} , $ONOO^-$, $HOCl$) participent aussi à la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'immunité et la défense contre les micro-organismes (**Favier, 2003; Christian et Kunal, 2009**), et la régulation de nombreux facteurs de transcription tels que l'AP-1 (Activateur protéin-1) et le HSF-1 (Facteur de choc thermique-1) qui active des gènes dits protecteurs pour la cellule. Ces gènes régulent l'expression de molécules de défense telles que les antioxydants ou les HSP (protéine de choc thermique) qui contribuent aux processus de réparation et de régénération cellulaire. Les EOA participeraient également à l'amélioration du captage musculaire du glucose et à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire (**Koechlin, 2006**).

1.5. Principales cibles biologique de stress oxydant

➤ Les lipides

L'initiation de la peroxydation lipidique est due à l'attaque des acides gras par les EOA, c'est une réaction en chaîne qui est un exemple d'oxydation très dangereux pour les cellules provoqué par les dérivés de l'oxygène, en particulier les radicaux hydroxyles ($\cdot OH$) ou peroxydes (ROO^{\cdot}), capables d'arracher un atome d'hydrogène d'un groupe méthylène (CH_2), laissant un électron non apparié sur l'atome de carbone (**Therond, 2006**) (Figure 7).

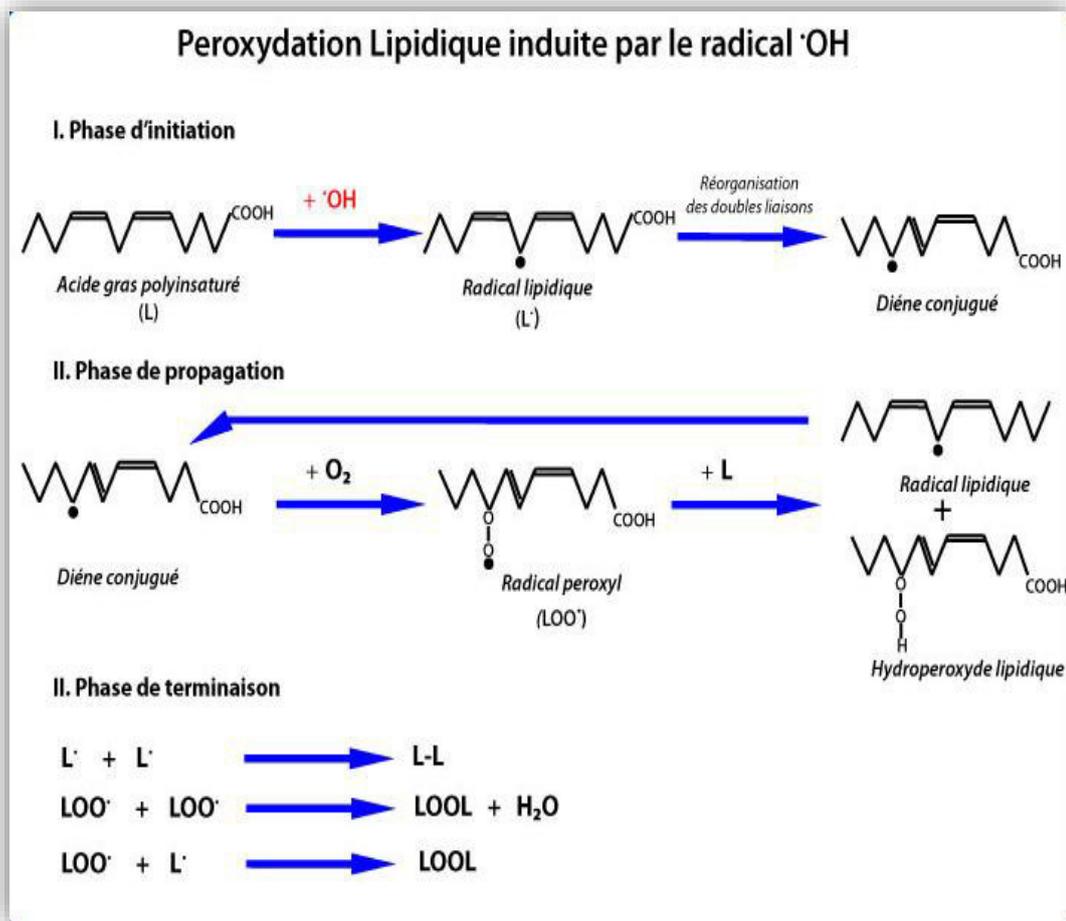


Figure 7 : Peroxydation lipidique induite par le radical HO \cdot (Favier, 2003)

L'autoxydation est une réaction directe de l'oxygène moléculaire avec des composés organiques. Dans le cas des acides gras insaturés, l'oxygène se fixe sur les doubles liaisons pour donner des hydroperoxydes. L'oxygène peut exister sous une forme beaucoup plus réactive correspondant à un état excité appelée oxygène singulet, et L'oxydation indirecte des acides gras insaturés par $^3\text{O}_2$ (Figure 8) (Cillard et Cillard, 2006).

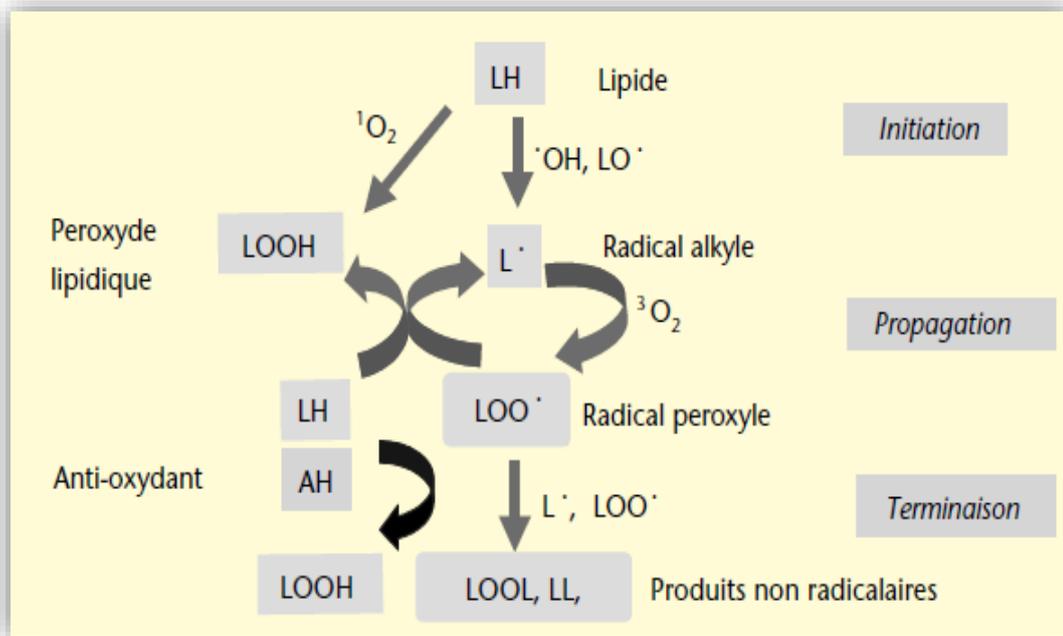


Figure 8 : Mécanisme de l'autoxydation des acides gras par l'oxygène triplet et l'oxygène singulet (Cillard et Cillard, 2006)

Elle a des conséquences multiples : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation des lipoprotéines de densité légère (LDL) oxydées qui captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, et en induisant une diminution de la fluidité des membranes plasmiques et une augmentation de la charge négative de surface, et en perturbant les membranes des organites cellulaires (Favier, 2003).

Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique, et le malondialdéhyde (MDA) est un bon marqueur de la peroxydation lipidique (Blandine, 2006 ; Michel *et al.*, 2008).

➤ L'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH^\cdot peuvent être générées : les bases oxydées (particulièrement la guanine), les sites abasiques (peut aussi attaquer la liaison

entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même), les adduits intra-caténares, les cassures de brins et les pontages ADN-protéines formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine (Cadet *et al.*, 2003).

Les dommages oxydant continus l'ADN peuvent mener aux changements des cascades de signalisation ou de l'expression des gènes, à l'induction ou arrêt de la transcription, aux erreurs de réplication et à l'instabilité génomique (Favier, 2003).

➤ **Les protéines :**

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (-SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire (Noori, 2012) (Figure 9).

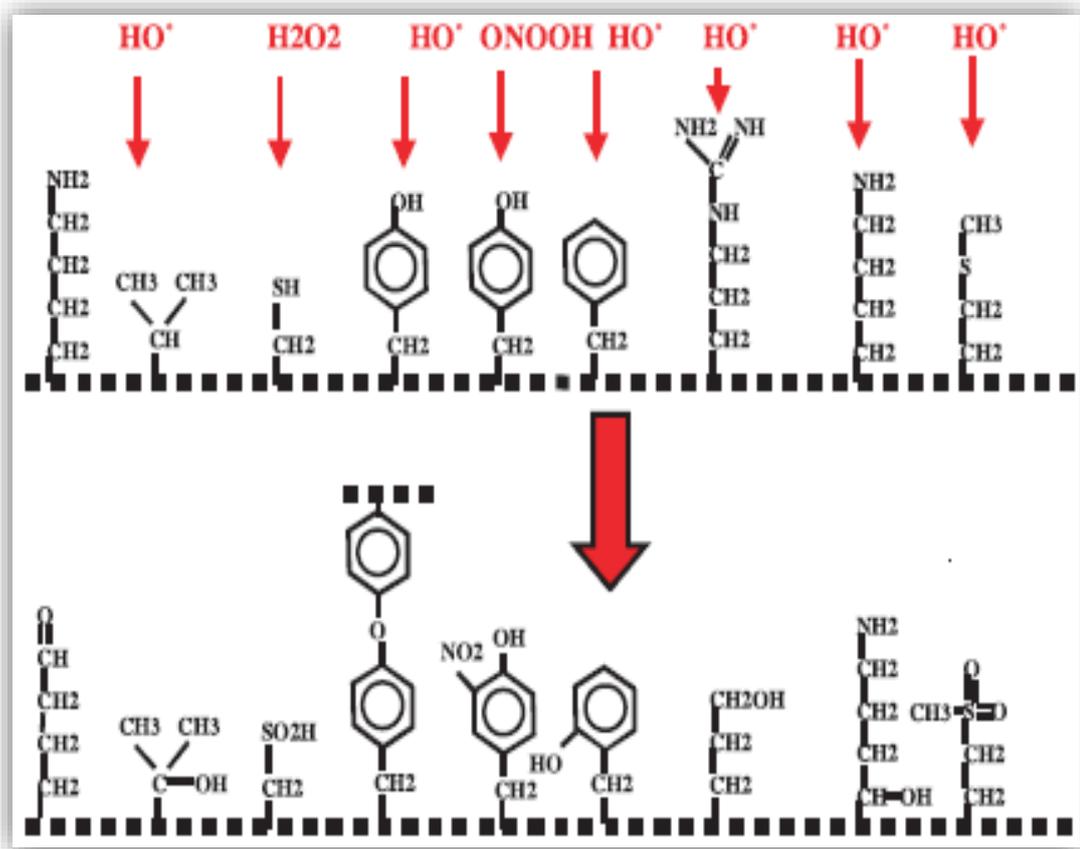


Figure 9 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003)

➤ **Les Glucides :**

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les EOA attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et HO^\cdot , qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant des produits de glycation avancée (ou AGE pour advanced glycation end products). Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

1.6. Rôle pathologique du stress oxydant

Le stress oxydant engendre des perturbations biologiques, la baisse de la fluidité des membranes, les anomalies de récepteurs, la diminution de la sensibilité à l'insuline, la perturbation de l'immunité cellulaire, la fibrose, les dépôts de lipides, l'affaiblissement musculaire, la mort neuronale ou apparition de mutations (Favier, 2006).

De nombreuses anomalies pathologiques sont également induites par le stress oxydant : mutations, carcinogenèse, malformations des fœtus, dépôts de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôts de lipides oxydés, immunosuppression. Ces conséquences donnée certain pathologies (Favier, 2006) (Figures 10).

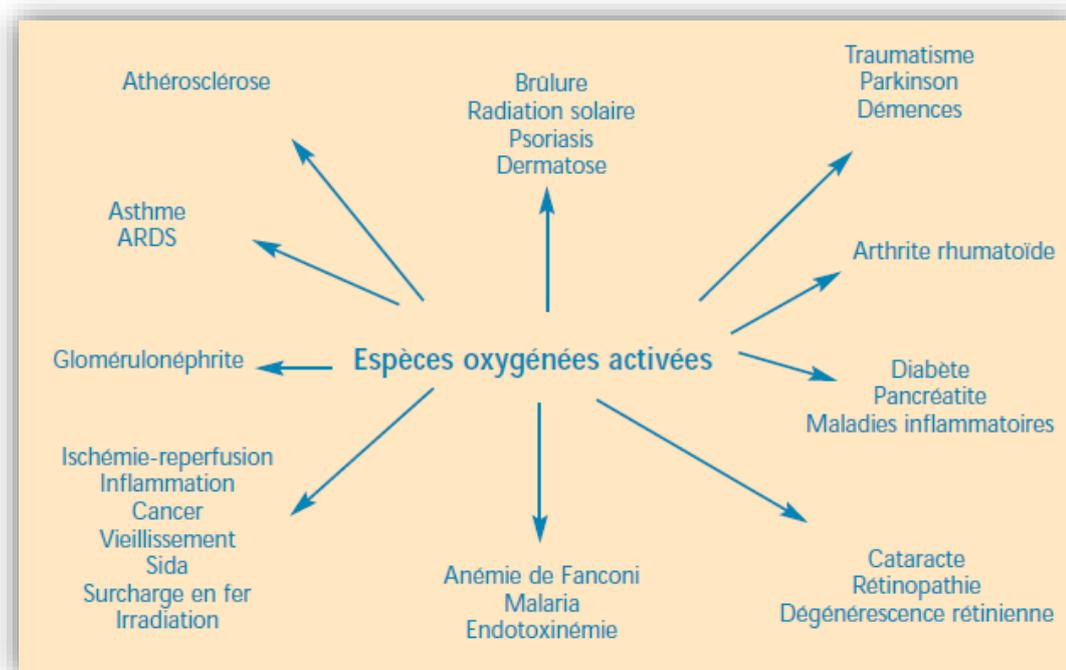


Figure 10 : différentes pathologies causées par les EOA (Pincemail *et al.*, 2001)

On distingue deux types de maladies où le stress oxydant soit la cause primordiale ou fait partie des facteurs déclencheurs (Tableau 1) (Favier, 2006).

Tableau 1: Relation entre les maladies et le stress oxydant (Favier, 2006)

Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres	Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale	Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs	Maladies entraînant un stress oxydant secondaire
<ul style="list-style-type: none"> • Agranulomatose septique • Psoriasis 	<ul style="list-style-type: none"> • Cancers • Autoimmunité • Cataracte • Dégénérescence maculaire • Sclérose latérale amyotrophique • Photo-veillesse cutané • Photosensibilisation • Irradiation • Intoxications : CCl₄, Cd, Fe, alcool, • Hémochromatose 	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie d'Alzheimer • Stérilités masculines • Maladies virales : EBV, HVB • Rhumatismes • Athérome • Asthme • Insuffisance respiratoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Diabète • Insuffisance rénale • Mucoviscidose • Sida • Choc septique • Infarctus du myocarde • Ischémies/reperfusion • Parkinson • Brûlures • Thalassémie • Greffes d'organes <p>Traitements :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anticancéreux • PUVA thérapie • Oxygène hyperbare

1.7. Les antioxydants

1.7.1. Les systèmes enzymatiques antioxydants

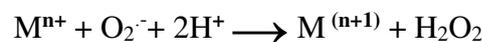
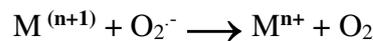
Les antioxydants enzymatiques le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les EAO (Scheibmeir *et al.*, 2005).

a. Superoxyde dismutase (SOD)

Généralement, l'enzyme SOD convertit deux molécules d'anions superoxyde (O_2^-) en hydrogène peroxyde (H_2O_2) et une molécule d'oxygène (O_2).



Au cours de la catalyse, le cofacteur de métal (M) redox-actif passe entre des états oxydés et réduits qui diffèrent d'un électron



Des formes différentes de SOD sont trouvées et sont distinguées sur la base des cofacteurs métalliques présents sur le site actif de l'enzyme. SOD de cuivre et de zinc (Cu / Zn-SOD), SOD de nickel (Ni-SOD), SOD de manganèse (Mn-SOD) et de fer SOD (Fe-SOD).

Les Cu-Zn SOD sont situés dans la matrice extracellulaire (SOD3) et le cytosol(SOD1) des eucaryotes. Mn-SOD demeure dans les bactéries et tous les eucaryotes, chez les eucaryotes, Mn-SOD (SOD3) est dans la matrice mitochondriale, et Fe-SOD et Ni-SOD sont procaryotes (Daniel *et al.*, 2017 ; Rajesh et Sanniyasi, 2017; Jahaun et Gloria, 2018) (Figures 11).

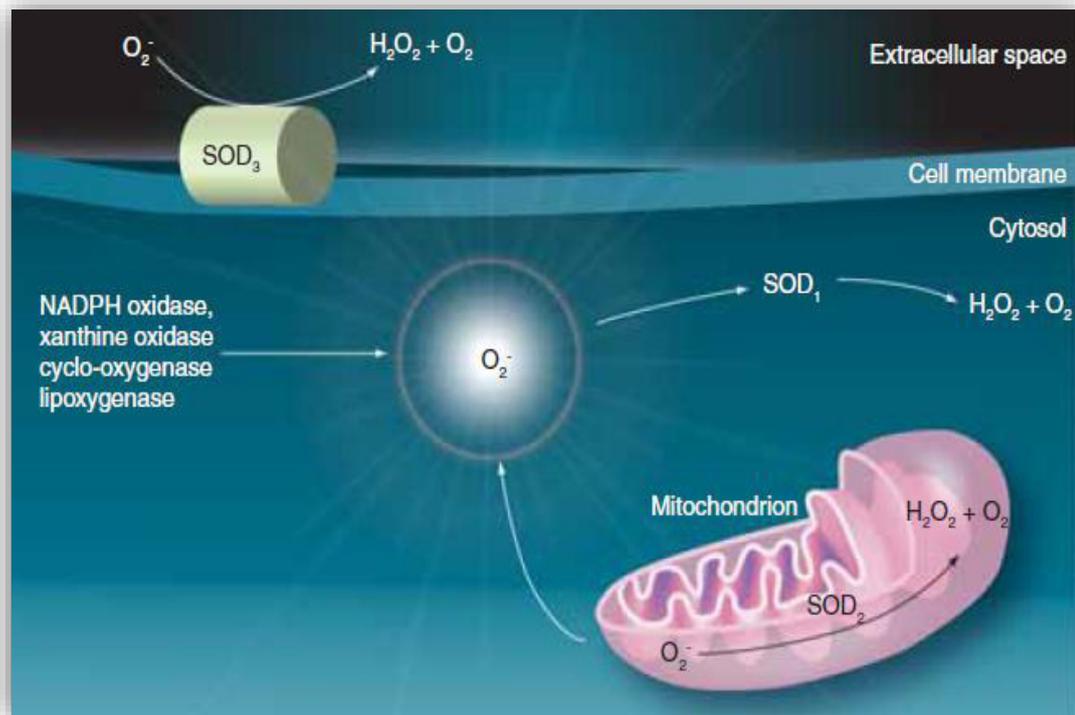


Figure 11 : Les formes différentes de SOD (Lomri, 2008)

b. Les catalases (CAT)

La catalase (CAT) est une protéine tétramérique de quatre sous-unités similaires. CAT est un commun enzyme antioxydant présente presque dans tous les tissus vivants qui utilisent l'oxygène. L'enzyme utilise du fer ou du manganèse comme cofacteur et catalyse la dégradation ou la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'eau et à l'oxygène moléculaire (Ighodaro et Akinloye, 2017).

