

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA -
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Physiologie et Physiopathologie Animale

Présenté par :
M^{elle} HANICHE Fatiha

Thème

**La phytothérapie du stress oxydatif via les feuilles de
l'olivier sauvage (*Olea europea var. sylvestris*).**

Soutenu le : 24 / 06 / 2017

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mr HAMZAOUI Soufiane</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mr CHIBANE Mouhamed</i>	<i>Pr.</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M^{elle} DAHMOUNE Bouchra</i>	<i>Doctorante</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Co-promtrice</i>
<i>Mr LAMINE Salim</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2016/2017

Dans le Coran (souret « El Nour », la Lumière), Dieu évoque les bienfaits et les bénéfiques de l'olivier : « Allah est la lumière des cieux et de la terre. Sa lumière est semblable à une niche ou 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».

Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Pr. Chibane Mouhamed pour avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire en me prodiguant tout aide possible, et en me consacrant son temps précieux, je le remercie pour sa disponibilité et ses pertinents conseils. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

Je remercie aussi ma Co-promotrice Melle Dahmoune Bouchra pour les efforts qu'elle a consentis durant la réalisation de ce mémoire, ce travail témoigne de sa confiance, de son soutien sans faille et sa sympathie dans les moments les plus difficiles.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à tous mes professeurs de l'université de Bouira, qui m'ont enseigné durant ces deux ans.

Mes remerciements vont aux membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail :

Mr HAMZAOUY Soufiane MCB à l'université de Bouira qui m'a fait l'honneur de présider ce jury

Mr LAMINE Salime MAA à l'université de Bouira qui a bien voulu examiner ce travail.

J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à ma mère, mon père, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances, ainsi qu'à tous mes proches amis surtout Naima, qui m'ont toujours soutenu et encouragé même dans les périodes les plus difficiles.

DEDICACE

A mes parents,

Pour vos mains qui ont tant travaillées,

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,

Pour vous qui m'avez tant aimé.

A mes frères.

A tous qui me connaissent de près ou de loin.

Sommaire

Résumé en Français	
Résumé en Anglais	
Résumé en Arabe	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1

Chapitre 1 : La phytothérapie et plantes médicinales

I. La phytothérapie.....	3
II. Plantes médicinales	3
II.1. Définition	3
II.2. La récolte	3
II.3. Le séchage et conservation	4
III. Les principes actifs	4
III.1. Définition	4
III.2. Les principaux différents groupes des principes actifs	5
III.2.1. Les polyphénols et leurs dérivés	5
III.2.1.1. Acides phénoliques	5
III.2.1.2. Anthocyanes	5
III.2.1.3. Flavonoïdes	6
III.2.1.4. Tanins.....	6
III.2.1.5. Lignines.....	7
III.2.1.6. Coumarines.....	7
III.2.2. Alcaloïdes	7
III.2.3. Diterpénoïdes	8
III.2.4. Terpénoïdes	8
III.2.5. Triterpénoïdes et saponines	8
III.2.6. Saponosides	9
III.2.7. Résines	9
III.2.8. Huiles essentielles	9

Chapitre 2 : L'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*)

I. Répartition géographique	10
II. Taxonomie de l'olivier	11
III. Description botanique	12
IV. Les composés chimiques de la feuille d'olivier	13
V. Activité biologique	14

Chapitre 3: Le stress oxydatif

I. Définition du stress oxydatif	15
II. Sources des espèces réactives de l'oxygène (ERO)	16
II.1. Les espèces réactives de l'oxygène endogènes	17
II.1.1. Les mitochondries	17
II.1.2. Les peroxysomes	18
II.1.3. Le réticulum endoplasmique	18
II.2. Les espèces réactives de l'oxygène exogènes	18
III. Le système anti-oxydant	19
III.1. Défenses enzymatiques	19
III.2. Le système non-enzymatique	20
III.2. 1. Antioxydants d'origine végétale	21
III.2. 2. Les antioxydants synthétiques	21
IV. Alimentation et stress oxydatif	21
V. Mécanismes et conséquences biologiques du stress oxydatif	22
V.1. Effets du stress oxydatif sur les biomolécules	22
V.1.1. La peroxydation lipidique	22
V.1.2. L'oxydation des protéines	23
V.1.3. L'oxydation des acides nucléiques.....	24
V.2. Exemples d'effets du stress oxydatif sur les organites	25
V.2.1. La mitochondrie	25
V.2. 2. Les peroxysomes	25
V.3. Effets sur la cellule : stress oxydatif, mitochondries et apoptose	26

Chapitre 4: Matériel et Méthodes

I. Opérations de prétraitement du matériel végétal	27
--	----

I.1. Récolte de la matière végétale	27
I.2. Séchage et broyage des feuilles d'olivier	27
I.3. Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier	28
I.3.1. Macération	28
I.3.2. Soxhlet	29
II. Méthodes d'analyse	31
II.1. Taux d'humidité	31
II.2. Le Rendement	31
II.3. Etudes phytochimique	32
II.3.1. Dosage qualitatif	32
II.3.1.1. Les alcaloïdes	32
II.3.1.2. Les composés phénoliques	32
II.3.1.2.1. Les composés phénoliques simples	32
II.3.1.2. 2. Les composés phénoliques complexes	32
II.3.2. Dosage quantitatif	33
II.3.2.1. Dosage de chlorophylle a, b et caroténoïdes	33
II.3.2.2. Dosage des polyphenols totaux	34
II.3.2.3. Dosage des flavonoïdes	34
II.3.2.4. Dosage des tanins condensés	35
II.4. Activité antioxydante	36
II.4.1. Réduction du Fer : FRAP (<i>Ferric reducing antioxydant power</i>)	36
II.4.2. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène	37
II.4.3. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	38

Chapitre 5 : Résultats et discussions

I. Taux d'humidité	40
II. Rendements des extraits bruts	40
III. Etude phytochimique	41
III.1. Tests qualitatifs	41
III.2. Dosage quantitatif	44
III.2.1. Dosage de chlorophylle a, b et caroténoïdes	44
III.2.2. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins	45
IV. Activité antioxydante	51