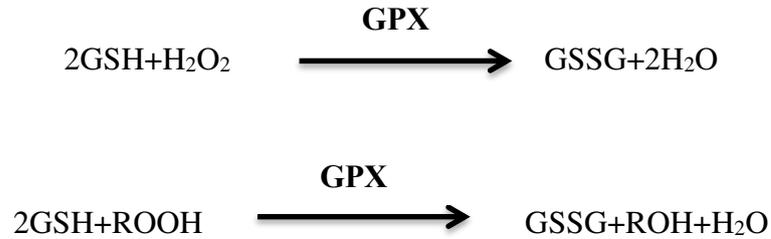


c. Le cycle d'oxydoréduction du glutathion :

Le cycle d'oxydoréduction du glutathion fait intervenir deux enzymes essentielles:

La glutathion peroxydase (GPx) qui active la réaction de transformation des hydroperoxydes en eau et en alcools primaires, et elle est la seule séléno-enzyme dans les cellules des

mammifères, sa molécule contient quatre atomes de sélénium dans le centre actif sous forme de séléno-cystéine. Elle catalyse les réactions de réduction des peroxydes organiques et inorganiques, en utilisant le glutathion réduit comme donneur de protons, ce qui provoque l'oxydation de glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et la production d'alcool primaire non toxique (**Ighodaro et Akinloye, 2017**). (Figure12).



La glutathion réductase (GR) qui est une enzyme flavoprotéique cytosolique, transforme le glutathion oxydé (GSSG) en sa forme réduite (GSH) en présence du coenzyme NADPH + H⁺.

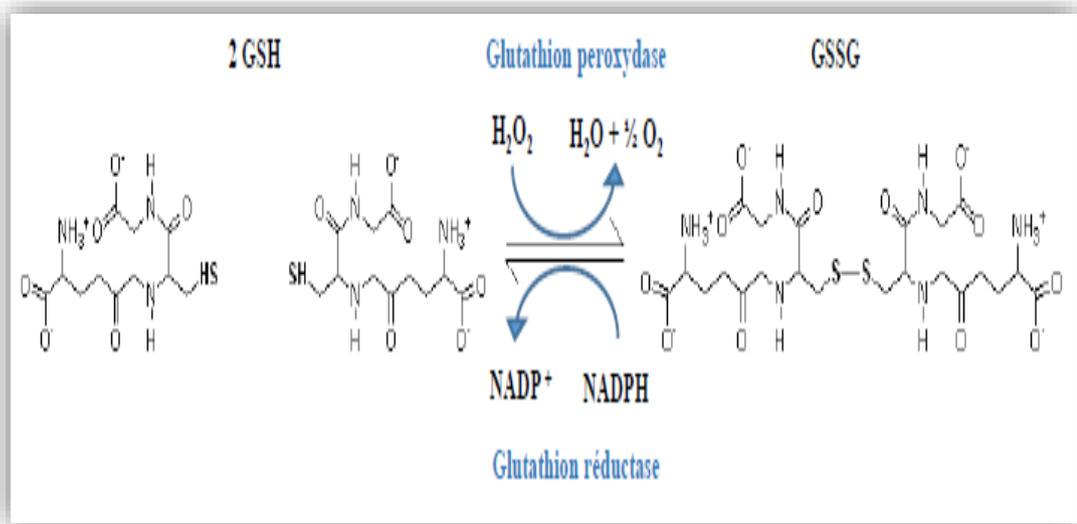


Figure 12 : Cycle de recyclage du Glutathion (**Bennamara, 2017**)

Il y a deux formes de GPx, Sélénium- indépendantes et Sélénium-dépendante, et il y a au moins huit GPx enzymes chez l'homme (GPx1-GPx8), GPx1 est la sélénoperoxydase la plus abondante et est présent pratiquement dans toutes les cellules,

La fonction importante de cette enzyme contre le stress oxydatif est de protéger la cellule vivante de l'accumulation du glutathion oxydé, des protéines-SSG et d'autres composés disulfures (**Grek *et al.*, 2013 ; Ighodaro et Akinloye, 2017**).

d. L'hème oxygénase :

L'hème oxygénase est l'enzyme limitant de la dégradation de l'hème constituant central de molécules d'importance comme l'hémoglobine, la myoglobine, mais aussi les cytochromes, la catalase ou la NO synthase (**Taillé *et al.*, 2002 ; Jiawen *et al.*, 2012; Hun-Taeg *et al.*, 2013**).

e. La biliverdine réductase :

La dégradation d'une molécule d'hème libère de la biliverdine, réduite en bilirubine sous l'action de la biliverdine réductase.

La bilirubine est l'un des plus puissants antioxydants de l'organisme par son pouvoir chélateur de radicaux libres de l'oxygène (**Jiawen *et al.*, 2012**).

1.7.2. Les systèmes non enzymatiques antioxydants

1.7.2.1. Les antioxydants endogènes

➤ **Le glutathion (GSH)**

Le glutathion est un tripeptide, et il est abondant dans le cytosol, les noyaux et les mitochondries, c'est le majeur antioxydant soluble dans ces compartiments cellulaires. Les principaux rôles protecteurs du glutathion contre le stress oxydatif sont qu'il peut agir comme un cofacteur pour plusieurs enzymes détoxifiantes, participer au transport des acides aminés à travers la membrane plasmique, et régénérer les vitamines C et E formes actives.

Et joue un rôle important dans la détoxification des composés toxiques électrophiliques et les xénobiotiques par des réactions de conjugaison catalysées par la glutathion S-transférase avec la formation d'acides mercapturiques (**Rahman, 2007 ; Saka *et al.*, 2011**) (Figures 13).

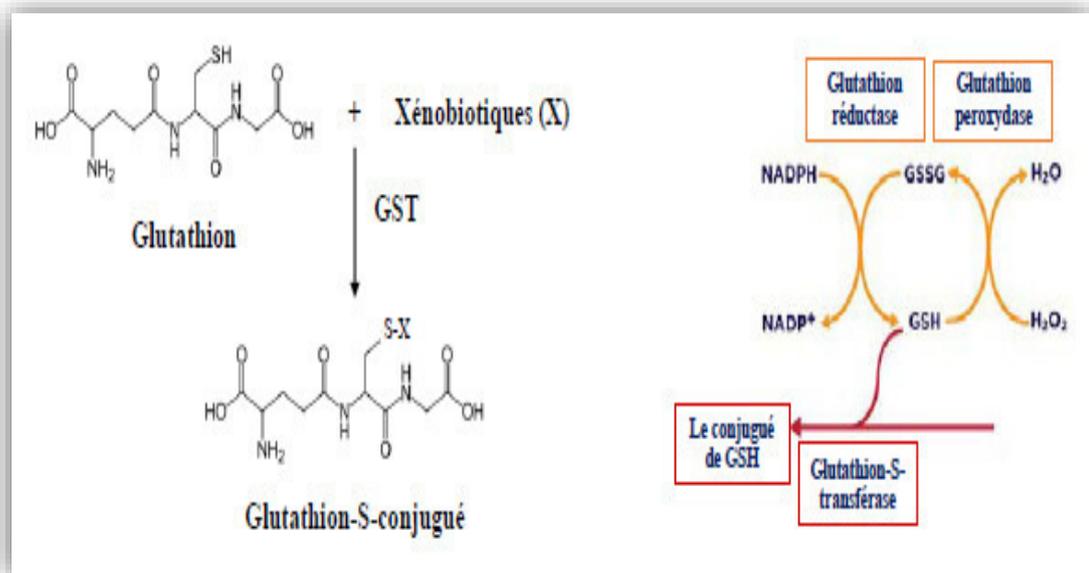


Figure 13 :L'implication du GST dans la réaction de S-glutathionylation (**Bennamara, 2017**)

➤ **L'acide urique**

L'acide urique est des métabolites ayant des propriétés antioxydantes élevées est présent en forte concentration dans le sang humain et fournit environ la moitié de la capacité antioxydante totale du sérum humain. L'acide urique est un métabolite de la purine, produit à partir de la xanthine par l'enzyme xanthine oxydase. On considère que l'acide urique est un mécanisme de défense contre le stress oxydatif (**Aprioku, 2013**).

➤ **Acide lipoïque**

Composé appartenant aux thiols, ses deux formes oxydée et réduite présentent des propriétés antioxydantes in vitro en piégeant les HO^\bullet , RO_2^\bullet , $\text{l}'\text{HOCl}$ et $\text{l}'\text{}^1\text{O}_2$. En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de les désactiver d'un point de vue catalytique, et a la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes (**Descamps et al., 2006**).

➤ **le thiorédoxine (TRX)**

Le système de thiorédoxine (TRX) est un autre antioxydant thiol, ce sont des protéines ayant une activité oxydoréductase et sont omniprésentes dans les cellules mammaliennes et procaryotes. Il contient également un disulfure et possède deux cystéines redox-actives dans un site actif conservé (Cys-Gly-Pro-Cys).

La thiorédoxine contient deux groupes -SH adjacents sous sa forme réduite qui sont convertis en unité disulfure dans le TRX oxydé quand il subit des réactions redox avec plusieurs protéines.

Les taux de thiorédoxine sont beaucoup plus faibles que ceux du GSH, mais TRX et GSH peuvent avoir des fonctions qui se chevauchent et des fonctions compartimentées dans l'activation et la régulation des facteurs de transcription (**Rahman, 2007**).

1.7.2.2. Les antioxydants exogènes

1.7.2.2.1. Les antioxydants naturels

➤ Les vitamines C et E

La vitamine C ou ascorbate est un piègeur d'EAO à spectre large, efficace contre les radicaux peroxydes, hydroxyle et superoxyde ainsi que contre le peroxynitrite. Bien que l'ascorbate soit hydrosoluble, il est capable de régénérer la vitamine E, ce qui permet de déplacer les EAO de la membrane vers le cytosol et de prévenir la peroxydation lipidique. Les formes oxydées de l'ascorbate, le semidéhydroascorbate et le déhydroascorbate, peuvent être régénérées par le GSH ou par d'autres thiols intracellulaires. L'ascorbate est également capable de réduire les métaux de transition et donc d'avoir des effets prooxydants, notamment en favorisant la réaction de Fenton (**Nafia et al., 2005**).

La vitamine E (α -tocophérol) est un composé organique liposoluble situé principalement dans les membranes cellulaires. Il a la capacité pour étouffer les radicaux hydroxyles libres et les anions superoxydes permettant pour réduire la peroxydation lipidique initiée par EAO au niveau de membranes plasmiques (**Nafia et al., 2005**).

À ce niveau, la vitamine E interagit avec des antioxydants solubles dans l'eau, tels que l'ascorbate (vitamine C) et le glutathion qui régénèrent les lipides (Figure 14) (**Xavier, 2009**).

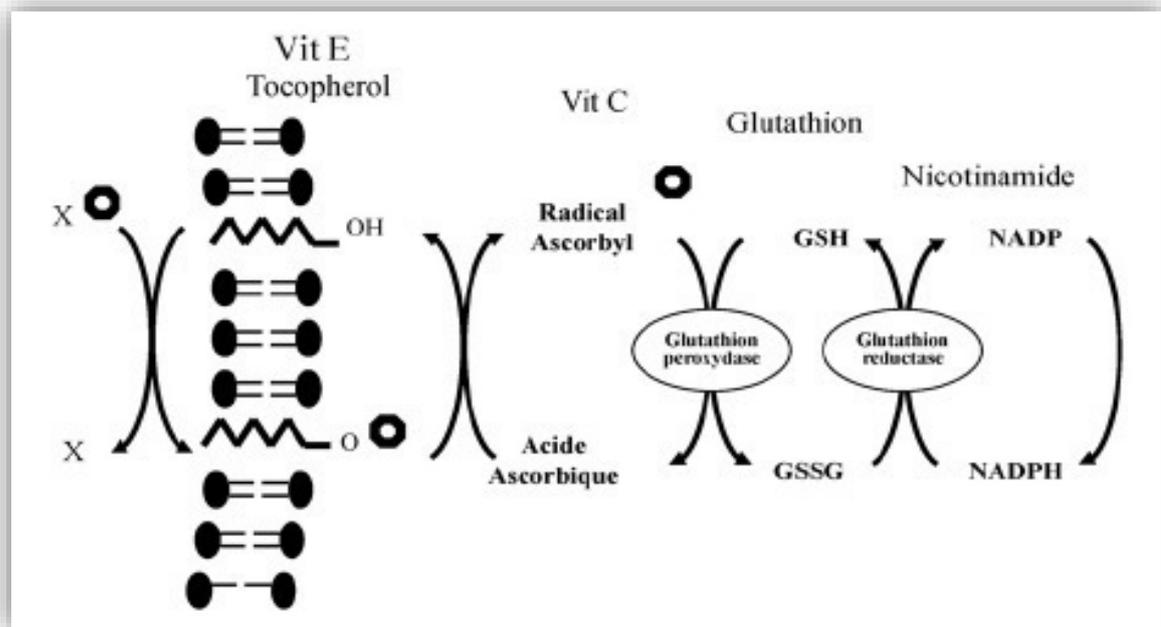


Figure14 :L'effet antioxydant des vitamines (Xavier, 2009)

➤ Les oligo-éléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro-oxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (Blandine, 2006).

➤ Caroténoïdes

Sont présents dans les fruits et légumes consommés par les humains. Les principaux caroténoïdes présents dans l'alimentation quotidienne sont: l' α -, β -carotène et le lycopène (carotènes) et les hydroxy caroténoïdes (xanthophylles-zéaxanthine et lutéine).

Les caroténoïdes sont importants non seulement pour leur activité provitamine A, mais aussi pour un éventail d'autres actions dans les systèmes biologiques. Comme les tocophérols, les carotènes et les xanthophylles sont des désactivateurs de $^1\text{O}_2$ (oxygène singulet) efficaces et des radicaux libres. Alors que les réactions des carotènes avec les radicaux libres sont

beaucoup plus complexes et dépendent principalement de la nature du radical libre plutôt que du carotène (Oroian et Escriche ,2015).

➤ **Polyphénols**

Les composés poly phénoliques sont omniprésents dans tous les organes de la matière végétale et font donc partie intégrante de l'alimentation humaine. , l'intérêt pour les phénoliques alimentaires a augmenté en raison de leurs capacités anti-oxydantes et anti-radicalaires (Oroian et Escriche ,2015).

L'*Olea europaea* est largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour un large éventail de problèmes de santé dans divers pays. L'écorce, les fruits, les feuilles, le bois, les graines et l'huile sont utilisés sous différentes formes, seuls ou parfois en combinaison avec d'autres herbes (Cheriti *et al.*, 2016).

Chapitre 2 :
Olea europaea et activités
biologiques

2. *Olea europaea* et activités biologiques

2.1. Description botanique

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen (Breton *et al.*, 2006). De 6 à 8m de hauteur à tronc tortueux à écorce grisâtre, crevassée (Ghedira, 2008) . peut atteindre 15 m de haut (Hans et Kothe, 2007). Sa longévité multiséculaire est légendaire, la température demeure à plusieurs jours à 16 C° l'isotherme -12C° correspondrait à la limite de son air de culture. Facilement identifiable à son port à feuilles blanches à 4 pétales soudé en tube à la base (Claude et Françoise , 2007). Les feuilles, blanches argentées à la face inférieure, vertes grisâtres à la face supérieure, opposées, persistantes, coriaces, lancéolées. Les fleurs, petites et blanches, à quatre pétale, sont réunies en grappes dressées, les fruits, olives, sont des drupes ovoïdes, vert puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme (Ghedira, 2008). L'olivier exige un climat ensoleillé doux et sec, craint, l'excès de l'humidité, Il s'adapte aux conditions extrêmes de l'environnement, mais exige une intensité lumineuse importante. Mais s'accommode de tout type de sol (Claude et Françoise ,2007 ; Claude et Françoise ,2007) (figure 15).

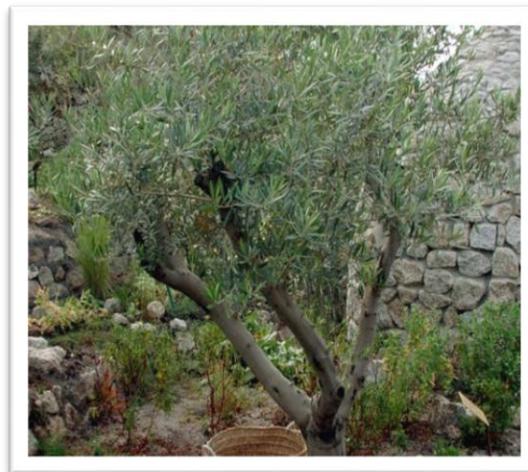


Figure 15 : *Olea europaea* L (Ghedira, 2008)

Dans le genre *Olea*, l'olive (*Olea europaea* L.) possède la plus grande distribution géographique, et plusieurs sous-espèces ont été décrites (Médail *et al.*,2001). L'air d'extension de la culture de l'olivier (figure 15) définit l'air biogéographie que de la sphère méditerranéenne et du climat méditerranéenne (Ghedira, 2008).

L'espèce *Olea* L. a été nommée par Linné. C'est l'unique espèce du bassin méditerranéen représentative du genre *Olea* .

La classification botanique de l'arbre de l'olivier (**Ghedira, 2008 ; Basim et al., 2017**) est la suivante :

Régne : Plantae.
Embranchement : Magnoliophyta..
Sous - embranchement : Magnoliophytina.
Classe : Magnoliopsida.
Sous Classe : Dialypétales.
Ordre : Lamiales.
Famille : Oleaceae.
Genre : Olea.
Espèce : *Olea europaea* L.

2.2 . Cultivation

La culture de l'olivier est parmi les plus anciens arbres sur la planète Terre et elle remonte à plus de 7000 ans. (**Liphschitz et al.,1991**) . L'ancienneté de la culture de l'olivier est attestée par des preuves archéologiques datant du IV^e millénaire avant J-C (**Vossen et al., 2007**).

Les oliviers se sont répandus vers l'ouest depuis la région méditerranéenne en Italie, au Portugal, en Espagne, en Grèce, en France, en Asie, et en Australie (**Chiappetta et al., 2017**). Autre que l'olivier soit maintenant cultivé dans différentes parties du monde, la région méditerranéenne continue d'offrir l'oléo majoritaire et représente une production d'huile environ 98% de la culture oléicole mondiale (**Ghanbari et al ., 2012**) (figure 16).

Jusqu'à nos jours. il existe plus de 2000 cultivars dans le bassin méditerranéen qui présentent une énorme diversité basée sur la morphologie de la fosse et la morphologie des fruits, elle s'adapte très bien aux conditions pédoclimatiques de l'Algérie. Ces dernières années, l'oléiculture a connu une extension très significative dans les régions sahariennes, La wilaya d'El Oued est l'une des régions où l'oléiculture représente une filière en plein essor, qui connaît une augmentation importante des surfaces oléicoles (**Ganino et al., 2006**).



Figure 16 : Distribution géographique (Ghedira, 2008)

2.3. Caractérisation et Composition d'olive

L'olive est une drupe constituée de trois parties : l'épicarpe, le mésocarpe, et l'endocarpe (Figure 16). L'épicarpe (peau ou épiderme) est couvert de cire et reste vert tout au long de la phase de croissance puis devient pourpre, brun ou noir (selon la variété) une fois mature. Ce changement de couleur est dû à la formation des anthocyanes.

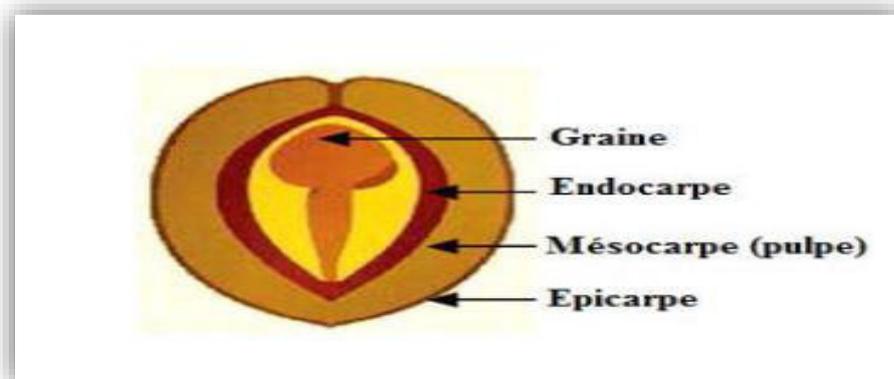


Figure 17: Coupe transversale de l'olive (Niaounakis, 2006)

La masse de l'olive varie de 2 à 12 g. Sa composition moyenne comprend de l'eau (50%), de l'huile (22%), des sucres non celluloseux (19,1%), de la cellulose (5,8%), des protéines (1,6%) et des cendres (1,5%) (Niaounakis, 2006). A noter que l'oleuropéine qui est responsable du goût amer de l'olive est concentrée dans le mésocarpe.

L'olive, dont l'huile est un composant essentiel du régime méditerranéen, riche en acides gras insaturés.

2.4. Composition phénolique

2.4.1. Généralités sur les composés phénoliques

2.4.1.1. Définition

Les métabolites secondaires représentent une variété très large des composés organiques sans fonction directe dans la croissance et le développement des plantes (Amlan *et al.*, 2010), ils jouent d'autres rôles importants dans : l'odorat, la protection contre les insectes, les herbivores et les radiations ultra-violettes solaires (Kamra *et al.*, 2006 ; Combrinck *et al.*, 2007). Comme ils ont aussi un rôle important dans les interactions de la plante avec son environnement, telle l'attraction des insectes pollinisateurs (Greathead *et al.*, 2003) plus de 200 000 structures de métabolites secondaires ont été identifiées (Amlan *et al.*, 2010)

Les composés phénoliques, sont des 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. 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...) (Bruneton, 1999).

2.4.1.2. Structure des composés phénoliques

Sous la désignation de composés phénoliques on désigne un vaste ensemble de substances qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Les flavonoles montrent une grande diversité et une complexité qui dépend de la nature et de la position des hydroxylations, méthylations et glycosylations du squelette carbone de base en C 15. Parmi eux, les trois classes des flavonoles, anthocyanes et flavanes-3-ols (Figure 17) (Bruneton, 1999). (Tableau 2) résumé structure et classe des composés phénoliques.

Tableau 2 : Structure et classe des composés phénoliques (Ghanbari *et al.* ,2012)

Structure	Classe
C6	Phénols simples
C6-C1	Acides phénoliques
C6-C2	Acétophénone et acides phenylacetiques
C6-C3	Acides cinnamiques, aldehydes cinnamyl, alcools cinnamyl, Chalcones, aures, dihydrochalcones.
C15	Flavans, flavones, flavanones, flavanonols, anthocyanidins, anthocyanins

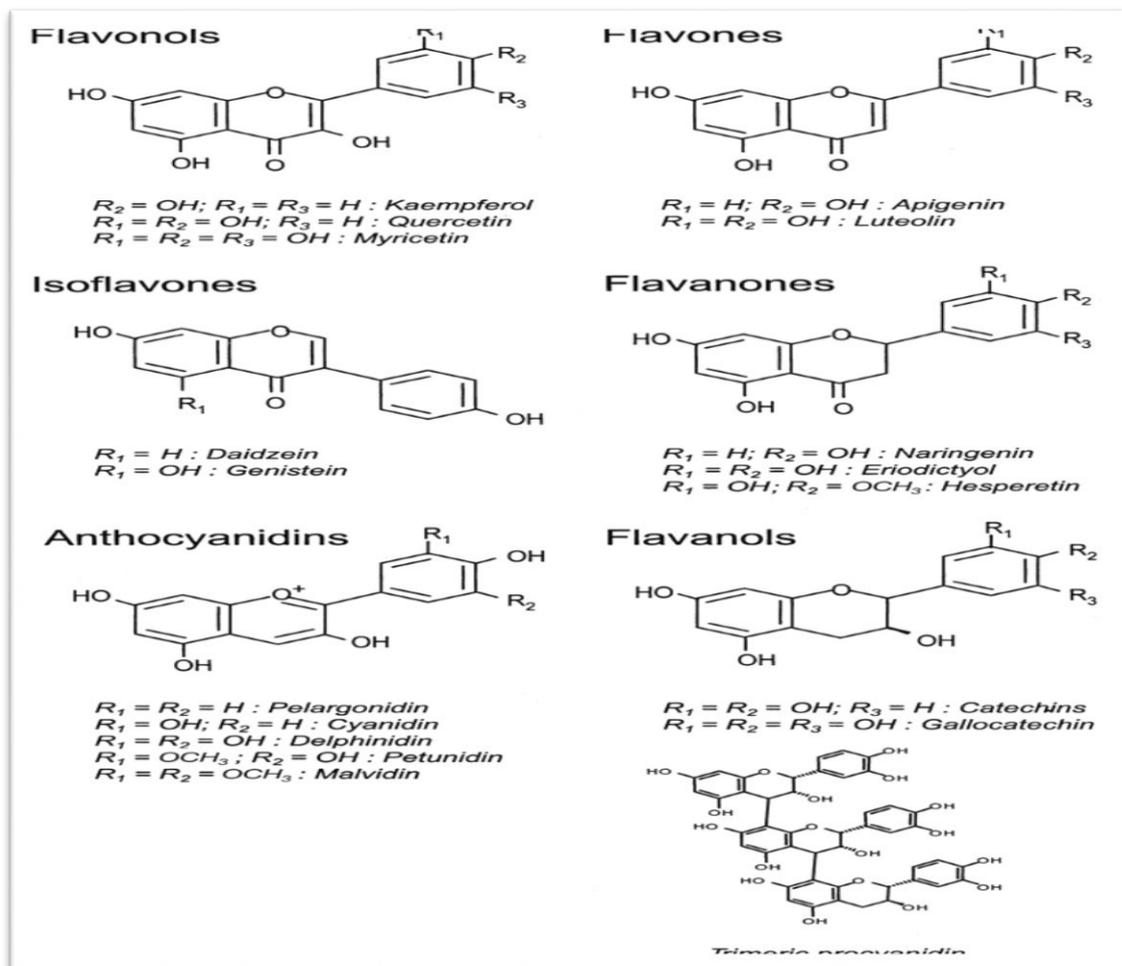


Figure 18 : Structure chimique des flavonoïdes (Bruneton ,1999)

2.4.1.3. Mécanisme d'action des composés phénoliques

Le composé le plus actif comme antioxydant est celui qui possède plus d'un groupe actif (NH₂ ou OH) en position ortho. Ainsi, le composé antioxydant le plus actif est le catechol, qui possède deux groupes hydroxyle en position ortho (Valgimigli *et al.*, 2008). La première chaîne portant un radical peroxyde était piégée par le transfert d'atome H à partir de l'OH phénolique labile et la seconde par réaction avec le radical phénoxyde résultant. Les catéchols peuvent piéger deux radicaux peroxydes (figures 19 et 20).

Plupart des conditions comme suit:

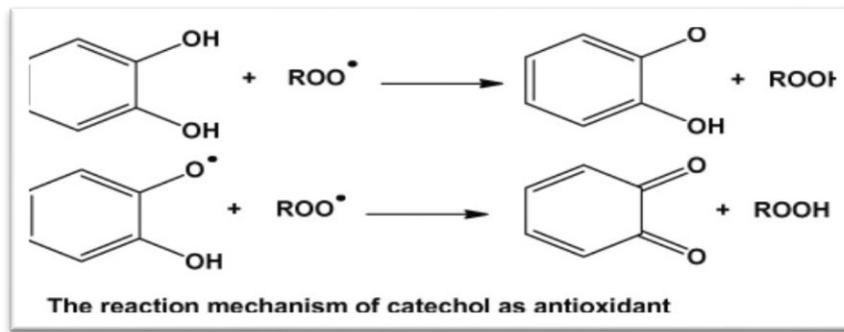


Figure 19 : Mécanisme d'action antioxydante d'un catechol (Valgimigli *et al.*, 2008)

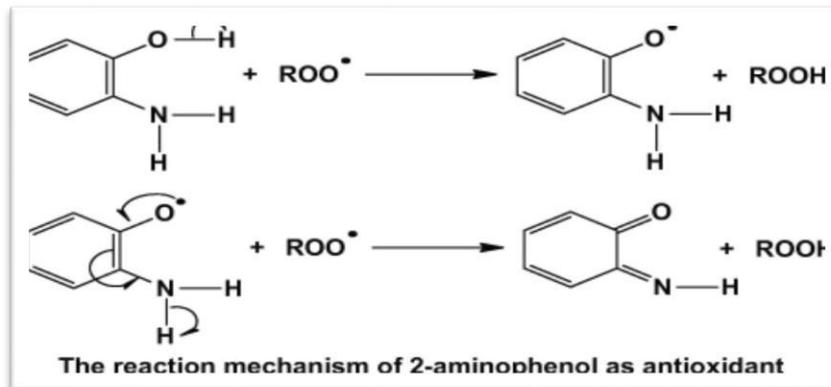


Figure 20 : Mécanisme d'action antioxydante d'aminophenol (Valgimigli *et al.*, 2008)

L'activité antioxydante élevée de ces composés est due à la présence de groupes di-actifs (OH ou NH₂) en position 1,2 dans leur structure moléculaire. Cette caractéristique de structure a la capacité de former une liaison intramoléculaire d'hydrogène. L'atome de H

qui n'est pas impliqué dans cette liaison sera alors abstrait par les radicaux libres, entraînant un radical phénoxy stable (Ordoudi *et al.*, 2006).

Ensuite, le 4-aminophénol, l'hydroquinone et la p-phénylènediamine étaient dans le second ordre comme antioxydants. Ces composés ont la même position de substituant. Le mécanisme de réaction de l'hydroquinone pourrait être expliqué dans les (figures 21 et 22).

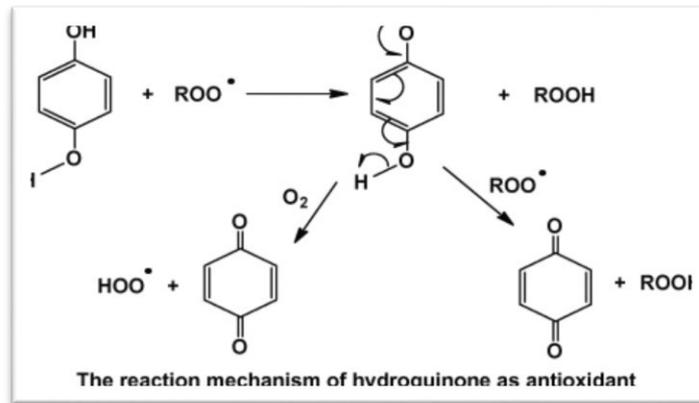


Figure 21 : Mécanisme d'action antioxydante d'hydroquinone (Ordoudi *et al.*, 2006)

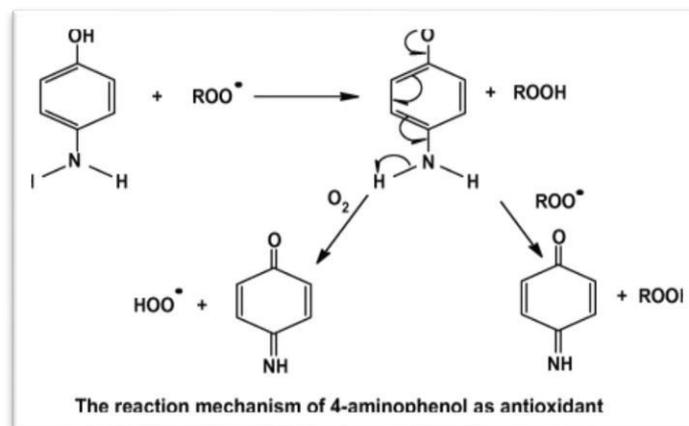


Figure 22 : Mécanisme d'action antioxydante de 4-aminophénol (Ordoudi *et al.*, 2006)

Dans le troisième ordre, le 3-aminophénol a une activité antioxydante médiée. Le 3-aminophénol a un groupe donneur d'électrons (NH_2) mais en position méta. Cette position diminue l'effet du groupe amino sur la stabilité du radical phénoxy résultant, de sorte que l'activité antioxydante du 3-aminophénol a diminué (Ordoudi *et al.*, 2006).

2.4.1.4. *Olea europaea* et composés phénoliques

La recherche phytochimique effectuée sur *Olea europaea* a conduit à l'isolement des flavonoïdes, des flavones glycosides, des flavanones, des iridoïdes, des glycosides, des secoiridoïdes, des triterpènes, des biophénols (Obied, 2013). Des dérivés de l'acide benzoïque, des isochromans, et quelques autres types de métabolites secondaires à partir de différentes parties (figure 22). Les composés phénoliques, les flavonoïdes, les secoiridoïdes (Jerman *et al.*, 2010). Sont présents dans presque toutes les parties de l'*Olea europaea*.

2.4.2.1. Constituants des fruits, graine, pulpe

L'olivier est une source très riche de composés phénoliques et possède de nombreuses propriétés biologiques intéressantes. La présence de l'hydroxytyrosol, Hydroxytyrosol acétate et 3,4-dihydroxyphenylethyl - [(2,6-dimethoxy-3-ethylidene) tetrahydropyran-4-yl] acétate, a été rapportée dans l'huile d'olive extra vierge. L'hydroxytyrosol, Les flavonoïdes comme l'apigénine, et luteoline ont été rapportés à partir de l'huile d'olive. (Kergeta *et al.*, 2005 ; Ghedira, 2005 ; Khan *et al.*, 2007).

Les secoiridoïdes constituent une partie importante des fruits et des feuilles d'*Olea europaea*. L'oléuropeïne et leurs glycosides se trouvent dans les fruits et graines d'olives, Un grand nombre de flavonoïdes tels que la quercétine ont été signalés à partir des fruits (Ghedira, 2005 ; Bianco *et al.*, 2003).

Un certain nombre de composés phénoliques incluant l'acide 7-désoxylogogique, Et l'acide gallique ont été identifiés dans la pulpe des olives (Feo et Senatore, 1993 ; Bartolini *et al.*, 1998 ; Peralbo-Molina *et al.*, 2012) (Tableau 3).

Tableau 3: Constituants du fruit d'olivier (Kergeta *et al.*, 2005 ; Khan *et al.*, 2007)

Fruit	Fraction ou famille chimique	Constituants chimiques
L'olive est riche en eau (40-45 %), en glucides (10-20 %) et en lipides qui représentent environ 30 % du fruit mur (environ 50 % du péricarpe et 35-40 % de l'amande qui représente 15 % du poids du noyau).	-Fraction saponifiable	- Acide palmitique 7,5-20 %, - Acide palmitoléique 0,3-3,5% - Acide stéarique 0,5-5,0 % - Acide oléique 55-83 % - Acide linoléique 3,5-21,0 % - Acide a-linolénique > 0,9 %
	-Fraction insaponifiable (teneur/100 g) :	- Hydrocarbures dont le squalène: 300-700 mg - Stérols dont le b-sitostérol : 70-90 mg - Alcools triterpéniques : 100-300 mg a-tocophérol : 4-13 mg, b-tocophérol : 1-2 mg - composés phénoliques: 50 mg dont hydroxytyrosol 0,01-1 mg et tyrosol

Les secoiridoïdes constituent une partie importante des feuilles et des fruits *d'Olea europaea*. L'oléuropeine (Grohmann, 1981) est le glycoside de secoiridoïde le plus abondamment trouvé dans les fruits *d'Olea europaea*. Les secoiridoïdes et leurs glycosides se trouvent dans les fruits et graines d'olives Un grand nombre de flavonoïdes tels que la quercétine (Bianco *et al.*, 2003) Ont été signalés à partir des fruits (figure 23).

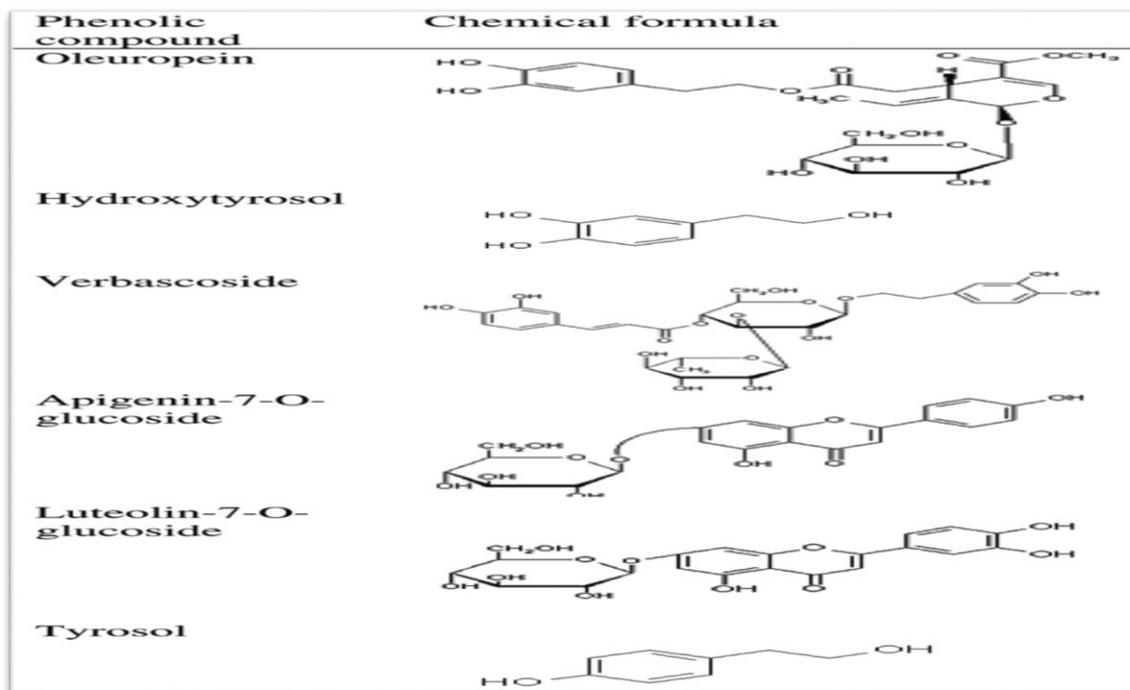


Figure 23 : Structure chimique de l'oleuropeine et l'hydroxytyrosol (Principale *et al.*, 2010)

2.5. Usages d'*Olea europaea*

L'*Olea europaea* est largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour un large éventail de maladies dans divers pays. L'écorce, les fruits, les feuilles, le bois, les graines et l'huile sont utilisés sous différentes formes, seuls ou parfois en combinaison avec d'autres herbes. Le (Tableau 4) résume l'utilisation d'*Olea europaea* dans la médecine traditionnelle.