IV.1. Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant power)	51
IV.2. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène	53
IV.3. Piégeage du radical libre DPPH	55
Conclusion	59
Références bibliographiques	
Annexes	

Résumé

Le stress oxydatif étant à l'origine de nombreuses maladies. Il est souvent à l'origine des premières anomalies responsables des modifications irréversibles de molécules et de cellules, et ces anomalies se produisent plusieurs années avant l'apparition des signes de la maladie qui sont irréversibles. La recherche actuelle porte essentiellement sur l'étude de molécules antioxydantes d'origine naturelle. Cette étude s'inscrit à rechercher l'activité antioxydante des feuilles de l'olivier sauvage (*Olea europea* var. *sylvestris*) de la famille des oléacées. Dans cette optique, ce travail consiste à faire dans un premier temps une étude phytochimique des extraits obtenus selon deux méthodes, macération et Soxhlet en utilisant trois solvants l'eau bi-distillée, eau bi-distillée /méthanol (30/70) (v/v) et eau bi-distillée/éthanol (30/70) (v/v), l'extrait éthanolique par macération a donné le rendement le plus élevé (40,66 %). L'examen phytochimique qualitatif a montré la présence des flavonoïdes et des tanins en quantités importantes et des quantités plus faibles des terpénoïdes, des saponosides et des quinones. L'analyse quantitative des polyphénols, des tanins, des caroténoïdes et des flavonoïdes des extraits montre des teneurs importants en polyphénols totaux dans le pourcentage des flavonoïdes est le plus important que celui des tanins. L'extrait éthanolique par macération s'est révélé le plus riche par rapport aux autres extraits en polyphénols totaux (74,86 µg GAE/mg MS) et les tanins (16,19 µg GAE/mg MS). Par contre, l'extrait éthanolique par Soxhlet a donné les teneurs les plus élevés en flavonoïdes (43.08 µg GAE/mg MS). Dans un second temps, nous avons évalué l'activité antioxydante *in vitro* de ces extraits par trois méthodes : le piégeage du radical libre DPPH, du peroxyde d'hydrogène et la réduction du fer (FRAP). La capacité de piégeage du radical libre DPPH est très intéressante pour l'extrait éthanolique par macération avec une IC₅₀ = 10,753 µg /ml. Cette capacité antioxydante est confirmée par le test du piégeage du peroxyde d'hydrogène avec un pourcentage d'inhibition de 56,50 %. Par contre, l'extrait éthanolique par Soxhlet a présenté une bonne capacité de réduction au fer (DO = 1,94) avec un écart moyen de 0,52 par apport à l'acide ascorbique. Les résultats de ce travail suggèrent l'importance des feuilles de l'espèce *Olea europea* var. *Sylvestris* pour l'usage pharmaceutique et la phytothérapie.

Mots clés : Phytothérapie, *Olea europea* var. *sylvestris*, stress oxydant, activité antioxydante.

Abstract

Since oxidative stress is the cause of many diseases, it seems logical to seek to suppress it. Oxidative stress is often the cause of the first abnormalities responsible for irreversible changes in molecules and cells, and these abnormalities occur several years before the appearance of the disease's irreversible signs. Current research focuses on the study of naturally occurring antioxidant molecules. This study investigates the antioxidant activity of leaves of wild olive (*Olea europea var. Sylvestris*) from the Oleaceae family. In this perspective, this work consists in a phytochemical study of the extracts obtained according to two methods, maceration and Soxhlet using different solvents distilled water, water / methanol (30/70) (v/v) and water / ethanol (30/70) (v/v), the ethanolic extract by maceration gave the highest yield (40.66). The qualitative phytochemical examination showed the presence of flavonoids and tannins in large quantities, and lower quantities of terpenoids, saponins and Quinones. Quantitative analysis of the polyphenols, tannins and flavonoids of the extracts shows high levels of total polyphenols in the percentage of flavonoids is greater than that of tannins. The ethanolic extract by maceration was the richest compared to the other total polyphenol extracts (74.86 $\mu\text{g GAE} / \text{mg}$) and the tannins (16.19 $\mu\text{g GAE} / \text{mg SM}$). On the other hand, the ethanolic extract by Soxhlet gave the highest contents of flavonoids (43.08 $\mu\text{g GAE} / \text{mg SM}$). However, we evaluated the antioxidant activity in vitro of these extracts by three methods: The trapping of the free radical DPPH, hydrogen peroxide and the Ferric Reducing Power (FRAP). The capability of trapping the free radical DPPH is very advantageous for the ethanolic extract by maceration with an $\text{IC}_{50} = 10.753 \mu\text{g} / \text{ml}$. This antioxidant capacity has been confirmed by hydrogen peroxide trapping tests with a percentage inhibition of 56.50%. On the other hand, the ethanolic extract by soxhlet showed good iron reduction capacity ($\text{OD} = 1.94$) with an average deviation of 0.52 per intake to ascorbic acid. The results of this work suggest the importance of leaves of the species *Olea europea var. Sylvestris* for pharmaceutical and phytotherapeutic use.

Keywords: phytotherapy, *Olea europea var. Sylvestris*, oxidative stress, antioxidant activity.