Tableau 4: Utilisation d'*Olea europaea* dans la médecine traditionnelle

Partie/préparation utilisation	Maladie/utilisation	Référence
Fruits et feuilles	Hypoglycémie ,Hypotension	(Amel, 2013).
Infusion des fruits et feuilles	Antibioque	(Sheth et al.,2005).
Décoctions de feuilles séchées et de fruits / usage oral	Diarrhée, infections respiratoires et urinaires	(Sheth et al.,1991).
Huile d'olive / appliquée sur le cuir chevelu	Pour prévenir la perte de cheveux	(Zargari,1997).
Extrait bouilli de feuilles fraîches / prises par voie orale	Traiter l'asthme	(Lawrendiadis,1961).
Extrait bouilli de feuilles séchées / prises par voie orale	Traiter l'hypertension	(Ribeiro et al.,1988).
Feuilles extraites dans de l'eau chaude	Diurétique	(Vardanian,1978).

Huile d'olive	Appliqué sur les membres fracturés	(Ghazanfar et Al-Al-Sabahi,1993)
Infusion de feuilles / usage oral	Antipyrétique	(Gastaldo,1974).
Fruits d'olive	Nettoyant pour la peau	(Fujita <i>et al.</i>,1995).
Infusion de feuilles / usage oral	Anti-inflammatoire, tonique	(Sánchez-González <i>et al.</i>,2013).
Préparation des feuilles	Traiter la goutte	(Flemmig <i>et al.</i>,2011).
Feuilles d'<i>O. europaea</i>	Antibactérien	(Haloui <i>et al.</i>2010).
Décoction des feuilles	Antidiabétique, antihypertenseur	(Tahraoui <i>et al.</i>,2007).
Fruits et feuilles	Hémorroïdes, rhumatismes et vasodilatateurs	(Süntar <i>et al.</i>,2010).
Infusions de feuilles	Traitement des infections oculaires	(Guerin et Reveillere,1985).

2.6. Activités biologiques

2.6.1. Activité antidiabétique

Al-Azzawie et Alhamdani, (2006). Ont proposé que les patients antidiabétiques puissent être traités avec de bons antioxydants car le soulagement du stress oxydatif réduit les taux de glycémie. Il a été suggéré que l'effet antidiabétique de l'oléuropeine et de l'hydroxytyrosol pourrait être dû à leur capacité à restreindre le stress oxydatif largement associé aux complications pathologiques du diabète (**Jemai et al.,2009**).

Autre étude a élucidé que l'extrait d'éthyle acétate des olives de chemlal a présenté une excellente activité inhibitrice in vitro contre les enzymes α -amylase et glucosidases (**Dekdouk et al.,2015**).

2.6.2. Activité anticancéreuse

Les constituants d'*Olea europaea* ont montré de très bonnes activités anticancéreuses sur différents types de cancers (**Casaburi et al.,2013**). Les activités antiprolifératives et apoptotiques de l'érythrodiol (**Duquesnoy et al.,2007**). Dans les cellules HT-29 de carcinome colorectal humain (**Juan et al., 2008**). Il a inhibé la croissance cellulaire sans toxicité dans les cellules d'adénocarcinome du colon. De même, des études ont été réalisées sur des extraits d'eau et d'extraits méthanoliques de feuilles d'olivier contre le cancer et les cellules endothéliales. Ces extraits bruts ont été trouvés pour inhiber la prolifération cellulaire de l'adénocarcinome du sein humain (MCF-7) (**Grohmann,1981**).

2.6.3. Activités antimicrobiennes

L'Olea europaea a été utilisé comme un remède populaire pour la guérison de nombreux troubles infectieux d'origine bactérienne, fongique et virale. Plusieurs études ont été effectuées dans le passé en validant le potentiel antimicrobien et antiviral d'*Olea europaea* (**Adnan et al.,2014**). Les composés phénoliques des feuilles d'olives ont également été évalués contre plusieurs microorganismes qui sont des agents causaux d'infections intestinales et respiratoires humaines, y compris des bactéries Gram positives (*Bacillus cereus*, *B. subtilis* et *Staphylococcus aureus*), des bactéries Gram négatives (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) et des champignons comprenant *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* (**Sudjana et al.,2009**).

Les extraits de feuilles d'olive présentaient une activité antimicrobienne relativement élevée contre *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant la méthode de diffusion du disque (Ko *et al.*,2009).

Les activités bactéricides et fongicides des solutions d'olives de table sans sel ont été évaluées contre plusieurs microorganismes phytopathogènes (Medina *et al.*,2011).

2.6.4. Activités antihypertenseurs et cardioprotectives

L'hypertension est à l'origine de maladies cardiaques et peut causer des accidents vasculaires cérébraux, des maladies artérielles périphériques et des maladies rénales chroniques si elles ne sont pas traitées. De nombreux produits naturels ont été jugés efficaces contre l'hypertension. L'huile d'olive a été suggérée comme une source naturelle et peu coûteuse de contrôle de l'hypertension (Somova *et al.*,2003).

2.6.5. Activités anti-inflammatoires et antinociceptives

L'huile d'olive extra vierge a montré une activité anti-inflammatoire remarquable due à oleocanthal (Ali-Shtayeh *et al.*,2012). Un composé présent dans l'huile d'olive extra vierge (EVOO) qui a un profil remarquablement similaire à l'ibuprofène, un médicament anti-inflammatoire synthétique (Beauchamp *et al.*,2005). De plus, L'administration intrapéritonéale d'huile essentielle d'*Olea. europaea* à des doses de 100, 200 et 300 mg / Kg a entraîné une réduction significative des constriction abdominales induites par l'acide acétique et de l'œdème de la patte chez la souris (Haloui *et al.*,2010).

2.6.6. Activité antioxydante

L'oléuropeine et l'hydroxytyrosol présentaient une activité antioxydante élevée (Le Tutour et Guedon, 1992) tandis que le tyrosol ne présentait aucune activité antioxydante ni prooxydante .L'oléuropeine a également été évaluée pour son activité antioxydante *in vitro* à l'aide d'un test de chimioluminescence et s'est révélée avoir une activité antioxydante remarquable (Speroni *et al.*, 1998).

Quatre composés phénoliques majeurs présents dans l'huile d'olive, à savoir l'hydroxytyrosol (Corona *et al.*, 2009). L'oléuropeine (Grohmann, 1981). L'hydroxytyrosol-élénolate (Kanakis *et al.*, 2013). Et le 3,4-dihydroxyphényléthanol-acide élénique

dialdéhyde (**Wise, 1967**). Ont montré de manière significative l'effet protecteur pour les globules rouges du dommage oxydatif (**Paiva-Martins *et al.*, 2009**).

L'effet protecteur des extraits contre les lipides et la peroxydation des protéines a également été étudié. La pulpe d'olive a montré une activité importante pour la protection de la peroxydation des lipides (**Nadour *et al.*, 2012**).

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre 1 :
Matériel et Méthodes

1. Matériel et Méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel végétal

Les fruits de *Olea europaea*, les olives intactes ont été nettoyées, lyophilisées et stockées à température 4°C à l'abri de la lumière (Figure 24).

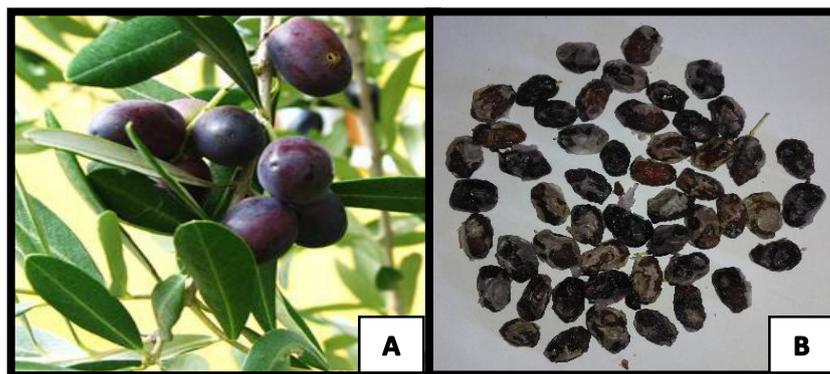


Figure 24 : Fruits d'*Olea europaea* fraîches(A) et lyophilisées(B)

1.1.2. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés sont tous de grade analytique.

Hexane C_6H_{14} (M= 86.18), Chloroforme $CHCl_3$ (M=119.38), Méthanol CH_3OH (M=32,04), Acétonitrile C_2H_3N (M=41.05), Éthyle acétate $C_4H_8O_2$ (M=88.11), Méthanol, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) , α -Tocophérol, hydroxytoluene butylé (BHT), hydroxyanisole butylé (BHA), Persulfate de potassium $K_2S_2O_8$, Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylebenzothiazoline-6-sulphonique)ABTS, Ethanol, Tri-chloro acetic acide (TCA), Potassium ferricyanide $K_3Fe(CN)_6$, Ferric chloride $FeCl_3$, Phosphate buffer.

Acétate d'ammonium $ACNH_4$, ($CuCl_2, 2H_2O$), Neocupronin, hydroxytoluene butylé (BHT), Bovine serum albumin biochemical grade (BSA), Trizma base $C_4H_{11}NO_3$, HCl, Diclofénac de sodium (Standard), FCR(Folin-Ciocalteu réactif), Na_2CO_3 de 7,5% (Carbonate de sodium), Nitrate d'aluminium ($Al(NO_3)_3, 9H_2O$), Potassium acetate (CH_3COOK).

1.1.3. Appareillage

Centrifugeuse (SIGMA 2-16 KC), Lecture micro plaque (Perkin Elmer), balance (KERN ABT 220-5DM), Bain Marie (JULABO SW23), Rotavapor (BUCHI), Significateur (Fisher Scientific FB15046), Casseur (RETSCH), Agitateur magnétique (Fisher Scientific), Agitateurs Vortex (FISHERBRAND), la Hotte (SHINSAENG), Réfrigérateur.

1.2. Méthodes

1.2.1. Extraction

1.2.1.1. La préparation d'extrait méthanolique (EM)

Les olives lyophilisées ont été cassées et écrasé en une poudre fine à l'aide d'un casseur de type RETSCH moulin.

Le poudre obtenu (100g) a été macéré avec 300ml de solvants d'extraction (Exane , Chloroforme et méthanol). L'extrait méthanolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange. l'extrait brut a été séché par évaporation sous pression réduite dans un rotavapor à 40 ° C (BUCHI) (Figure 25) (Cioffi *et al.*, 2010).

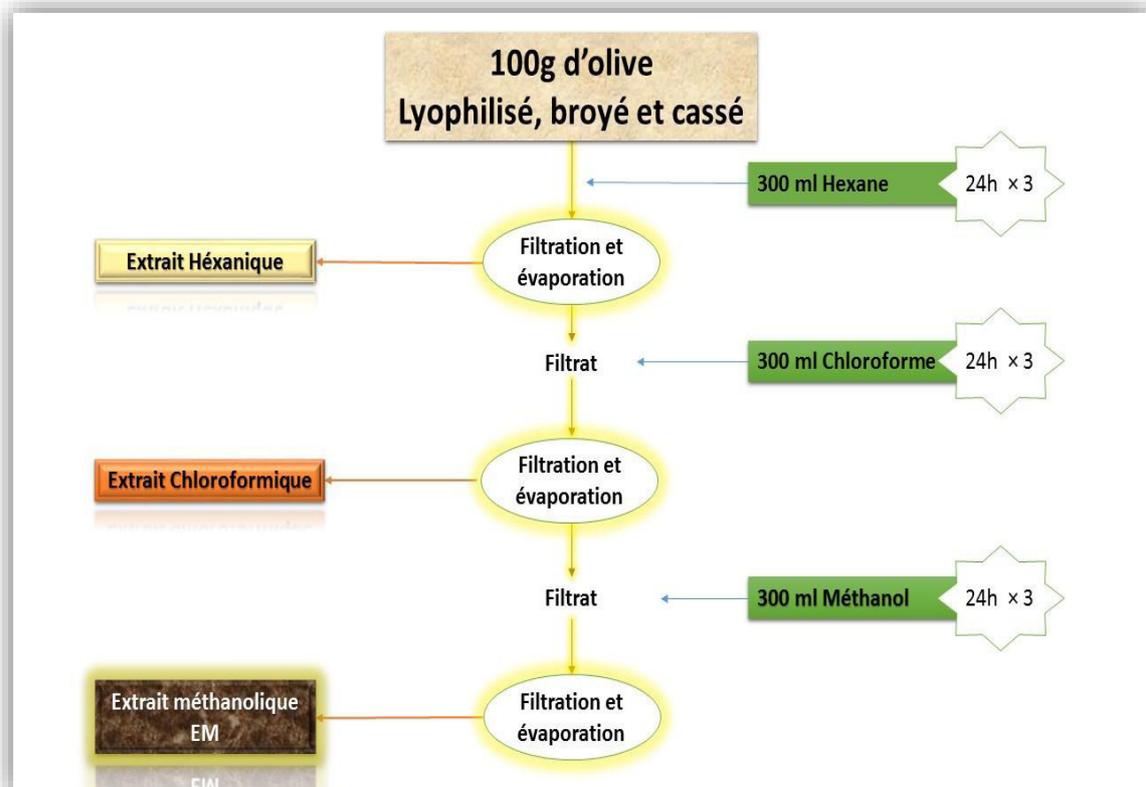


Figure 25: Préparation d'extrait méthanolique (EM) (Cioffi *et al.*, 2010)

1.2.1.2. La préparation d'extrait d'acétate éthyle (AE)

100g d'olives lyophilisées et broyée subit une extraction par l'acétate éthyle selon la méthode de (Figure 26) (Dekdouk *et al.*, 2015).

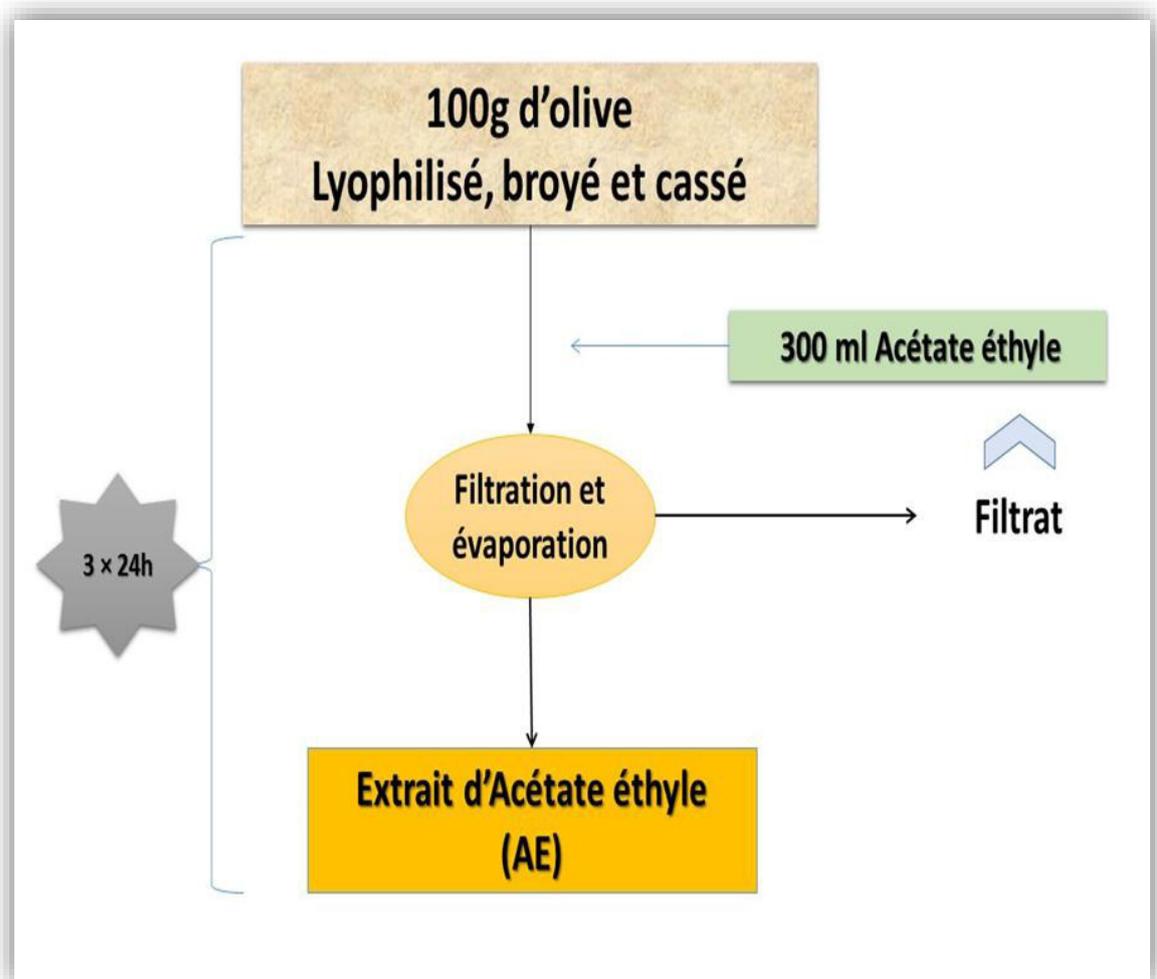


Figure 26 : Préparation d'extrait d'acétate éthyle (AE) (Dekdouk *et al.*, 2015)

1.2.2. Fractionnement des extraits (EM) et (AE)

Les fractions sont obtenues à partir des extraits brutes (EM) et (AE) (figure 27)

- On ajoute 5ml d'Acétonitrile + 5ml n-Hexane à 5mg de l'extrait (EM) ou (AE)
- Décantation et séparation des deux phases. Cette opération est répétée trois fois
- Evaporation sous l'azote (N) (Bekkara *et al.*, 1998).

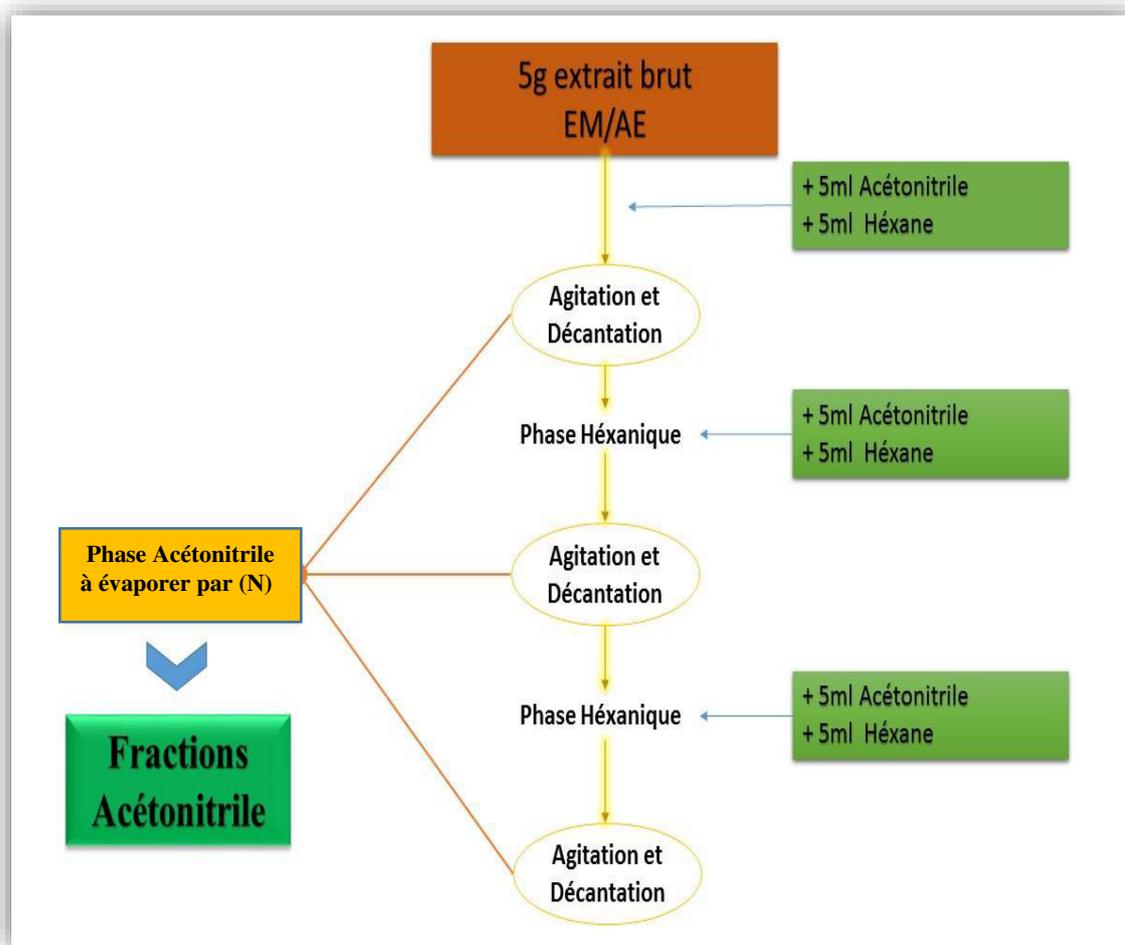


Figure 27: Fractionnement des extraits EM/AN et AE/AN
(Bekkara *et al.*, 1998)

1.3. Activité anti-oxydante *in vitro* :

1.3.1. Effet scavenger du radical DPPH

a- Principe

La mesure de l'activité anti-radicalaire a été testée selon la méthode de Blois 1958, telle qu'elle a été décrite par (Brand-Williams *et al* 1995) avec quelques modifications. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de diphényl picryl hydrazyl (DPPH) en solution dans le méthanol. L'addition d'un antioxydant dans une solution de DPPH conduit à une décoloration et réduit le radical DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune (Diphénylpicryl-hydrazine) dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants

présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002) qui est directement proportionnelle à la capacité antioxydant du produit ajouté (Figure 28).

Cette décoloration peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Elle fournit donc un moyen pratique de mesurer l'activité antioxydante des extraits huileuse.

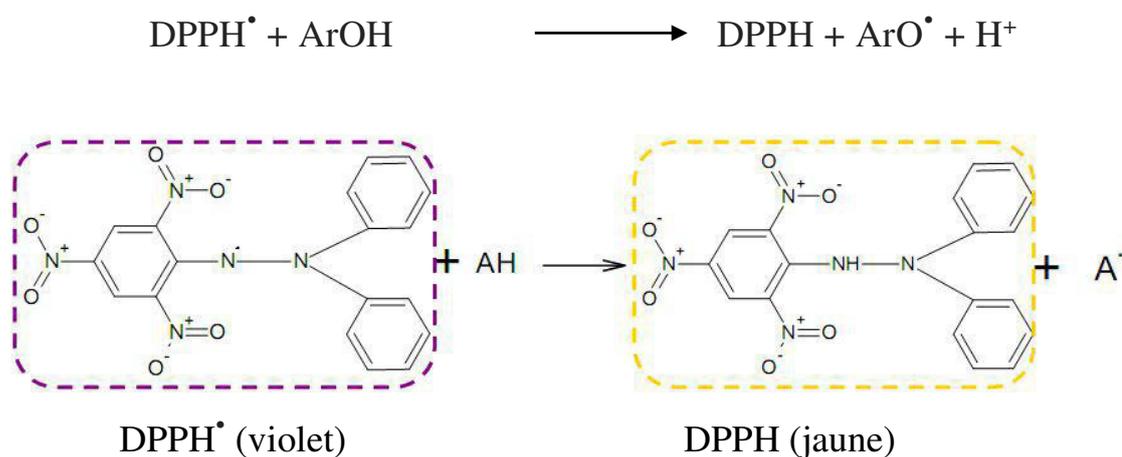


Figure 28 : Réaction de DPPH (Elmouloud , 2016)

b- Mode opératoire

Pratiquement, une solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Un volume de 40 µL des solutions d'extraits et de l'antioxydant de référence, le BHT (hydroxytoluène butyle) sont ajoutés à 160 µL de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min en présence de concentrations croissantes (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 et 1.5625 µg/ml). De chaque extrait, sept dilutions 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64 ont été préparées à partir d'une solution mère (0.5mg/1mL MeOH), Sur une plaque de 96 puits, et la décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution de DPPH est lue à 517 nm contre un blanc de méthanol. Le contrôle contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol.

L'activité anti-radicalaire est déterminée selon l'équation suivante:

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = \left[\frac{\text{ABS}_C - \text{ABS}_E}{\text{ABS}_C} \right] \times 100$$

- **ABS_C** : Absorbance à 517 nm du contrôle.
- **ABS_E** : Absorbance à 562 nm de l'extrait testé.

C- Calcul des IC50

La concentration inhibitrice IC50 de 50 % de l'activité du DPPH (aussi appelée EC50) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg / ml et comparée avec celle du BHT (**Cuendet *et al* 1997 ; Burits *et al* 2000**).

Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constituée de méthanol et DPPH (couleur). Les valeurs IC50 moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage (**Luciana *et al.*, 2001**).

1.3.2. Test du pouvoir réducteur (Reducing Power Assay)

a-Principe

Le pouvoir réducteur des extraits a été évalué en utilisant la méthode décrit par **Oyaizu (1986)** ; cette dernière est un essai simple et rapide, elle est universelle, peut être appliquer aussi chez des plantes que les plasmas et dans les extraits organique et aqueux (**Bougandora et Bendimerad, 2013**), le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significative de son activité antioxydant potentielle (**Gheffour *et al.*, 2015**).

Ce test est basé principalement sur la capacité de l'extrait à donner un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe³⁺ à la forme Fe²⁺. Les substances ayant un potentiel de réduction , réagissent avec le ferricyanure de potassium pour former le ferrocyanure de potassium , qui réagit à son tour avec le chlorure ferrique pour donner lieu à un complexe qui se manifeste par l'apparition de la couleur bleu mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur (**Le K et al., 2007 ; Jayanthi et Lalitha, 2011**).

b-Mode opératoire

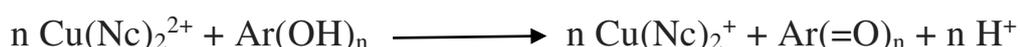
Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode de Oyaizu (1986) ; avec quelques modifications dans une première étape, 40 µl d'une solution de phosphate buffer

(0,2M- pH= 6,6) et 50 µl de potassium-ferricyanide (1%) sont ajoutés à 10 µl des différentes concentrations des extraits. Après incubation de 20 minutes dans un bain marie à 50 C° ; on a ajouté 50 µl d'une solution aqueuse de Tri-chloro acetic acide TCA (10%) au milieu réactionnel. Après agitation et centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min. On a ajouté 40 µl de l'eau et 10µl de 0,1% FeCl₃. Vitamine C a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en concentration IC₅₀ qui se traduit par la concentration d'antioxydant utilisé pour obtenir une absorbance de 0,5. L'absorbance est déterminée à 700 nm. les résultats sont comparé avec l'acide ascorbique et l'acide tannin (Liu *et al.*, 2013).

1.3.3. Test de CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity)

a-Principe

De nombreuses réactions d'oxydoréduction dans la cellule sont impliquées dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires. Par leur effet oxydant naturel, les espèces oxygénées activées (EOA) influencent cet état redox et peuvent être responsable d'un effet oxydant ou antioxydant. La méthode CUPRAC est basée sur l'absorbance accrue en raison de la formation du complexe Néocuproïne-cuivre [Nc- Cu²⁺] en présence d'un agent antioxydant.



Où le polyphénol est oxydé en la quinone correspondante, et le produit de réduction, c'est-à-dire, le bis (néocuproïne) cuivre (I) chélate, montre une absorption maximale à la suite de la réaction redox avec des polyphénols réducteurs à 450 nm, et encore il est soluble à la fois dans l'eau et les milieux organiques, par conséquent la méthode CUPRAC est capable de doser les antioxydants hydrophiles et lipophiles. Etant donné que le pH optimal de la méthode est proche de celle physiologique.

Le test CUPRAC a été décrit par (Apak *et al.*, 2004). Le réactif CUPRAC est assez rapide pour oxyder les antioxydants de type thiol et cette technique repose sur la mesure de la capacité d'une molécule à réduire le cuivre (II) complexé par la néocuproïne selon la réaction suivant :



Dans cette réaction, les groupes Ar-OH réactifs des antioxydants polyphénoliques sont oxydés en les quinones correspondantes (Ar = O) et Cu (II) -Nc est réduit en chélate de Cu(Nc)^{2+} qui se manifeste par l'apparition d'une coloration suivie par spectrophotométrie à 450nm. La formation du complexe est suivie par la lecture de l'absorbance qui est proportionnelle au potentiel antioxydant de la molécule, et dépend de différents paramètres tels que la concentration de la solution, le temps de mesure ou la température (**Reşat Apak et al., 2007**).

b-Mode opératoire

Sept dilutions des extraits ont été préparées : 1/1 ,1/2 ,1/4 ,1/8 ,1/16 ,1/32 et 1/64 à partir de la solution mère (0.5 mg/mL). Sur une plaque de 96 puits, 50 μ L des dilutions sont répartis, auxquels sont additionnés de la solution (S2) 50 μ L CuCl_2 (dissoudre 0,042g de CuCl_2 dans 25mL H_2O), 60 μ L tampon acétate d'ammonium (1,927g de NH_4AC dissout dans 25 mL H_2O , pH=7) et 50 μ L de néocuproïne (0,039g dissout dans 25 mL EtOH), les solutions sont ensuite incubées à 25°C pendant 60 minutes. L'absorbance est mesurée à 450 nm par un lecteur de microplaques. La capacité antioxydante est calculée en équivalents BHA et BHT.

1.4. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

a-Principe

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* est déterminée par la méthode de **Kandikattu, (2013)** avec de légères modifications. Propriétés anti-inflammatoires des extraits sont expliquées par l'inhibition de la dénaturation des protéines BSA (Sérum Bovine Albumine) provoquée par la chaleur (72°C). (La dénaturation des protéines est une cause bien documentée d'inflammation).

b-Mode opératoire

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des fractions a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation de la protéine albumine. La méthode consiste à préparer quatre solutions. La solution d'essai (1 ml) composé de 0,5 ml de la solution aqueuse de sérum bovine Albumine BSA 0,2% (0,2 g BSA est dissoute dans 100 ml de tampon tris-Hcl 0,05 M, PH : 6,6 (1,21 g de tris est dissous dans 200 ml de l'eau distillé) et 0,5 ml

d'extrait avec une concentration différent croissant (20 ,10 ,5, 2.5 mg/ml). La solution control test (1 ml) composé de 0,5ml de la solution aqueuse de BSA 0,2 % et 0,5 ml de tampon (Eau distillé ou Tris-Hcl). La solution contrôle produit (1 ml) composé de 0,5 ml tampon (Eau distillé ou Tris-Hcl) et 0,5 ml d'extrait avec des concentrations croissantes (20 ,10 5,2.5 mg/ml). La solution standard test (1 ml) compose de 0,5 ml de la solution aqueuse de BSA 0,2 % et 0,5 ml de la solution de standard diclofénac Sodium avec une concentration différent croissant (500, 250, 125, 62,5 µg/ml). Tous les solutions au-dessus ont été ajustée à pH 6,6 par une solution d'HCl (0,05N), les échantillons ont été incubées à 37°C pendant 15 min, ensuite bain marie à 72° cependant 5 min, après refroidissement des tubes, L'absorbance de ces solutions était déterminé à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau UV-VIS (HELIOS EPSILON) à une longueur d'onde de 660 nm. Chaque expérience a été réalisée en triple et l'absorbance moyenne a été enregistrée. Le pourcentage d'inhibition de la précipitation a été déterminé en pourcentage par rapport au témoin en utilisant la formule.

$$\text{Pourcentage d'inhibition de la dénaturation} = \frac{\text{ABS Contrôle} - \text{ABS Extrait}}{\text{ABS Contrôle}} \times 100$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le Diclofenac Sodium (250ug/ml).

1.5. Analyse statistique

Les données expérimentales obtenues du dosage et de l'évaluation des activités biologiques ont été exprimées par une moyenne et (\pm) l'écart type. Le coefficient de corrélation des différentes propriétés a été déterminé en effectuant par l'Excel 2010, et les valeurs d'IC50 sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la Courbe [% inhibition = f (concentrations)] ; et pour les valeurs d'C50 (concentration effectrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la Courbe [Absorbance = f (concentrations)] aussi la même manière utilisé pour les courbes d'étalonnage d'acide gallique et la quercétine.

Chapitre 2 :
Résultats et discussions

2. Resultats et discussion

2.1. Evaluation de l'activité antioxydante par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH)

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant. Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits d'olives. Nous avons déterminé la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC50), qui constitue l'activité antioxydante de l'extrait étudié en utilisant la courbe de régression linéaire : $y = ax + b$.

Le pourcentage d'inhibition augmente graduellement ou progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement presque total du DPPH présent dans le milieu. A partir des courbes des taux d'inhibition, nous avons pu déduire graphiquement les valeurs d'IC50 de BHA, BHT et des fractions acétonitrile des extraits méthanolique (Figure 29) et de l'éthyle acétate d'olives étudiées; représentées dans la (Figure 30). La valeur de L'IC50 est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (taux d'inhibition I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est appréciable. Selon les résultats enregistrés, la fraction acétonitrile de l'extrait de l'éthyle acétate est doté d'un pouvoir antioxydant important par apport à la fraction acétonitrile de l'extrait méthanolique, leurs IC50 sont : $14,24 \pm 0,44$; $29,55 \pm 0,77$ respectivement, mais relativement faible que celle de BHA dont la valeur est de l'ordre de $5,73 \pm 0,41$ $\mu\text{g}/\text{Ml}$ (Figure 31).

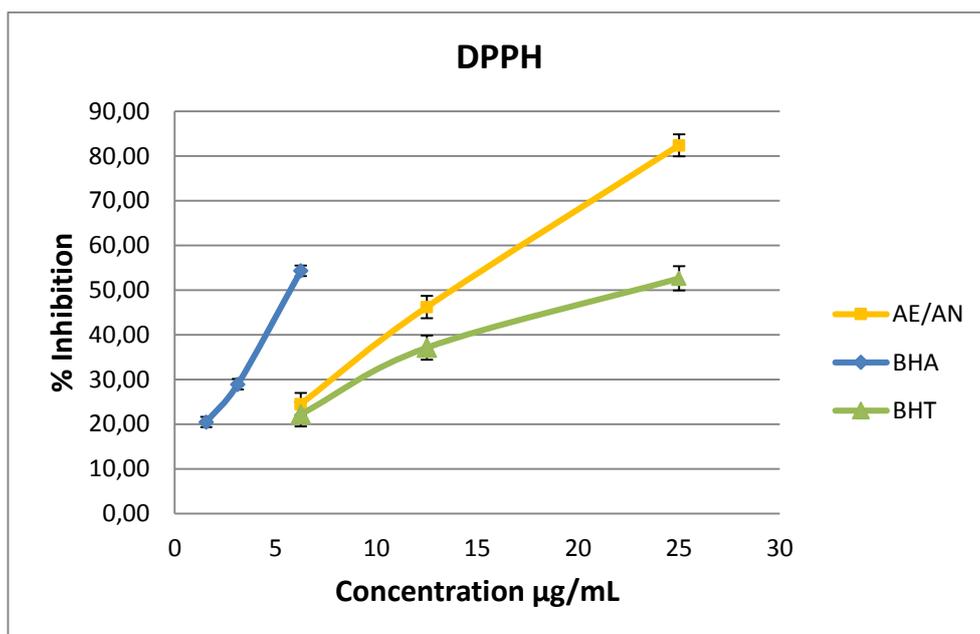


Figure 29: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de BHA, BHT et de la fraction acétonitril d'extrait d'éthyle acétate (AE/AN).

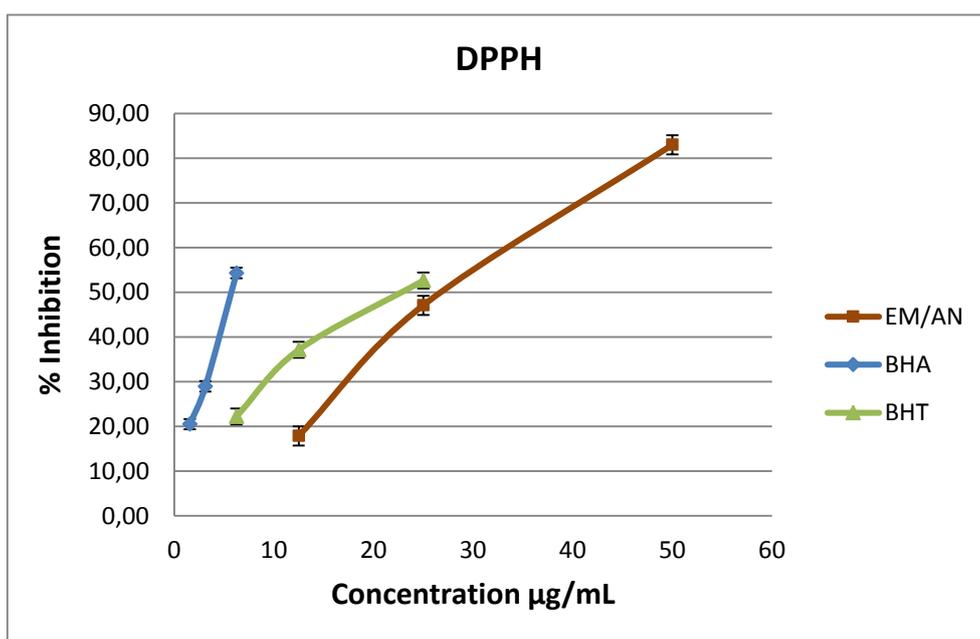


Figure 30: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de BHA, BHT et de la fraction d'extrait méthanolique d'olives (EM/AE).