ملخص

الأكسدة هو سبب العديد من الأمراض فإنه يبدو من المنطقي أن تحاول إزالته. الأكسدة غالبا ما تكون مصدر التشوهات الأولية المسؤولة عن تغيرات لا رجعة فيها للجزيئات والخلايا وهذه التشوهات تحدث عدة سنوات قبل ظهور علامات المرض التي لا رجعة فيها. يركز البحث الحالي على دراسة الجزيئات المضادة للأكسدة من أصل طبيعي. تعد هذه الدراسة للتحقيق في نشاط مضادات الأكسدة لأوراق *Olea europea var. sylvestris* (الزيتون البري) من فصيلة الزيتونية. في هذا الصدد هذا العمل ، يضم أولا دراسة كيميائية نباتية لمستخلصات حصل عليها وفقا لطريقتين، النقع و سكسليت باستخدام مذيبات مختلفة الماء المقطر ، الماء / الميثانول (70/30) (ح / ح) والماء/ الايثانول (70/30) (ح/ح)، مستخلص الإيثانول بالنقع أعطى أعلى مردود (40.66 %). وأظهر الفحص الكيميائي النباتي النوعي وجود مركبات الفلافونويد والعفص بكميات كبيرة وكميات صغيرة من تيربينويدس، الصابونين وكينونات. التحليل الكمي لمادة البوليفينول، العفص وفلافونيدات للمستخلصات يظهر مستويات عالية من البوليفينول اين نسبة الفلافونويد هي أكثر أهمية من العفص. مستخلص الإيثانول بالنقع أثبت انه أغنى مقارنة بالمستخلصات الاخرى بالبوليفينول (74.86 µg GAE/m) والعفص (16.19 µg GAE/m). عكس ذلك ، أعطى مستخلص سوكسليت بالإيثانول أعلى محتوى من الفلافونيدات (43.08 µg GAE/m) من الكتلة الجافة. ثانيا قمنا بتقييم نشاط مضادات الأكسدة لهذه المستخلصات في المختبر بواسطة ثلاثة طرق : محاصرة الجذور الحرة DPPH , بيروكسيد الهيدروجين وتقنية ارجاع الحديد (FRAP). الكسح القدرة على محاصرة جذور DPPH الجذور الحرة هي مثيرة جدا للاهتمام لمستخلص الايثانول بالنقع مع $IC_{50} = 10.753$ ميكروغرام / مل. ويؤكد هذه القدرة المضادة للأكسدة عن طريق اختبار محاصرة بيروكسيد الهيدروجين بنسبة تثبيط 56.50%. عكس ذلك ، مستخلص الإيثانول بواسطة سوكسليت اعط قدرة جيدة لارجاع الحديد القدرة الحد (OD = 1.94) مع انحراف متوسط 0.52 مقارنة بحامض الاسكوربيك. نتائج هذا العمل تظهر لنا اهمية اوراق *Olea europea var. sylvestris* للاستعمال الصيدلاني والتداوي بالاعشاب.

كلمات البحث: التداوي بالاعشاب, *Olea europea var. sylvestris*, الأكسدة، النشاط المضادة للأكسدة.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique	Na ₂ CO ₃ : carbonate de sodium
ADNn : ADN nucléaire	NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
AGPI : les acides gras polyinsaturés	NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
AIF : facteur inducteur d'apoptose	NaOH: hydroxyde de sodium
AlCl ₃ : Chlorure d'aluminium	NDGA: l'acide nordihydrogualarétique
ANOVA: Analyse de variance	nm : Nanomètre
ATP: Adénosine TriPhosphate	NO : Monoxyde d'azote
BHT: Butyl Hydroxyl Toluène	NO: l'oxyde d'azote
IC ₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%	NO ₂ : dioxyde d'azote
Cu : Cuivre	NOS : Monoxyde d'azote
D.O : Densité optique	° C : Degré celcius.
DPPH : radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle	O ²⁻ : Radical superoxyde.
e- : électron	O ₂ : oxygène
EOR : les espèces oxygénées réactives	O ₂ •- : Oxyde nitrique synthase
Fe: Fer	OH• : Anion superoxyde
Fe ³⁺ : Fer ferrique	PH : Potentiel d'hydrogène
FeCl ₃ : Chlorure de fer	REL : Le réticulum endoplasmique lisse
fig. : figure	RO ₂ : peroxydes
FRAP: Ferric reducing antioxydant power	ROO•: Radical peroxyde
g: Gramme	ROO•: Radical alkoxyde
GPX : La Glutathion peroxydase	ROOH : Radical peroxyde
GSH-Px : glutathion peroxydase	ROS: Reactive oxygen species
h: Heur	SOD: superoxyde dismutases
H ₂ O : Eau distillée	ssp : Sous espèce.
H ₂ O+• : cation radical de l'eau	t : Temps
H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène	T° : Température
HDL : High density lipoprotein ou lipoprotéine de haute densité	TBHQ :tertiobutylhydroquinone
HO• : Radical hydroxyle	UV : ultraviolet
HPLC : chromatographie liquide à haute performance	UV : Ultra-violet
I % : Pourcentage d'inhibition	v/v : Rapport volume par volume
LDL : "Low Density Lipoproteins" : Les Lipoprotéines de basse densité	Vit : Vitamines
M : Molarité	VLDL : lipoprotéines de très faible densité
mg : milligramme	Zn : Zinc
min : Minute	µg : microgramme
ml : millilitre	µg GAE/mg : µg équivalent d'acide gallique par milligramme de matière végétale sèche
mM : milimole	µl : Microlitre
Ms : Masse sèche	µm : micromètre
	% : Pourcentage

Liste des figures

Figure 1 : Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde	11
Figure 2 : Les limites de l'olivier sauvage et la distribution moderne de la production d'olive dans la région Méditerranéenne.....	11
Figure 3 : L'olivier cultivé, photo prise au niveau de la région de Draa El Mizan Wilaya de Tizi Ouzou	12
Figure 4 : L'oléastre de la région de Draa El Mizan Wilaya de Tizi Ouzou	13
Figure 5 : Feuille et fruit d' <i>Olea europea var. sylvestris</i>	13
Figure 6 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant.....	16
Figure 7 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	17
Figure 8 : Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO	19
Figure 9 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	20
Figure 10 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	24
Figure 11 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules... ..	25
Figure 12 : Photo des feuilles de <i>Olea europaea var. Sylvestris</i> présent au niveau de la région de Draa El Mizan Wilaya de Tizi Ouzou.....	27
Figure 13 : Schéma générale de l'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des feuilles d'olivier sèches par macération.....	28
Figure 14 : Extraction des polyphénols par l'extracteur Soxhlet.....	29
Figure 15 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental	30
Figure 16 : Schéma sur la réaction de test FRAP	36
Figure 17 : Forme libre et réduite du DPPH	38
Figure 18 : Teneur en humidité des feuilles sèches de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	40
Figure 19 : Rendements des extraits par macération et Soxhlet pour l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	41
Figure 20 : La présence des quinones libre dans les extraits indiqués par une couleur qui vers au jaune, rouge ou violet	43
Figure 21 : La présence des Tanins libre dans les extraits indiqués par une couleur verte ou bleu noir.	43

Figure 22: La présence des saponosides dans les extraits indiqués par la mousse	43
Figure 23: La présence des Terpénoïdes dans les extraits indiqués par la formation d'un anneau rouge, brunâtre ou violet.....	43
Figure 24: La présence des flavonoïdes dans les extraits indiqués par une couleur rouge.....	43
Figure 25: Absence des alcaloïdes dans les extraits	43
Figure 26 Les teneurs des extraits de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>) en chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes.....	44
Figure 27: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	45
Figure 28 : Les teneurs en polyphénols totaux dans les cinq extraits étudiés de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	47
Figure 29 : Les rendements en polyphénols des extraits par rapport à la poudre utilisée de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	47
Figure 30 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	48
Figure 31 : Les teneurs en polyphénols totaux dans les cinq extraits étudiés de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	48
Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.....	49
Figure 33 : Les teneurs en Tanins dans les cinq extraits étudiés de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	49
Figure 34 : Représentation graphique des pourcentages des flavonoïdes et des tanins dans les polyphénols totaux pour les différents extraits.....	51
Figure 35: Le pouvoir réducteur de tous les extraits de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>) en fonction de différentes concentrations.....	52
Figure 36 : Pouvoirs réducteurs des extraits de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>) et de l'acide ascorbique.....	53
Figure 37 : Les résultats des pourcentages d'inhibition de H ₂ O ₂ par les extraits de <i>Olea europea var. Sylvestris</i> en fonction du temps.....	54
Figure 38: Les pourcentages de piégeage peroxyde d'hydrogène pour les différents extraits étudiés comparés à celui du BHA (t=0).....	55
Figure 39 : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	56
Figure 40 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour BHT.....	56
Figure 41 : Activité anti-radicalaire des extraits de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>) et le BHT.....	57

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taxonomie d' <i>Olea europea var. Sylvestris</i>	12
Tableau 2 : Les principales espèces oxygénées réactives	16
Tableau 3: Rendement des extraits obtenus par extraction macération et Soxhlet des feuilles de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	40
Tableau 4: Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les différents extraits de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	42
Tableau 5: Les teneurs de la chlorophylle a, b et des caroténoïdes dans les extraits de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	44
Tableau 6 : Résultats du dosage de polyphénols, des flavonoïdes totaux et des tanins des extraits de l' <i>Olea europea var. Sylvestris</i>	46
Tableau 7: Le pourcentage des Tanins et des flavonoïdes dans les polyphénols.....	50
Tableau 8 : Cinétique de l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits pour l' <i>Olea europea var. Sylvestris</i> (les valeurs représentent les pourcentages d'inhibitions).....	54
Tableau 9 : Valeurs des IC 50 des extraits de l'olivier sauvage (<i>Olea europea var. Sylvestris</i>).....	58

Introduction générale

Introduction générale

Depuis une dizaine d'années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydatif ». En 1969, les Américains Cord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des espèces réactives oxygénées (ERO). Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydatif et les antioxydants (**Haleng et al., 2007**).

Le stress oxydatif a été décrit comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative, inflammation et vieillissement (**Uttara et al., 2009**). Ces dommages oxydants sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur de divers biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN (**Moon et Shibamoto, 2009**).

Depuis des milliers d'années, l'humanité a toujours utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles constituent donc un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique, possédant un large éventail d'activités biologiques. Ainsi, l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (**Jaccot et Campillo, 2003**).

En Algérie, les plantes ont une importance dans la médecine traditionnelle. Dans le cadre d'attribuer les effets biologiques à l'olivier, la majorité des études sont faites sur les propriétés pharmacologiques de l'huile d'olive (**Owen et al., 2000 ; Covas et al., 2006**), et actuellement les feuilles font l'objet de recherches dans le vaste domaine de la médecine et de la pharmacologie (**Chebaibi et al., 2007**).

La première partie de ce travail concerne tout d'abord la synthèse bibliographique, qui comporte la présentation de trois chapitres : généralité sur la phytothérapie et les plantes médicinales, l'olivier sauvage et le stress oxydatif.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale subdivisée en deux chapitres : matériel et méthodes utilisés afin d'étudier la composition phytochimique de l'olivier sauvage, suivit des résultats expérimentaux et discussion. Une conclusion générale

ainsi que des perspectives de recherche sont apportées pour mettre le point sur les résultats obtenus.

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Olea europaea* var. *Sylvestris* (olivier sauvage) obtenus avec deux méthodes d'extraction par trois techniques différentes à savoir la réduction du fer FRAP, le piégeage du radical libre DPPH et le piégeage du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, l'analyse de cette espèce a porté sur l'étude qualitative et quantitative des principaux groupes chimiques des polyphénols.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

La phytothérapie et plante médicinales

I. La phytothérapie

La phytothérapie est le traitement ou la prévention des maladies par l'usage des plantes (de l'ensemble des éléments de la plante). Ce terme vient du grec : «phytos» = la plante et «therapiea » = la thérapie. La phytothérapie fait partie des médecines parallèles, ou médecines douces et c'est l'une des sciences médicales les plus anciennes (**Larousse Médical, 2006**). On peut distinguer deux types de phytothérapie (**Hamamouchi, 1999**) (**Hamamouch, 1999**).

- **Une pratique traditionnelle**, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement.
- Une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherchent des extraits actifs des plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés.