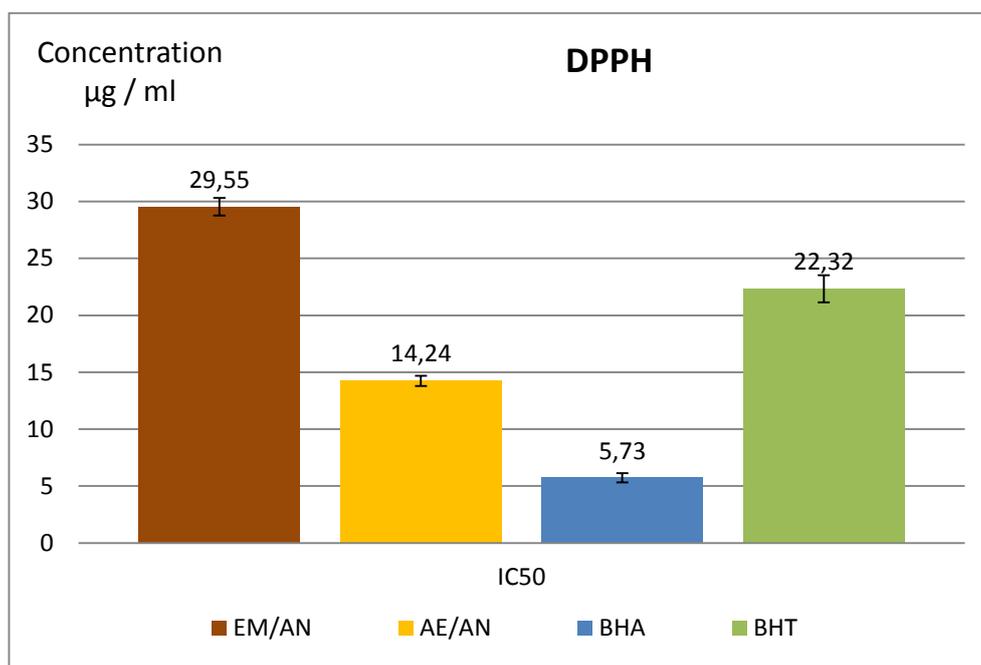


Figure 31: IC50 des fractions acétonitril des extraits d'éthyle acétate (AE/AN) et méthanolique (EM/AE) d'olives, BHA et de BHT.

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène. Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Molyneux, 2004); (Tsimogiannis, 2004). Quelques composés phénolique se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet *et al.*, 1997). De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité antioxydante, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'-4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (Amic *et al.*, 2003). L'effet scavenger des flavonoïdes sur les radicaux libres dépend de la présence des groupements OH libres, en particulier 3-OH, avec une configuration 3',4'-rthodihydroxy (Chahmi *et al.*, 2015).

Les polyphénols comme les flavonoïdes, l'hydroxytyrosol et l'oleupeiine contenus dans les fractions acetonitrile essentiellement de l'éthyl d'acétate sont probablement responsables de l'activité antioxydante. Comparativement à d'autres études, nos résultats concordent avec ceux obtenus par (Dekdouk *et al.*, 2015) sur différentes variétés d'olives.

2.2. Le pouvoir réducteur (Reducing Power Assay)

L'activité antioxydante des fractions acétonitrile des extraits méthanolique et de l'éthyle acétate d'olives étudiées a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP (Ferric reducing antioxidant power).

La capacité de l'extrait à donner un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} , Les chélateurs efficaces des ions ferreux peuvent fournir une protection contre le dommage oxydatif par la chélation de ces ions. Cette réaction se manifeste par l'apparition de la couleur bleu mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur (Gülçin *et al.*, 2010). En plus d'autres mécanismes antioxydants, la capacité de chélation des métaux est également employée comme indicateur de l'activité antioxydante (Shahidi et Zhong, 2015). La figure 32 et figure 33 représente le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, Tanin des fractions acétonitrile des de l'éthyl acetate et de l'extrait méthanolique d'olives à différentes concentrations.

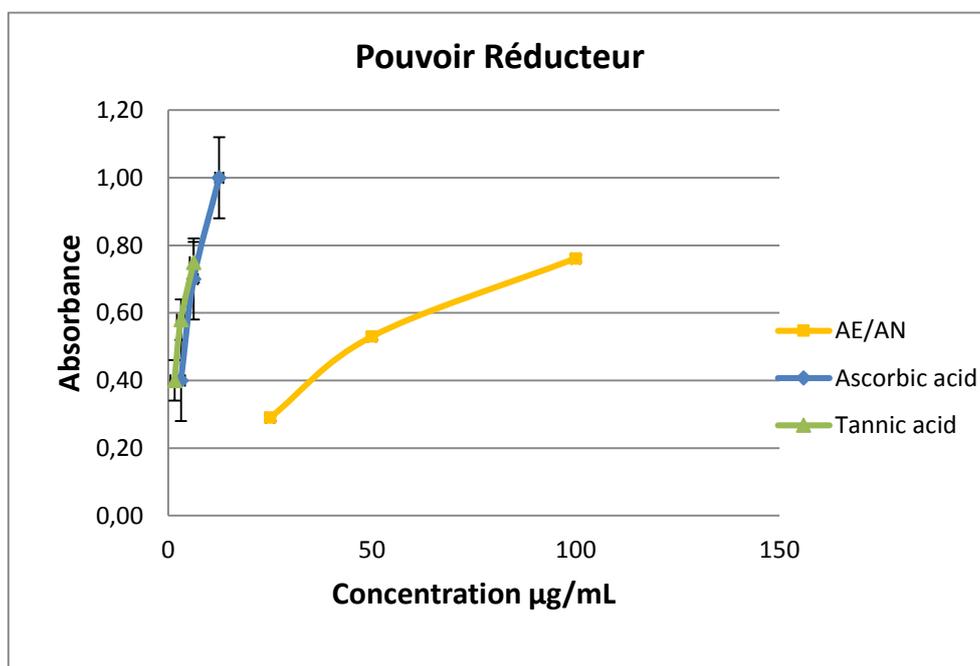


Figure 32: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, Tanin et de la fraction acétonitrile d'extrait de l'éthyle acétate d'olives (AE/AN)

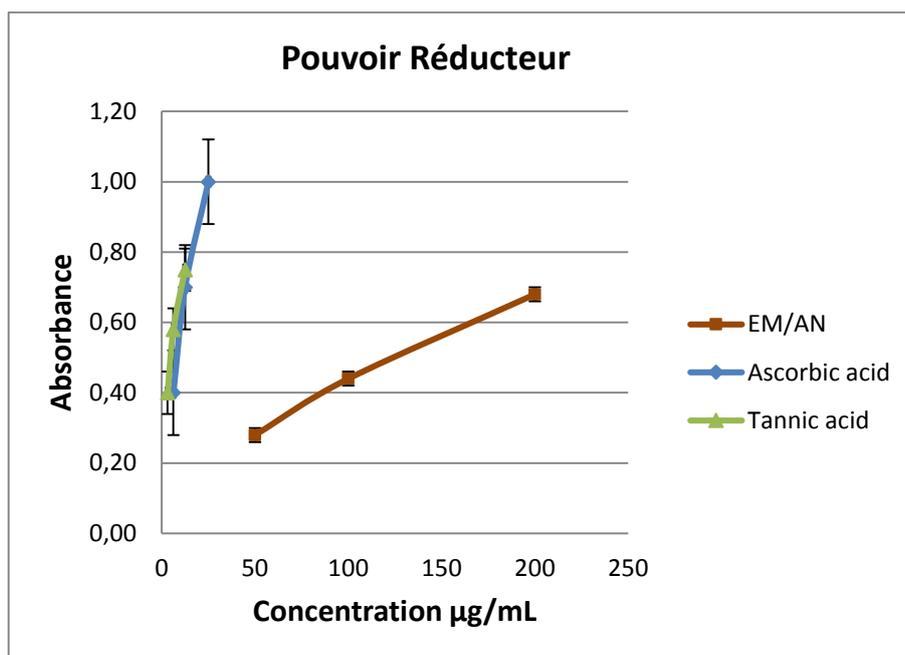


Figure 33: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, Tanin et de la fraction acetonitrile d'extrait méthanolique d'olives (EM/AN).

D'après nos résultats, nous avons remarqué chez les extraits testés l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées. A la concentration de 800µg/ml, le pouvoir réducteur de la fraction acetonitrile de l'extrait méthanolique est égale à $DO = 0,75 \pm 0,01$ et A la concentration de 800µg/ml le pouvoir réducteur de la fraction acétonitrile de l'éthyle acétate est égal à $DO = 0,83 \pm 0,02$. Selon les résultats enregistrés, la fraction acétonitrile de l'extrait de l'éthyle acétate est doté d'une capacité réductrice importante par rapport à la fraction acétonitrile de l'extrait méthanolique, leurs IC_{50} sont : 53,5; 129,84 respectivement mais relativement faible que celle de l'ascorbic acid et Tannic acid dont les valeurs sont de l'ordre de $6,77 \pm 1,15 \mu\text{g/mL}$ et $5,39 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$ respectivement (Figure 34).

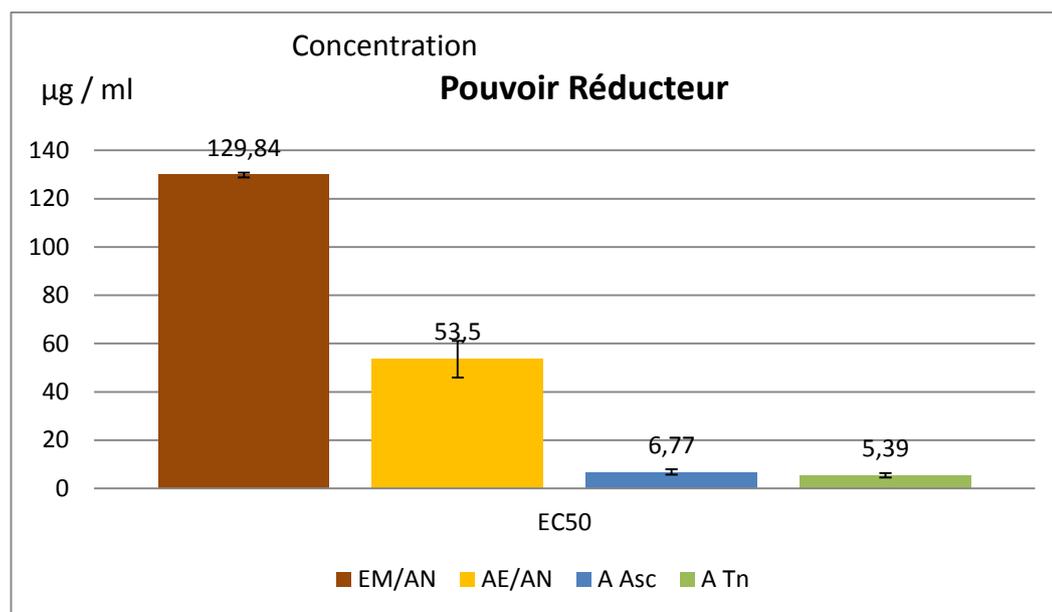


Figure 34: EC50 des fractions acétonitril des extraits d'éthyle acétate (AE/AN) et méthanolique (EM/AE) d'olives, Acide ascorbic (A Asc) et d'Acide tannic (A Tn).

Le pouvoir réducteur des fractions d'olives est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques essentiellement l'oleuropeine et l'hydroxytyrosol qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Ceccherelli P *et al.*, 1985). La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (Bougandora et Bendimerad, 2013).

Selon les travaux Ben Salah et son équipe (2012), l'olivier est une source important des composés phénoliques, comme l'oléuropeine qui possède une bonne activité antioxydante et un pouvoir réducteur fort. Comparativement à d'autres études, nos résultats concordent avec ceux obtenus par (Dekdouk *et al.*, 2015) sur des différentes variétés d'olives.

2.3. Test de CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity)

Cette méthode peut être utilisée pour la détermination de la capacité antioxydante des extraits sur le complexe Cu^{2+} -Neocuproine (Cu^{2+} -Nc) en tant que réactif oxydant chromogène. La densité de la couleur produite a une relation directe avec la concentration

de l'antioxydant. Ce procédé est capable de mesurer à la fois des antioxydants hydrophiles et hydrophobes.

Nos résultats ont montré que la fraction acétonitrile de l'extrait de l'éthyle acétate a une meilleure activité réductrice du CUPRAC ($10,06 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$) que celle la fraction acétonitrile de l'extrait méthanolique $29,83 \pm 0,91 \mu\text{g/ml}$, mais relativement faible que celle de BHA dont la valeur est de l'ordre de $3,64 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ (Figure 35).

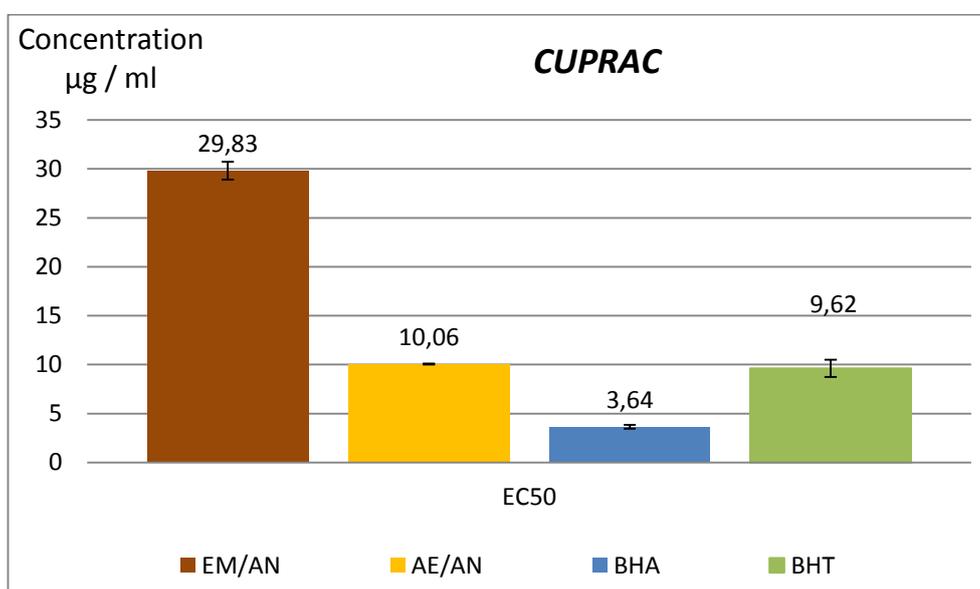


Figure 35: Réduction du CUPRAC par les fractions acétonitrile des extraits éthyle d'acétate et méthanolique d'olives, BHA et BHT

Dans la méthode CUPRAC, les réactions d'oxydation étaient essentiellement terminées en 30 min. Les glycosides de flavonoïdes ont nécessité une hydrolyse acide de leurs aglycones correspondants pour présenter pleinement leur activité antioxydante, par exemple la présence du groupe 5-hydroxy-4-céto dans les cycles A et C des flavonols, la double liaison 2,3 reliant les deux systèmes cycliques du flavonols par conjugaison (Apak *et al.*, 2007).

Ce réactif était utile à pH 7 proche du pH physiologique (Apak *et al.*, 2004), et l'absorbance du chélate de Cu (I) formé à la suite de la réaction redox avec les polyphénols réducteurs a été mesurée à 450 nm. La couleur était due au chélate NC-Cu (I) formé. Les

antioxydants à réaction lente ont nécessité une incubation à température élevée de manière à compléter leur oxydation avec le réactif CUPRAC (Apak *et al.*, 2004), (Apak *et al.*, 2005) ont correctement reconnu que les résultats de la mesure CUPRAC et polyphénols totaux étaient très corrélés. La faible corrélation observée par les auteurs entre les résultats CUPRAC et la teneur en flavonoïdes et était due à la nature de la technique de mesure (Apak *et al.*, 2006). La méthode est capable de mesurer des antioxydants de type thiol, tels que le glutathion et les thiols non protéiques, ne permettant pas de tester le test FRAP largement appliqué, qui ne répond pas aux antioxydants du groupe β SH (Huang *et al.*, 2005).

2.4. Activité Anti-inflammatoire

La dénaturation des protéines est une cause bien documentée de l'inflammation, dans le cadre de l'étude sur le mécanisme de l'activité anti-inflammatoire, la capacité de différente dénaturation de protéine du Bovine sérum albumine (BSA) de l'extrait des fruits. Le tableau montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits méthanolique et d'éthyle acétate d'olives qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation (Tableau 5).

Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA par les extraits

Concentration réel	fraction acetonitrile de l'extrait de methanol	fraction acetonitrile de l'extrait de l'ethyl acetate
5000 μ g/ml	na	19,15 \pm 11,66
2500 μ g/ml	na	na
1250 μ g/ml	na	na

Tableau 6 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA par le Diclofenac sodium

Concentration réel	% d'inhibition
250 μ g/ml	99,23 \pm 0,41
125 μ g/ml	76,87 \pm 1,24
62,5 μ g/ml	51,37 \pm 0,91
31,25 μ g/ml	34,11 \pm 0,50

Selon les résultats enregistrés, la fraction acétonitrile de l' extrait de l'éthyle acétate est doté une meilleure action inhibitrice (19,15%) de la dénaturation de BSA par rapport à la fraction acétonitrile de l' extrait de méthanolique d'une pourcentage (-2,30%) ,mais plus faible que celle de Diclofenac sodium (un anti-inflammatoire standard) qui a montré un effet inhibiteur maximale de (99,23%) à la concentration réelle de 250 µg/ml.

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Barros et al., 2008**) ; (**Bagad et al., 2011**). La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoire peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines (**Barros et al., 2008**) ; (**Mizushima et al., 1968**).

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phenylbutazone et l'indomethazine n'inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (**Sangeetha et al 2011**). Ils empêchent la dénaturation d'albumine traitée par la chaleur à pH physiologique.

D'après les résultats, on ne constate que fraction acetonitrile de l' extrait de l'éthyle acétate capable de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les tannins, hydroxytyrosol dans les extraits trouvés lors des criblages phytochimiques.

Conclusion

Conclusion

La médecine traditionnelle est largement répandue et tient une place majeure dans le traitement du stress oxydant pathologique. Notre travail porte sur l'étude de l'espèce *Olea europaea*, qui appartient à la famille des Oleaceae. C'est l'une des familles les plus importantes dans la région méditerranéenne, et le plus utilisé dans la médecine traditionnelle. Nous avons réalisé cette étude à partir d'olives. L'étude de l'activité antioxydante des extraits selon la méthode du radical libre DPPH a montré que l'extrait d'éthyle acétate possède une activité antioxydante importante dont la valeur d'IC50 est 14,24µg/ml. D'autre part, l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer a montré que l'extrait d'éthyle acétate possède un pouvoir réducteur élevé (53.5 µg/ml). Nous avons également évalué l'activité réductrice du Cuprac et l'effet anti-inflammatoire *in vitro*. Cette étude a permis de démontrer une meilleure activité réductrice du Cuprac (10,06 µg/ml) et une action anti-inflammatoire de l'extrait de l'éthyle acétate. Les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de fruits d'*Olea europaea* seraient liées à la présence de composés phénoliques : l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine et les flavonoïdes. En conséquence, des expériences ultérieures utilisant des fractions riches en hydroxytyrosol et /ou en oleuropeine sont envisagées pour confirmer cette hypothèse et comprendre le mécanisme d'action des principes actifs d'olives.