II. Plantes médicinales

II.1. Définition

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents. Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie ainsi que dans la confection de boissons, soit nature, soit en préparation galénique ou encore sous forme de principes actifs comme matière première pour l'obtention de médicaments (**Naghibi et al., 2005 ; Babulka, 2007**).

II.2. La récolte

Concernant la récolte, plusieurs éléments interviennent : l'âge de la plante, l'époque de l'année, et les parties de la plante à récolter. Il y a en effet quelques règles à suivre si vous voulez obtenir les principes actifs de la plante récoltée. Le meilleur moment pour procéder à la récolte est le matin quand la rosée soit évaporée (**Anne et Nogaret, 2003**).

On ne cueille pas les plantes à n'importe quel moment de l'année : selon la partie récoltée, il faudra choisir le bon moment. Ainsi, les écorces se récoltent au printemps, au moment de la montée de la sève (**Anne et Nogaret, 2003**).

Les feuilles et les rameaux sont souvent riches en principes actifs. On préférera les jeunes pousses, qui n'ont pas encore atteint leur plein développement et qui sont

particulièrement riches en principes actifs. Pour les plantes herbacées, les feuilles sont récoltées avant l'épanouissement des fleurs (**Anne et Nogaret, 2003**).

Les fleurs, pour des raisons assez évidentes, ne peuvent être cueillies que pendant la période de floraison (**Anne et Nogaret, 2003**).

Les racines et les rhizomes (le rhizome se situe juste sous la plante près de la surface du sol ; les racines partent du rhizome) se déterrent à l'automne, ou au début du printemps, autrement dit en dehors des périodes où les plantes sont en pleine végétation. C'est en effet le moment où ces organes sont les plus riches en principes actifs.

Les graines sont récoltées au moment où elles commencent à sécher sur la plante, mais avant qu'elles ne tombent sur le sol. Les sommités fleuries se cueillent comme si vous alliez faire un bouquet (**Fougère et Wynn, 2007**).

II.3. Le séchage et conservation

Les plantes sont conservées dans un endroit sombre, abrité et bien aéré. La température ne doit pas dépasser les 37°.

Les fleurs et les feuilles sont sèches à partir du moment où elles deviennent cassantes sans pour autant s'effriter et se réduire en poudre dès que vous les touchez. Il faut que les plantes gardent leurs couleurs d'origine. Si elles sont odorantes, elles doivent aussi garder leur parfum. Normalement, les plantes ne se conservent pas plus d'un an.

Les racines et les écorces quant à elles conservent leurs propriétés pendant deux ans. Pour les racines, il est important d'attendre qu'elles soient bien sèches avant de les mettre en bocal, pour éviter tout risque de moisissure.

Une fois les plantes séchées, vous pouvez les mettre dans des sacs en papier kraft, en prenant bien soin d'y inscrire la date de la récolte, le lieu, et bien entendu le nom de la plante. Les bocaux (en verre ou en métal, mais pas en plastique) permettent de bien conserver les plantes, que vous remiserez dans une pièce sèche, à l'écart de toute source de chaleur (**Anne et Nogaret, 2003**).

III. Les principes actifs

III.1. Définition

Les principes actifs d'une plante médicinale sont les composants naturellement présents dans cette plante; ils lui confèrent son activité thérapeutique. Ces composants sont souvent en quantité extrêmement faible dans la plante, mais ce sont eux qui en sont l'élément essentiel (**Yarnell, 2007**).

Des principes actifs se trouvent dans toutes les parties de la plante, mais de manière inégale. Et tous les principes actifs d'une même plante n'ont pas les mêmes propriétés. Les métabolites végétaux peuvent être classés en deux catégories :

- ❖ **Les métabolites primaires**, tels que les glucides, les acides aminés, les protéines et les lipides, sont les acteurs des réactions nécessaires à la vie des végétaux : photosynthèse, respiration, et absorption des nutriments.
- ❖ **Les métabolites secondaires**, Les métabolites secondaires sont des molécules complexes à l'origine de l'activité thérapeutique des plantes médicinales, et dont les précurseurs sont des métabolites primaires ou des produits intermédiaires (Yarnell, 2007).

III.2. Les principaux différents groupes des principes actifs

III.2.1. Les polyphénols et leurs dérivés

Les polyphénols sont des composés aromatiques possédant au moins une fonction hydroxyle, et sont réputés pour leur pouvoir antioxydant. Ce sont les constituants les plus répandus dans les plantes médicinales ; on les trouve dans les plantes au niveau des tissus superficielles, ils sont des composés photochimiques polyhydroxylés et comprenant au moins un noyau aromatique à 6 carbones (Haslam, 1996 ; Depoërs et al., 2008). Les plus intéressants en phytothérapie sont :

III.2.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides (Wichtl et Anton, 2009).

L'intérêt thérapeutique de ces molécules est principalement lié aux propriétés anti-inflammatoires. Mais les acides phénols ont aussi des propriétés diurétiques, cholérétiques, antioxydantes, antiseptiques et analgésiques (médicament d'aspirine dérivée de l'acide salicylique) (Bruneton, 1999; Iserin et al., 2001).

III.2.1.2. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments responsables de la coloration bleue, rouge, violette, rose ou pourpre des fleurs et des fruits. Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, et vasoprotectrices. En effet, ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et augmentent leurs résistances (Yarnell, 2007).

III.2.1.3. Flavonoïdes

Terme en latin ; flavus= jaune. Ils sont constitués de deux cycles aromatiques réunis par 3 carbones avec une structure de C₆-C₃-C₆ à poids moléculaire faible, ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles et caroténoïdes (**Wichtl et Anton, 2009**).

Les flavonoïdes ont des sous-groupes caractérisés à contenant deux ou plusieurs cycles aromatiques existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, chacun portant une ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques et reliées par un pont carboné (**Heller et Forkmann, 1993**).

Les flavonoïdes, en particulier les flavonoïdes, sont d'excellents antioxydants qui agissent en piégeant les radicaux libres oxygénés. En plus, les flavonoïdes ont une activité antioxydante car ils peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydatif : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition et par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des ces espèces réactives de l'oxygène comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (**Madhavi et al., 1996 ; Taguchi et al., 2000**).

Les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés, ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives. De plus ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer (**Přemysl et al., 2011**). Les flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein) (**Přemysl et al., 2011**). Ils sont aussi anti-inflammatoires, antibactériennes, antihelminthiques, antivirales, hépatoprotectrices, vasoprotectrices, anti-thrombiques et antinéoplasiques anticancéreux (**Yarnell, 2007; Kandaswami et al., 1993**).

Aucune toxicité des flavonoïdes n'est rapportée, notamment grâce à leur courte demi-vie (**Yarnell, 2007**).

III.2.1.4. Tanins

Tanin est un terme provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux (**Hopkins, 2003**). Sur le plan chimique, on distingue deux catégories : Les tanins condensés, polymères d'unités flavonoïdes reliés par des liaisons fortes de carbone (aussi appelés procyanidines); non hydrolysable mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines (**Hopkins, 2003**).

- Les tanins hydrolysables, polymères à base de glucose dont un radical hydroxyle forme une liaison d'ester avec l'acide gallique. Ils sont moins stables et potentiellement plus toxiques que les tanins condensés (**Hopkins, 2003; Yarnell, 2007**).

Les tanins sont connus pour leurs propriétés astringentes et anti-sécrétoires, grâce à leur capacité à se lier indifféremment aux protéines. Il convient donc de ne pas les administrer simultanément à un autre traitement car ils risqueraient d'en limiter l'absorption et l'activité. Les tanins possèdent de nombreuses autres propriétés : antiseptiques, anti-inflammatoires, antibactériennes, virucides et antifongiques. Ils sont aussi utilisés lors de lésions de dermatite atopique, de diarrhée, et d'hémorragies cutanées ou digestives (**Larkins et Wynn, 2004; Yarnell, 2007**). Les tanins peuvent provoquer des nausées, de la constipation, et à forte dose ils sont hépatotoxiques (**Yarnell, 2007**).

III.2.1.5. Lignines

Les lignanes sont des dérivés phénoliques composés de deux unités phénylpropanoïdes liées par un squelette de 18 carbones. Molécules lipophiles, elles fournissent la rigidité, la force et l'imperméabilité des membranes cellulaires des plantes supérieures. Ainsi, les lignanes se rencontrent dans toutes les parties soumises à la lignification. Certains sont qualifiés de phytoestrogènes car ils ont des caractéristiques structurales communes aux hormones sexuelles, leur permettant ainsi de se lier aux récepteurs des œstrogènes (**Yarnell, 2007**).

III.2.1.6. Coumarines

Les coumarines et leurs dérivés sont largement répandus dans le règne végétal, plus d'un millier de coumarines ont été décrites. Les plantes à coumarines sont surtout utilisées pour leur propriétés anti-inflammatoires à tropisme vasculaire, souvent antiagrégants plaquettaires et stimulants du drainage lymphatique. Elles sont également antioxydantes, et certaines furanocoumarines sont photo-sensibilisantes par contact cutané (**Depoërs et al., 2008; Vernex-Lozet, 2011**).

III.2.2. Alcaloïdes

Ce sont des substances organiques hétérocycliques azotées basiques d'origine végétale, de caractère alcalin et de structure complexe (noyau hétérocyclique). La plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont fortement toxiques (**Wichtl et Anton, 2009**).

Les premiers alcaloïdes isolés chimiquement furent la morphine (extraite du pavot somnifère en 1804), la strychnine (extraite de la noix vomique en 1818), puis la caféine (extraite des graines et des feuilles de caféier en 1819).

Les alcaloïdes sont des molécules très puissantes, qui même administrées à de faibles doses produisent nécessairement des effets significatifs. Grâce à leur capacité à traverser la barrière hémato-méningée et à interagir avec les récepteurs de certains neurotransmetteurs, ils agissent sur le système nerveux central et le système nerveux autonome (**Larkins et Wynn, 2004**).

III.2.3. Diterpénoïdes

Composés de 4 unités isoprènes, les diterpénoïdes sont des molécules de haut poids moléculaire, non volatiles et inodores. Grâce à leur caractère lipophile, elles sont très bien absorbées par les muqueuses digestives, et sont utilisées pour leurs propriétés antioxydantes (**Yarnell, 2007**).

III.2.4. Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont des molécules de faible poids moléculaire, volatiles, dérivés de l'isoprène (C_5H_8), leur classement est basé sur le nombre d'unités isoprènes qu'ils contiennent une vaste famille de composés naturels près de 15000 de molécules différentes et de caractère généralement lipophiles, dont les composés monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, ... (**Wichtl et Anton, 2009**). Leur absorption par voie cutanéomuqueuse étant importante et rapide, ils doivent être administrés à faible dose (**Yarnell, 2007**).

Ces molécules présentent en forme des huiles essentielles ; parfums et goût des plants, pigments (carotène), hormones, des stérols (cholestérol) (**Hopkins, 2003**).

III.2.5. Triterpénoïdes et saponines

Les triterpénoïdes sont des molécules pentacycliques synthétisées à partir d'unités isoprènes, alors que les saponines stéroïdiennes, appelées aussi phytostérols, sont des molécules tétracycliques synthétisées à partir de l'acétyl-coenzyme A. Malgré leur structure distincte, la majorité de leurs propriétés sont communes. Molécules glycosidiques contenant des parties hydrophiles et lipophiles, elles ont un fort pouvoir tensio-actif qui confère aux plantes qui en contiennent, des propriétés antiseptiques. De nombreuses autres propriétés leur sont également attribuées : diurétiques, expectorantes, vasoprotectrices, immunomodulatrices, et antinéoplasiques (**Hopkins, 2003**).