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....1

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : STRESS OXYDANT ET ANTIOXYDANTS

1. Stress oxydant et Antioxydants.....4

1.1. Définition du stress oxydant.....4

1.2. Les espèces réactives d'oxygène(EAO).....4

1.2.1. Les dérivés d'oxygène radicalaire.....4

➤ Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....4

➤ Radical hydroxyle (HO^{\cdot}).....4

1.2.2. Les dérivés d'oxygène non radicalaire.....5

➤ Oxygène singulet (1O_2).....5

➤ Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....5

➤ Hypochlorite ($HOCl$) et inflammation.....5

1.2.3. Les espèces réactives d'azote6

➤ Nitric oxyde (NO^{\cdot})6

➤ Peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$).....6

1.2.4. Autres formes

radicalaires.....6

1.3. Les sources des radicaux libres.....7

1.3.1. La chaîne respiratoire de mitochondries7

1.3.2. Les oxydases	8
➤ Les NADPH oxydases (NOX).....	8
➤ La Xanthine oxydase (XO).....	8
➤ Les enzymes monoamine oxydases.....	9
1.3.3. L'inflammation	10
1.3.4. Pro-oxydants environnementaux.....	11
1.4. Rôle physiologique des espèces réactives.....	12
1.5. Principales cibles biologique de stress oxydant.....	12
➤ Les lipides.....	12
➤ L'ADN.....	14
➤ Les protéines.....	15
➤ Les Glucides.....	16
1.6. Rôle pathologique du stress oxydant.....	16
1.7. Les antioxydants.....	18
1.7.1. Les systèmes enzymatiques antioxydants.....	18
a. Superoxyde dismutase (SOD).....	18
b. Les catalases (CAT).....	19
c. Le cycle d'oxydoréduction du glutathion.....	19
d. L'hème oxygénase.....	21
e. La biliverdine réductase.....	21
1.7.2. Les systèmes non enzymatiques antioxydants.....	21
1.7.2.1. Les antioxydants endogènes.....	21
a. Le glutathion (GSH).....	21
b. L'acide urique.....	22
c. Acide lipoïque.....	22

g. le thiorédoxine (TRX).....	22
1.7.2.2. Les antioxydants exogènes.....	23
1.7.2.2.1. Les antioxydants naturels.....	23
➤ Les vitamines C et E.....	23
➤ Les oligo-éléments.....	24
➤ Caroténoïdes.....	24
➤ Polyphénols.....	25

CHAPITRE 2 : *Olea europaea* et activités biologiques

2. <i>Olea europaea</i> et activités biologiques	26
2.1. Description botanique	26
2.2 . Cultivation.....	27
2.3. Caractérisation et Composition d'olive.....	28
2.4. Composition phénolique.....	29
2.4.1. Généralités sur les composés phénoliques.....	29
2.4.1.1. Définition.....	29
2.4.1.2. Structure des composés phénoliques.....	29
2.4.1.3. Mécanisme d'action des composés phénoliques.....	31
2.4.1.4. <i>Olea europaea</i> et composés phénoliques.....	33
2.4.2.1. Constituants des fruits, graine, pulpe	33
2.5. Usages d' <i>Olea europaea</i>	35
2.6. Activités biologiques	37
2.6.1. Activité antidiabétique	37
2.6.2. Activité anticancéreuse	37
2.6.3. Activités antimicrobiennes	37
2.6.4. Activités antihypertenseurs et cardioprotectives	38
2.6.5. Activités anti-inflammatoires et antinociceptives	38
2.6.6. Activité antioxydante	38

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

1. Matériel et Méthodes	40
1.1. Matériel	40
1.1.1. Matériel végétal.....	40
1.1.2. Produits chimiques	40
1.1.3. Appareillage	41
1.2. Méthodes	41
1.2.1. Extraction	41
1.2.1.1. La préparation d'extrait méthanolique (EM).....	41
1.2.1.2. La préparation d'extrait d'acétate éthyle (AE)	42
1.2.2. Fractionnement des extraits (EM) et (AE)	42
1.3. Activité anti-oxydante <i>in vitro</i>	43
1.3.1. Effet scavenger du radical DPPH	43
1.3.2. Test du pouvoir réducteur (Reducing Power Assay)	45
1.3.3. Test de CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity).....	46
1.4. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	47
1.5. Analyse statistique	48
2. Resultats et discusion	49
2.1. Evaluation de l'activité antioxydante par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH).....	49
2.2. Le pouvoir réducteur (Reducing Power Assay)	52
2.3. Test de CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity).....	54
2.4. Activité Anti-inflammatoire	56
Conclusion	58

Résumé

Références bibliographiques

Liste des abréviations

¹O₂	Oxygène singulet
³O₂	Oxygène triplet
4- HNE	4-hydroxynonanal
A Tn	Acide Tannic
A.Asc	Acide Ascorbique
ABS	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
AE	Extrait d'olive petite forme d'éthyle acétate
AE/AN	Extrait d'olive petite forme d'éthyle acétate fraction d'Acétonitrile
AGE	Glycation avancé
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdienne
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdienne
AP-1	Activateur protein-1
ATP	Adénosine Triphosphate
BHA	Hydroxyanisole butylé
BHT	Hydroxytoluene butylé
BSA	Bovine serum albumin biochemical grade
C	Carbon
C.R.Bt	Centre de Recherche en Biotechnologie
°C	Degré celsius
CAT	Catalases
CI50	Concentration inhibitrice à 50%.
COX	Cyclo-oxygénase

COX 2 : Cyclo-oxygénase type 2.

Cu : Cuivre

Cu / Zn-SOD : Superoxyde dismutase de cuivre et de zinc

CUPRAC : Cupric reducing antioxidant capacity

Cys : Cystéine

DO : Densité optique

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

EC50 : Concentration effectrice à 50%

EM : Extrait méthanolique

EM/AN : Extrait d'olive petite forme méthanolique fraction d'Acétonitrile

ENA : Espèce Actif d'azote

EOA : Espèces réactives de l'oxygène

EtOH : Ethanol

EVOO : Huile d'olive extra vierge

FAD : Flavonyl

FCR : Folin-Ciocalteu réactif

Fe : Fer

FeCl₃ : Chlorure de fer

Fe-SOD : Superoxyde dismutase de fer

GC : Glucocorticoïdes

Gly : Glycine

GPX : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion

GSSG : Glutathion réduit

GST : Glutathion S-transférase

H+ : Proton

H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HO :	Hème oxygénase
HO• :	Radical hydroxyle
HOCL :	Hypochlorite
HSF-1 :	Facteur de choc thermique
HSP :	Protéine de choc thermique
I% :	Pourcentage d'inhibition
LDL :	Lipoprotéine de faible densité
M :	Métal
MAO :	Monoamine Oxydases
MCF-7 :	Adinocarcinome du sein humain
MDA :	Malonaldéhyde
MeOH :	Méthanol
Mn :	Manganèse
Mn-SOD :	Superoxyde dismutase de manganèse
Na :	No absorbance
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné
Nc :	Neocupronin
Ni-SOD :	Superoxyde dismutase de nickel
NO :	Nitrique oxyde
NO• :	Dioxyde d'azote
NOS :	Nitriques oxydes synthèses
NOX :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné oxydase
O₂•- :	Radical superoxyde (anion superoxyde)
ONOO• :	Peroxynitrite
ONOOH :	Nitroperoxyde

PGE2 :	Prostaglandines E2
PGI2 :	Prostacycline
PH :	Potentiel d'Hydrogène
Pro :	Protéine
R² :	Corrélation
RO₂'- :	Radical peroxy
SD :	Standard deviation.
Se :	Sélénium
SH :	Sulfhydrile
SOD :	Super Oxyde Dismutase.
TBARS :	Thiobarbituriques acides
TCA :	Tri-chloro acetic acide
TRX :	Thiorédoxine
UV :	Ultra-violet
Vit :	Vitamine
XDH :	Xanthine déshydrogénase
XO :	Xanthine oxydase
Zn :	Zinc

Liste des figures

Figure 1 : Formation d'HO· Après la réaction de fenton et d'hyper-Weiss.....	4
Figure2 : La mitochondrie système producteur d'O ₂ ⁻	8
Figure 3 : Le métabolisme des purines par XO.....	9
Figure 4 : Les monoamines oxydases et la production de H ₂ O ₂	10
Figure 5 : Production d'oxydants par le phagocyte activé.....	11
Figure 6 : Formation les ROS par le rayonnement électromagnétique.....	11
Figure 7 : Peroxydation lipidique induite par le radical HO·	13
Figure 8 : Mécanisme de l'autoxydation des acides gras par l'oxygène triplet et l'oxygène singulet.....	14
Figure 9 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	15
Figure 10 : différent pathologie causée par les ROS.....	17
Figure 11 : Les formes différentes de SOD.....	19
Figure 12 : Cycle de recyclage du Glutathion.....	20
Figure 13 :L'implication du GST dans la réaction de S-glutathionylation.....	22
Figure14 :L'effet antioxydant des vitamines.....	24
Figure 15 : <i>Olea europaea</i> L.....	26
Figure 16 : Distribution géographique	28
Figure 17 : Coupe transversale de l'olive	28
Figure 18 : Structure chimique des flavonoïdes	30
Figure 19 :Mécanisme d'action antioxydante d'un cathecal	31
Figure 20 : Mécanisme d'action antioxydante d'aminophenol	31
Figure 21 : Mécanisme d'action antioxydante d'hydroquinone	32
Figure 22 : Mécanisme d'action antioxydante de 4-aminophenol	32
Figure 23 : Structure chimique de l'oleupeine et l'hydroxytyrosol....	34

Figure 24 : Fruits d' <i>Olea europaea</i> fraiche (A) et lyophilisée (B).....	40
Figure 25: Préparation d'extrait méthanolique (EM)	41
Figure 26: Préparation d'extrait d'acétate éthyle (AE)	42
Figure 27: Fractionnement des extraits (EM) et (AE) = (EM/AN) (AE/AN)	43
Figure 28: Réaction de DPPH.....	44
Figure 29 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de BHA, BHT et de la fraction acétonitril d'extrait d'éthyle acétate(AE/AN).....	50
Figure 30 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de BHA, BHT et de la fraction d'extrait méthanolique d'olives (EM/AE).....	50
Figure 31: IC50 des fractions acétonitril des extraits d'éthyle acétate (AE/AN) et méthanolique (EM/AE) d'olives, BHA et de BHT.....	51
Figure 32: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, Tanin et de la fraction acétonitrile d'extrait de l'éthyle acétate d'olives (AE/AN).....	52
Figure 33: Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique,Tanin et de la fraction acetonitrile d'extrait methanolique d'olives (EM/AN).....	53
Figure 34: EC50 des fractions acétonitril des extraits d'éthyle acétate (AE/AN) et méthanolique (EM/AE) d'olives, Acide ascorbic (A Asc) et d'Acide tannic (A Tn).....	54
Figure 35: Réduction du CUPRAC par les fractions acétonitrile des extraits éthyle d'acétate et méthanolique d'olives, BHA et BHT	55

Liste des tableaux

Tableau 1: Relation entre les maladies et le stress oxydant.....	17
Tableau 2 : Structure et classe des composés phénoliques	30
Tableau 3 : Constituants du fruit d'olivier	34
Tableau 4: Utilisation d' <i>Olea europaea</i> dans la médecine traditionnelle	35
Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA par les extraits....	56
Tableau 6 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA par le Diclofenac sodium.....	56

Introduction

Partie I

Etude bibliographique

Chapitre 1 :
Stress oxydant et
Antioxydants

EHP

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre 1 :
Matériel et Méthodes

Chapitre 2 :
Résultats et discussions

Conclusion

Résumé

Références bibliographique

المخلص

إن الهدف الرئيس لهذا البحث تمثل في تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة *in vitro* للمستخلص الميثانولي وإثيل أسيتات ثمار *Olea europaea*. لتقدير الأنشطة المضادة للأكسدة أنجزت أربع اختبارات متكاملة والمتمثلة في اختبار DPPH ، وتفاعل ارجاع الحديد والنحاس ، وكذا النشاط المضاد للالتهاب *in vitro*. مقارنة مع المستخلص الميثانولي للزيتون ، كشفت النتائج بأن مستخلص إيثيل أسيتات الزيتون يحظى بأكبر نشاط مضاد للأكسدة حيث قدرت IC50 بقيمة / 14,24 µg ml وأثر ارجاعي مرتفع لكل من الحديد (53,5 µg / ml) والنحاس (10,06 µg/ml) ونشاط مضاد للالتهاب. لقد أوضحت النتائج بأن ثمار *Olea europaea* يمكن أن تكون مصدر جيد للمركبات الفينولية الطبيعية خاصة hydroxytyrosol و oleuropéine القابلة للاستعمال وذلك للوقاية من الأمراض المحرصة بالجذور الحرة.

الكلمات المفتاحية

Olea europaea، الزيتون، الجذور الحرة، DPPH، القدرة الإرجاعية، CUPRAC، المركبات الفينولية.

Résumé

L'objectif principal du présent travail était d'évaluer les activités antioxydantes *in vitro* des extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle des olives, fruits d'*Olea europaea*. Pour mesurer leurs activités antioxydantes, quatre dosages complémentaires ont été réalisés: DPPH, Réduction Power Assay, CUPRAC et l'activité anti-inflammatoire *in vitro*. Comparé à l'extrait méthanolique les résultats ont révélé que l'extrait d'olives d'acétate d'éthyle possède une activité antioxydante significative, la valeur IC50 est de 14,24 µg / ml, un bon pouvoir réducteur du fer (53,5 µg / ml), une activité réductrice du Cuprac (10,06 µg/ml) et un effet anti-inflammatoire. Les résultats démontrent que les extraits de fruits d'*Olea europaea* peuvent représenter un potentiel important des composés phénoliques comme l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine qui seraient utiles dans la prévention des maladies dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués.

Mots clés

Olea europaea, olives, Radicaux libres, DPPH, Reducing Power, CUPRAC, composés phénoliques.

Abstract

The main aim of the present work was to evaluate the *in vitro* antioxidant activities of two extracts of olives, fruits from *Olea europaea*. Four complementary assays were used to measure their antioxidant activities DPPH, Reducing Power Assay, CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity and anti-inflammatory activity *in vitro* .Compared with methanolic extract of olives ,the results revealed that the ethyl acetate extract has a significant antioxidant activity , IC50 value is (14.24 $\mu\text{g} / \text{ml}$) , a good reducing power of iron (53.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$), a reducing activity of Cuprac (10.06 $\mu\text{g}/ \text{ml}$) and an anti-inflammatory effect *in vitro* .Results demonstrated that *Olea europaea* fruit extracts can represent an important potential of phenolic compounds as hydroxytyrosol and Oleuropein which would be useful in the prevention of diseases in which free radicals are implicated .

Key words:

Olea europaea, olives, Free radicals, DPPH, Reducing Power, CUPRAC, phenolic compounds

Références bibliographique

A

- Adnan M., Baby R., Mussarat S., Tariq A., Shinwari Z K. (2014).** Ethnomedicinal and phytochemical review of Pakistani medicinal plants used as antibacterial agents against *Escherichia coli*. *Annal of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. (13):1-40.
- Amlan K Patra., Jyotisna Saxena. (2010).** A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. 71(11–12) : 1198-1222.
- Amel B. (2013).** Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District. *Journal Of Pharmacognosy And Phytotherapy*, (5) :12-20.
- Al-Azzawie H F., Alhamdani M-S S. (2006).** Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Science*, (78):1371-1377.
- Alagna F., Mariotti R., Panara F., et al., (2012).** Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biology*, (12): 162.
- Ali-Shtayeha., Rana M. Jamousa., Rania M. Mohammed S. Jamous. (2012).** Complementary and alternative medicine use amongst Palestinian diabetic patients. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, (18) : 16-21.
- Andreadou I., Iliodromitis E K., Mikros E., Constantinou M., Agalias A., Magiatis P., Skaltsounis A L., Kamber E., Tsantili-Kakoulidou A., Kremastinos D T. (2006).** The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J Nutr* (136): 2213-9.
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Karademir S E. (2004).** Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52) : 7970-7981.
- Aprioku Jonah Sydney. (2013).** Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. *J Reprod Infertil*, 14(4): 158–172.
- Astier Jeremy., Inonge Gross., Jörg Durner. (2017).** Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany*.

B

- Bekkara F., Jay M., Viricel M R., Rome S. (1998).** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil*. 203(1) : 27-36.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99 (1): 191–203.
- Barouki Robert. (2006).** Stress oxydant et vieillissement *.MEDECINE/SCIENCES*. (22) : 266-72. Article disponible sur le site <http://www.medecinesciences.org> ou <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/2006223266>.
- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G. (1998).** Olive germplasm: Cultivars and world-wide collections. *FAO Library*. Rome, Italy.
- Basım E., Basım H., Abdulai M., Baki D., Oztürk N. (2017).** Identification and characterization of *Alternaria alternata* causing leaf spot of olive tree (*Olea europaea*) in Turkey. *Crop Protection*. (92) : 79-88.
- Beauchamp G K., Keast R S., Morel D., Lin J., Pika J., Han Q., Lee C H., Smith A B., Breslin P A. (2005).** Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*. 1;437(7055):45-6.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., et al. (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*. (68): 457-62.
- Bennamara Fatima zahra. (2017).** stress oxydant Et pathologies humaines. *Thèse Université Mohammed V-Rabat*, Faculté De Médecine Et De Pharmacie-Rabat.
- Bianco A., Buiarelli F., Cartoni G. P., Coccioli F., Jasionowska R., Margherita P. (2003).** Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I. *Journal of Separation Science*.(26) :409–416.
- Bianco A., Buiarelli F., Cartoni G P., Coccioli F., Jasionowska R., Margherita P. (2003).** Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of

biophenolic compounds in virgin olive oil, Part II. *Journal of Separation Science*. (26) :417–424.

Blandine G. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisodine. hal archive ouverte. *These pour obtenir le grade de docteur de l'université Joseph Fourier*.

Blois M S. (1958). Antioxydant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.

Bougandora., Bendimerad. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq.* *Nature & Technologie .B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. (9) : 14 -19.

Brand-Williams W., Cuvelier M E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 28 (1) : 25-30

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie - Phytochimie – Plantes médicinales. 3e édition. Ed. *Technique & Documentation*, Paris.

Briones Ana M., Touyz Rhian M. (2010). Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. *Curr Hypertens Rep*. (12):135–142.

Burits M., Bucar F. (2000). Antioxydant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. (14). 323-328.

C

Cadet Jean., Douki Thierry., Gasparutto Didier., Ravanat Jean-Luc. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research*. (531) :5–23.

Casaburi I., Puoci F., Chimento A., et al. (2013). Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of *in vitro* studies. *Molecular Nutrition & Food Research*. (57) :71-83.

Cheriti Abdelkrim., Rahmani Smahia., Belboukhari Nasser., et al. (2016). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei* (PLUMBAGINACEA). *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*. 6(1) : 80-86.

Christian K Roberts., Kunal K Sindhu. (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences.* (84) :705–712.

Chiappetta Adriana., Mutoa Antonella., Muzzalupo Rita., Innocenzo Muzzalupo. (2017). New rapid procedure for genetic characterization of Italian wild olive (*Olea europaea*) and traceability of virgin olive oils by means of SSR markers. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.022>. *Scientia Horticulturae.* (226):42–49.