Les saponines sont des triterpènes tétracycliques, possèdent moins de 30 atomes de carbone, synthétisés à partir d'un triterpène acyclique (**Hopkins, 2003**). Les saponines stéroïdiennes ont des propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et hypoglycémiantes. Elles permettent aussi d'abaisser la cholestérolémie en inhibant la synthèse hépatique et l'absorption intestinale du cholestérol. Administrées oralement, elles n'ont aucun effet délétère; toutefois, lorsqu'elles sont injectées par voie intraveineuse, elles peuvent provoquer une hémolyse (**Yarnell, 2007**).

III.2.6. Saponosides

Le terme saponosides est dérivé de mot savon, sont des terpènes glycosylés comme ils peuvent aussi se trouve sous forme aglycones, ils ont un goût amer et acre (**Hopkins, 2003**). Ils existent sous deux formes, les stéroïdes et les terpénoïdes (**Iserin et al., 2001**).

III.2.7. Résines

Les résines sont des molécules complexes, généralement composées d'un mélange de diterpénoïdes et de triterpénoïdes, elles contiennent également une fraction volatile constituée de monoterpénoïdes et de sesquiterpénoïdes. Leurs propriétés médicales sont très variées, mais la plupart favorisent la cicatrisation des plaies et possèdent une action antibactérienne. Ainsi, une étude (**Khmel'nitskii et al., 2002**) a montré que l'application topique de résine de pin sur des plaies et des brûlures, active l'immunité locale, normalise l'hémodynamique de la plaie et stimule son épithélialisation. Aucune toxicité n'a été rapportée (**Yarnell, 2007**).

III. 2.8. Huiles essentielles

Ce sont des molécules à noyau aromatique et caractère volatil offrant à la plante une odeur caractéristique et on les trouve dans les organes sécréteurs. Elles sont utilisées pour soigner des maladies inflammatoires telles que les allergies, eczéma, favorise l'expulsion des gaz intestinales (**Iserin et al., 2001**).

Chapitre 2

L'olivier sauvage

L'olivier sauvage (*Olea europaea* var. *sylvestris*)

Depuis l'antiquité, l'olivier a façonné le paysage méditerranéen (**Doveri et Baldoni, 2007**). Il est connu chez les phéniciens depuis la haute antiquité ; il est désigné par le mot *zeitoun*, ce mot est couramment employé dans le vocabulaire Amazigh (**Boudribila, 2004**). Cependant, l'olivier sauvage est désigné par le mot *zebbouj*, *berb* (**Jacques-Meunié, 1982**). Cette appellation est celle utilisée dans notre langage. L'olivier cultivé (*O. europaea* L. var. *Sativa*) a été dérivé de la domestication de l'olivier sauvage ou l'oléastre (*O. europaea* L. subsp. *sylvestris*), car ils sont semblables à la forme sauvage (**Zohary, 1973**).

L'olivier sauvage africain *Olea europaea* ssp. *Cuspidata* est un arbre précieux de la forêt afro-montagnarde sec, capable de se régénérer naturellement (**Aerts et al., 2006**). Les formes sauvages de l'olivier (oléastres), sont toujours membres du maquis naturel (**Green, 2002**). L'utilisation de la population d'oliviers sauvages peut être également une autre alternative pour la reproduction d'olive (**Guerin et al., 2003**). Les produits végétaux sauvages récoltés ont généralement une valeur soit de consommation, de subsistance ou commerciale. Parmi eux, on retrouve les arbres d'oliviers sauvages, connus sous le nom oléastre (*Olea europaea* subsp *europaea* var. *sylvestris*) (**Campbell et Luckert , 2002**).

I. Répartition géographique

L'olivier (*Olea europaea* subsp *europaea* var *europaea*) est l'une des plus anciennes cultures d'arbres agricoles dans le bassin méditerranéen avec une importance culturelle et économique remarquable. L'olivier est originaire des régions tropicales et chaudes, en particulier les zones côtières de la Méditerranée orientale, du Liban, parties maritimes de l'Asie Mineure, et le Nord de l'Iran jusqu'à l'extrémité sud de la mer Caspienne (**fig. 1**) (**Fao et Who, 2003**). L'aire d'extension de la culture de l'olivier (**fig. 2**) définit l'aire biogéographique de la sphère méditerranéenne et du climat méditerranéen (**Ghedira, 2008**). L'olivier pousse en zone semi-aride à climat tempéré, sur des sols bien drainés avec un pH au-dessous de 8,5, et sont raisonnablement tolérants aux sols légèrement salins. Ils montrent une rusticité au froid et une tolérance aux températures aussi basses que -12 °C (**Doveri et Baldoni, 2007**).

En fait, à ce jour, plusieurs travaux se sont concentrés sur l'évaluation de la distribution et de la variabilité entre les olives cultivées et sauvages (**Lavee, 2013**). Plusieurs centaines de divers cultivars d'oliviers géographiquement existent dans le bassin méditerranéen .La sélection de nouveaux cultivars de la population de l'olivier sauvage

devient problématique, même dans les régions où l'olivier est très réponsus, dus à la diminution graduellement à cause de l'augmentation des oliviers domestiques dans les vergers. D'autre part, la pollinisation croisée entre les oliviers sauvages restants et les cultivars domestiqués plantés pourraient conduire à une augmentation des olives sauvages (Lavee, 2013).

Les populations d'oliviers sauvages sont distribuées dans différents environnements, avec des altitudes différentes et des sols qui peuvent être une source très importante de sa résistance aux stress abiotiques tels que la sécheresse, le sel, le vent et la baisse de température (Aranda et al., 2011). L'olivier est cultivé tandis que l'oléastre est sauvage. L'olivier peut s'échapper des cultures et revenir à un état apparemment sauvage. Dans la plupart des pays, certains cultivars portent des fruits de petite taille, comme, «Arbequina» en Espagne, ou «Cailletier» en France (Breton et al., 2008).