Cillard Josiane., Cillard Pierre. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations ; Article disponible sur le site <http://www.ocl-journal.org> ou <http://dx.doi.org/10.1051/ocl.2006.6666>. 13 (1) :24-29 .janvier-février.

Cioffi G., Pesca M.S., Caprarits B.A., Severino L., De Tmmasi N. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry.* (121) :105-111.

Claude M-M., Françoise D. (2007). Herbar méditerranéen. Paris, P : 9.

Combrinck S., Du Plooy G W., R. I. (2007). McCR INDLE and B. M. BOTHA. Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of Botany.* (99): 1111–1119.

Corona G., Spencer J P E., Dessì MA. (2009). Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicology and Industrial Health.* (25): 285–293.

Covas M I. (2007). Olive oil and the cardiovascular system (Review). *Pharmacol Res.* (55): 175-86.

Cuendet M; Hostettmann K., Potterat O. (1997). Iridoidglucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta.*(80), 1144-1152.

D

Damien Maggiorani., Nicola Manzella., Dale E Edmondson., Andrea Mattevi., Angelo Parini., Claudia Binda., Jeanne Mialet-Perez. (2017). Monoamine Oxidases, Oxidative Stress, and Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Ageing. *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* (8) :3017947.

Daniel Tietze., corresponding., Jana Sartorius., Banabithi Koley Seth., Kevin Herr., Pascal Heimer., Diana Imhof., Doreen Mollenhauer., Gerd Buntkowsky. (2017).

New insights into the mechanism of nickel superoxide degradation from studies of model peptides. *Sci Rep.* (7): 17194.

Defraigne J O., Pincemail J. (2008). Stress oxydant et antioxydant : mythes et réalité. *Rev Med Liège.* (63) :10-19.

Dekdouk Nadia., Malafronte Nicola., Russo Daniela., Faraone Immacolata., Nunziatina De Tommasi., Ameddah Souad., Severino Lorella., Milella Luigi. (2015). Phenolic Compounds from *Olea europaea* L. Possess Antioxidant Activity and Inhibit Carbohydrate Metabolizing Enzymes *In Vitro.* (9).

Descamps E., Gelé P., Bordet R., Vamecq J. (2006). Modulation pharmacologique du stress oxydatif Pharmacological control of oxidative stress. *La Lettre du Pharmacologue.* (20) : 4.

Duquesnoy Emilie., Castola Vincent., Casanova Joseph. (2007) Triterpenes in the hexane extract of leaves of *Olea europaea* L.: analysis using ¹³C-NMR spectroscopy. *Phytochemical Analysis.* (18):347-353.

E

Elmouloud B. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. *Thèse de doctorat. universite badji mokhtar –annaba.*

F

Favier Alain. (2003). Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique *.l'actualité chimique.*108-115.

Favier Alain. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr.* (64) : 390-396.

Feo V., Senatore F. (1993). Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan Coast, Salerno Province, Campania, Southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology.* (39):39–51.

Flemmig J., Kuchta K., Arnhold J., Rauwald H W. (2011). Olea europaea leaf (Ph.Eur) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase. *Phytomedicine*. (18) :561-566.

Fujita T., Sezik E., Tabata M., et al. (1995). Traditional medicine in Turkey VII. Folk Medicine in middle and west Black Sea regions. *Economic Botany*. (49) :406-422.

G

Ganino T., Bartolini G., Fabbri A. (2006). The classification of olive germplasm. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 81 (3) 319–334.

Gastaldo P. (1974). Official compendium of the Italian flora. XVI. *Fitoterapia*. (45):199–217.

Ghanbari R., Anwar F., Alkharfy KM., Gilani AH., Saari N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) – A Review. *Int. J. Mol. Sci.* (13): 3291–3340.

Ghazanfar S A., Al-Al-Sabahi A M. (1993). Medicinal plants of Northern and Central Oman (Arabia). *Economic Botany*. (47) :89-98.

Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. (4): 162-169.

Ghedira K, 2008. L’olivier, *Phytothérapie*. (6): 83–89.

Gheffour K., Boucherit k., Boucherit-Otmani Z. (2015). Etude phytochimique et évaluation de l’activité antioxydante des extraits d’Echinops spinosus. *Phytothérapie*. (13) : 288-294.

Grandos–Principal S., Quiles J L., Ramirez-Tortosa C L., Sanchez-Rovira P., Ramirez-Tortosa M C. (2010). Hydroxytyrosol : from laboratory investigations to future clinical trials. Pub Med.gov. *Nutrition Reviews*. (68) : 191-206.

Greathead H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *62(2):279-90*.

Grek Christina L., Zhang Jie., Yefim Manevich., Danyelle M Townsend., Kenneth D Tew. (2013). Causes and Consequences of Cysteine S-Glutathionylation. *J Biol Chem*. 13 :288(37): 26497–26504.

Grohmann F. (1981). Oleaceae. *Flora of Pakista.* (59) :9.

Guerin J., Reveillere H. (1985). *Annales Pharmaceutiques Françaises.* Paris. France :
Masson Editeur. 77-81.

H

Haloui Ehsen., Marzouka Belsem., Marzouk Zohra., Fenina Nadia., Bouraoui Mahjoub., Aouni Abderrahman. (2010). Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *Journal of Ethnopharmacology*, 128 : 15–19.

Hans W., Kothe. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. *Edition Toulouse*, P: 221.

Hawkins C L., Pattison D I., Davies M. J. (2003). Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins ; The Heart Research Institute, Free Radical Group, Camperdown, Sydney, Australia ; *Springer-Verlag* ; *Amino Acids* 25: 259–274.

Hun-Taeg Chung., Stefan W Ryter., Hong Pyo Kim (2013). Heme Oxygenase-1 as a Novel Metabolic Player ; *Oxid Med Cell Longev*, 814058.

I

Ighodaro O M., Akinloye O A. (2017). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid ; *Alexandria Journal of Medicine*.

Iuchi Yoshihito. (2012). Anemia Caused by Oxidative Stress, Anemia, Dr. Donald Silverberg (Ed.), ISBN: 978- 953-51-0138-3, InTech, Available from:
<http://www.intechopen.com/books/anemia/anemia-caused-byoxidative-stress>.

J

Jahaun Azadmanesh., Gloria E O., Borgstahl. (2018). A Review of the Catalytic Mechanism of Human Manganese Superoxide Dismutase ; *Antioxidants* 7, 25; doi:10.3390/antiox7020025.

Jayanthi, P., Lalitha P. (2011). Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Int J Pharm Pharm Sci.* 3 (3): 126-128.

Jemai H., Fki A E L., Sayadi S. (2009). Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57 :8798-8804.

Jerman, T., Trebse P., Vodopivec BM. (2010). Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry*, 123 :175-182.

Jiawen Fan., Gezhi Xu., Tingting Jiang., Yaowu Qin. (2012). Pharmacologic Induction of Heme Oxygenase-1 Plays a Protective Role in Diabetic Retinopathy in Rats ; *IOVS*, (53) : 10.

Juan M E., Wenzel U., Daniel H., Planas J M. (2008). Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells *Molecular. Nutrition and food Research*, 52: 595-599.

K

Kamra D N., Agarwal N., Chaudhary L C. (2006). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compound. *Int. Congr. Ser*, 1293:156-163.

Kanakis P., Termentzi A., Michel T., Gikas E., Halabalaki M., Skaltsounis A-L. (2013). From olive drupes to olive Oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Medica*, 79 :1576–1587.

Kandikattu K., Bharat Ratna Kumar., et al. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by in-vitro method 1(5) : 729-730.

Kergeta M., Kotnika P., Hadolinb M., et al. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*, 89(2): 191-8.

Khan M Y., Panchal S., Vyas N., et al. (2007). *Olea europaea*. *Phyto-Pharmacol Review* 1(1):114-8.

Ko K-W., Kang H J., Lee B Y. (2009). Antioxidant, Antimicrobial, and Antiproliferative activities of olive (*Olea europaea L*) Leaf extracts. *Food Science and Biotechnology*, 18 : 818-821.

Koechlin-Ramonatxo Christelle. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 :165–177.

Kohen Ron., Nyska Abraham. (2002). Oxydation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quanti.

Kpéra G N., Mensah G A., Sinsin B. (2004). Utilisation des produits et sous-produits de crocodile en médecine traditionnelle au nord du Bénin. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin*, 44 : 1-12.

L

Lawrendiadis G. (1961). Contribution to the knowledge of the medicinal plants of Greece. *Planta Medica*. 9 :164-169.

Le K., Chiu F., Ng K., (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353-363.

Le Tutour B., Guedon D. (1992). Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compound. *Phytochemistry*, 31 :1173-1178.

Lomri. Abderrahim. (2008). Role of reactive oxygen species and superoxide dismutase in cartilage aging and pathology. *Future Rheumatol*, 3(4). 381-392.

Lipshitz Nili., Gophna Ram., Hartmana Moshe., Gideon Biger. (1991). The Beginning of Olive (*Olea europaea*) Cultivation in the Old World. *A Reassessment. Journui of Archaeological Science*, (8)441-453.

Liu J., Jia L., Kan J., Jin C-h. (2013). In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology* ,51 : 310–316.

Luciana L., Mensor Fábio S., Menezes Gilda G., Leitão Alexandre S., Reis Tereza C., dos Santos Cintia S., Coube Suzana G., Leitão. (2001). Screening of Brazilian

plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 15(2) : 127-130.

M

Medina E., Romero C., de Los Santos B., et al. (2011). Antimicrobial Activity of Olive Solutions from Stored Alpeorujo against Plant Pathogenic Microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 :6927-6932.

Médail F., Quézel P., Besnard G., Khadari B., Systematics. (2001). ecology and phylogeographic significance of *Olea europaea* L. subsp. *maroccana* (Greuter & Burdet) P. Vargas et al., a relictual olive tree in south-west Morocco. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 137:249–266.

Michel F., Bonnefont-Rousselot D., Mas E., Drai J., Thérond P. (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin*, 66 (6) : 605-20.

Morena M., Martin-Mateo M., Cristol J-P., Canaud B. (2002). Stress oxydant, Hemo-incompatibilité et complication de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, 23 :201-208.

Migdal Camille., Serres Mireille. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant Reactive oxygen species and oxidative stress. *Med Sci (Paris)*, 27 : 405–412.

N

Nadour M., Michaud P., Moulti-Mati F. (2012). Antioxydants activities of polyphenols extracted from olive (*Olea europaea*) of chemlal variety. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167 :1802-1810.

Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goff L., Had-Aissouni L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale; *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 502–509.

- Niaounakis M., Halvadakis C P. (2006).** Olive processing waste management literature review and patent survey. *Waste management series*, 5 (2) Elsevier.
- Noori S. (2012).** An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. Muhammad Bin Qasim Medical & Dental College, Karachi, Pakistan .*Open Access Scientific Reports*.
- Nur Alam., Nusrat Jahan Bristi., Rafiquzzaman. (2013).** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143–152.

O

- Obied H K. (2013).** Biography of biophenols : past, present and future. *Functional Food in Health and Disease*, 3 :230-241.
- Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44 : 307–315.
- Ordoudi S A., Tsimidou M Z., Vafiadis A P., BakalBassis E G. (2006).** Structure-DPPH. Scavenging activity relationships: parallel study of catechol and guaiacol acid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5763–5768.
- Oroian Mircea., Escribe Isabel. (2015).** Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis ; *Food Research International* 74 :10–36.

P

- Pacher Pál., Beckman Joseph S., et Lucas liaudet. (2007).** Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease, Published in final edited form as: *Physiol Rev*, 87(1): 315–424.
- Paiva-Martins F., Fernandes J., Rocha S., et al. (2009).** Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 :609-616.
- Park Sun Young., Youm Ji Hyun., Jung Kyoung Chul., Uy Dong Sohn. (2008).** Department of Pharmacology, College of Pharmacy, University of Chung-Ang, Seoul 156-756, Korea. *Arch Pharm Res*, 31(12) : 1552-1558.

Pascual-Ahuir Amparo., Manzanares-Estreder Sara., Proft Markus. (2017). Pro- and Antioxidant Functions of the Peroxisome-Mitochondria Connection and Its Impact on Aging and Disease ; *Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, P : 17.

Peralbo-Molina A., Priego-Capote F., de Castro M D L. (2012). Tentative Identification of Phenolic Compounds in Olive Pomace Extracts Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry with a Quadrupole–Quadrupole-Time-of-Flight Mass Detector. *Journal of agriculture and food Chemistry*, 60 : 11542-11550.

Pincemail J., Heusele C., Bonté F., Limet R., Defraigne J.O. (2001). Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement ; Act. Méd. Int. - *Métabolismes - Hormones - Nutrition*, 4.

Pincemail J., Cillard J., Nève J., Olivier Defraigne J. (2014). Mesure de la capacité antioxydante globale du plasma : une revue critique ; *Ann Biol Clin*, 72 (4) : 413-21.

R

Rajesh Kanna Gopal., Sanniyasi Elumalai. (2017). Industrial Production of Superoxide Dismutase (SOD): A Mini Review ; *J Prob Health*.

Rahman Khalid. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors ; *Published online*, 2(2): 219–236.

Re R, Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdicolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26,1231-1237.

Reşat Apak., Kubilay Güçlü., Birsen Demirata., Mustafa Özyürek., Saliha Esin Çelik., Burcu Bektaşoğlu., K. Işıl Berker., Dilek Özyurt. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*. 12(7), 1496-1547.

Ribeiro de R A., de Barros F., Margarida M., et al. (1988). Acute diuretic effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of Sao Paulo, Brasil. *Journal of Ethnopharmacology*, 24 :19–29.

Russell Eileen G., Cotter Thomas G. (2015). New Insight into the Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cellular Signal-Transduction Processes. 319 : 1937-6448

S

- Sachdev Sean., Davies Kelvin J A. (2008).** Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise ; *Free Radical Biology & Medicine*, 44 : 215–223.
- Saad Saka, Ahlem Bahi., Wassila Aouacheri. (2011).** L'effet du stress oxydant induit par l'acétate de plomb sur le système enzymatique du glutathion chez les rats ; *Ann Toxicol Anal.* 23(3): 139-145.
- Sánchez-González M., Lozano-Mena G., Juan M E., Garcia-Granados A., Planas J M. (2013).** Assesment of the safety of maslinic acid, a bioactive compound from *Olea europaea* L. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57 :339-346.
- Sanchez-Moreno. (2002).** Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*.
- Scheibmeira H D., Christensena Katie., Whitakera Sally H., Jegaethesana Jay., Richard Clancyb., Janet D Pierce. (2005).** A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21, 24—28.
- Seeram N P., Henning S.M., Lee R., Niu Y., Scheuller H.S., Heber D. (2006).** Catechin and caffeine contents of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1599–1603.
- Sheth A., Mitaliya K., Joshi S. (2005).** *The Herbs of Ayurveda.* Shet of neutrophil oxidant production. *Redox Rep*, 3 : 3-15.
- Sies H. (1991).** Oxidative stress : From basic research to clinical application. *Am J Med.* (30) 91 3C :31s-38s.
- Silva S., Gomes L., Leitao F., Coelho A. V., Boas L. V. (2006)** “Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves,” *Food Science and Technology International*, 12 (5): 385–396.
- Somova L I., Shode F O., Ramnanan P., Nadar P. (2003).** Antihypertensive, antiathrosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *olea europaea*, subspecies africana leaves. *Journal of Ethanopharmacology*, 84, 299–305.

Speroni E., Guerra M C., Minghetti A., et al. (1998). Oleuropein evaluated in vitro and in vivo as an antioxidant. *Phytotherapy Research*, 12 :S98-S100.

Sudjana A N., D’Orazio C., Ryan V., Rasool N., Ng J., Islam N., et al. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 461e463.

Süntar İ P., Akkol E K., Baykal T. (2010). Assessment of Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of *Olea europaea* L. *Journal of Medicinal Food*, 13 :352-356.

T

Tahraoui A., El-Hilaly J., Israili Z H., Lyoussi B. (2007). Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of Ethnopharmacology*, (110) :105-117.

Taillé C., Lanone S., Aubier M., Boczkowski J. (2002). Stress oxydant et diaphragme : rôle dans la défaillance contractile au cours du sepsis. *Revue des Maladies Respiratoires*, (19)5 : 593-599.

Therond P. (2006). Stress oxydant Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant ; Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés. *Ann Pharm Fr*, 64 : 383-389.

V

Valgimigli L., Amorati R., Fumo M G., Dilabio G A., Pedulli G F., Ingold K U., Pratt D A. (2008). The unusual reaction of semiquinone radicals with molecular oxygen. *J. Org. Chem.* 73, 1830–1841.

Vardanian S A. (1978). Phytotherapy of branchial asthma in medieval Armenian medicine. *Terapevticheski Arkhiv*, 50 :133-136.

Vergely Catherine., Rochette Luc. (2003), Rappels sur la biochimie radicalaire et sur le stress oxydatif ; Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire.1 (3) 131-139.

Vinha A., Ferreres F., Silva B M., et al. (2005). “Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.) : influences of cultivar and geographical origin,” *Food Chemistry*, 89(4) : 561–568.

Visioli F., Claudio G. (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42(3): 209-21.

Vossen V., Mashungwa G., Mmolotsi R. (2007). *Olea europaea*, <http://www.crfg.org/pubs/ff/olive.html>.

W

Wise W E. (1967). *Fray Junipero Serra and the California Conquest*. New York, NY, USA : Scribner.

X

Xavier Leverage. (2009). Stress oxydant et antioxydants. *cahiers de nutrition et de diététique*, 44.219-224. Page 220.

Y

Yougaré-Ziébrou M N., Ouédraogo N., Lompo M., et al. (2016). Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 14(4), 213-219.

Z

Zargari A. (1997). Iranian medicinal plants. *Tehran University Publications*, 3: 392.

Titre : Évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits d'olives

Nature de diplôme : Master

Domaine : Science de la nature et de la vie

Option : Toxicologie et santé

L'objectif principal du présent travail était d'évaluer les activités antioxydantes *in vitro* des extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle des olives, fruits d'*Olea europaea*. Pour mesurer leurs activités antioxydantes, quatre dosages complémentaires ont été réalisés: DPPH, Réduction Power Assay, CUPRAC et l'activité anti-inflammatoire *in vitro*. Comparé à l'extrait méthanolique les résultats ont révélé que l'extrait d'olives d'acétate d'éthyle possède une activité antioxydante significative, la valeur IC50 est de 14,24 µg / ml, un bon pouvoir réducteur du fer (53,5 µg / ml), une activité réductrice du Cuprac (10,06 µg/ml) et un effet anti-inflammatoire. Les résultats démontrent que les extraits de fruits d'*Olea europaea* peuvent représenter un potentiel important des composés phénoliques comme l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine qui seraient utiles dans la prévention des maladies dans lesquelles les radicaux libres sont impliqués.

Mots clés : *Olea europaea*, olives, Radicaux libres, DPPH, Reducing Power, CUPRAC, composés phénoliques.

Laboratoire de recherche : Centre de recherche en biotechnologie C.R.Bt à Ali Mendjeli Constantine, Laboratoire analyse de contrôle qualité physicochimique et laboratoire de biochimie appliqué.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr MENNAD Ahmed (Pr- UFM Constantine).

Rapporteur : Mme DEKDOUK Nadia (MCA- UAB Batna 2).

Examineurs : Mr BOULKENDOUL Ramzi (MCB- UFM Constantine).

Mme AMRANI Amel (MCA- UFM Constantine).