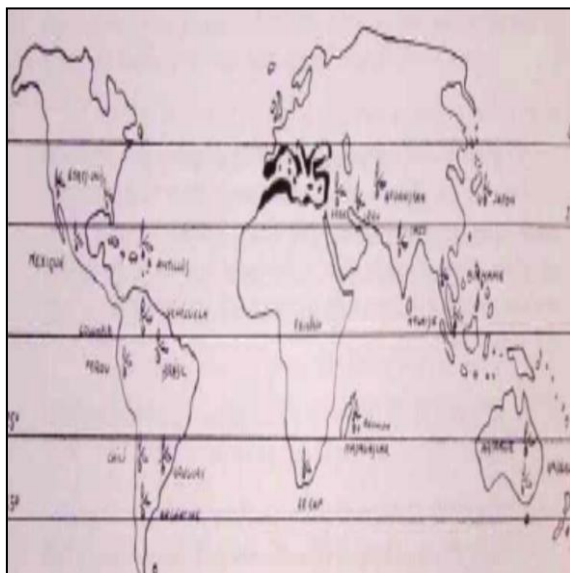


Figure 1 : Zone de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le monde (Pagnol, 1996)

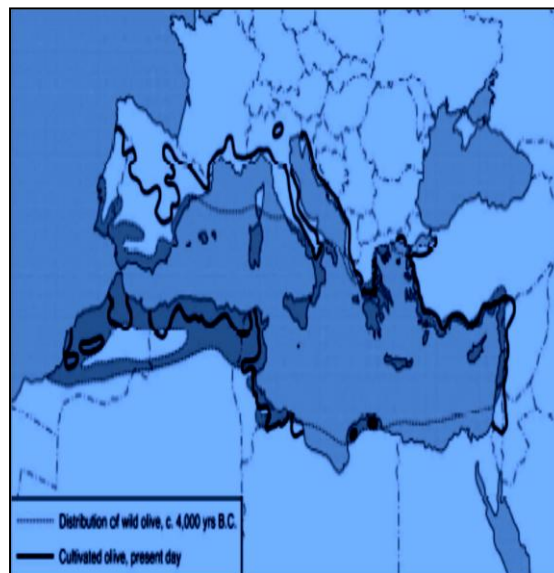


Figure 2 : Les limites de l'olivier sauvage et la distribution moderne de la production d'olive dans la région Méditerranéenne (Zohary, 1995).

II. Taxonomie de l'olivier

Pour les botanistes, l'olivier normal est appelé *Olea europaea* subsp *europaea* var *europaea*, alors que l'oléastre est de variété *Sylvestris*. La classification botanique de l'*Olea europaea* var. *Sylvestris* ou oléastre est présentée dans le **tableau 1** (Cronquist, 1981 ; Maria Bardoulat, 2013).

Tableau 1 : Taxonomie d' *Olea europea sylvestis* (Cronquist, 1981).

Règne	<i>Plantae (végétal)</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Oleaceae</i>
Sous ordre	<i>Verbéninées</i>
Famille	<i>Labiacées (labiées)</i>
Genre	<i>Olea L.</i>
Espèces	<i>Olea europea L.</i>
Sous-espèces	<i>Olea europaea L. ssp. Oleaster Hoffm. et Link (= O. europea L. ssp. Sylvestris Miller).</i>

III. Description botanique

L'olivier (**fig. 3**) est un arbre sempervirens, c'est-à-dire qu'il est toujours vert à feuillage persistant de longue vie, généralement plus de 500 ans, mais des arbres plus âgés de 2000 ans ont été enregistrés. Les feuilles matures sont elliptiques et caractérisées par une couleur grise-verte. Les fleurs sont polonisées par le vent et elles sont généralement hermaphrodites, mais certains oliviers cultivés sont mâles-stériles (**Besnard et al., 2000**). Le fruit de l'olivier est ovoïde (drupe) à un noyau fusiforme. Son bois très dur est imputrescible et est utilisé en ébénisterie (**Artaud, 2008**). Ses pièces composantes sont l'épicarpe ou la peau, le mésocarpe ou la chair, et l'endocarpe ou le noyau, qui se compose d'une enveloppe boisée renfermant un ou, rarement deux graines (**Connor et Fereres, 2005**).



Figure 3 : L'olivier cultivé, photo prise au niveau de la région de Draa El Mizan, Wilaya de Tizi Ouzou.

L'oléastre (**fig. 4**) diffère de l'olivier cultivé par la présence des pousses courtes et épineuses, des fruits de petite taille, une faible teneur en huile (**Terral et Arnold-Simard, 1996**). Les populations d'olivier sauvage sont limitées à quelques secteurs isolés des forêts natales de la Méditerranée, où le pollen peut être distribué par le vent et les oiseaux (**Lumaret et al., 2004**).

Les feuilles de l'olivier sauvage sont de courte longueur, de largeur moyenne. Les fruits de la plupart des oliviers sauvages en une forme elliptique, et avec un faible poids (**fig. 4**). Une corrélation élevée et significative des dimensions du fruit et la teneur en huile a été observée. Cela pourrait être d'intérêt pour l'utilisation des oliviers sauvages. En dépit de cela, il convient de mentionner que les oliviers sauvages avec des poids de fruits 1,3 g et le pourcentage d'huile d'olive dans la matière sèche 33,8 % est comparable aux valeurs mentionnées pour certains cultivars d'oliviers (**Hannachi et al., 2008**).



Figure 4 : L'oléastre de la région de Draa El Mizan Wilaya de Tizi Ouzou.



Figure 5 : Feuille et fruit de l'olivier sauvage '*Olea europaea var. sylvestis*'.

IV. Les composés chimiques de la feuille d'olivier

Les feuilles de l'arbre contiennent des quantités des polyphénols dans leurs extraits, qui sont variables en fonction de plusieurs facteurs : de la physiologie végétale, les conditions environnementales (principalement, les éléments disponibles dans le sol) et l'âge de la feuille (**Perrinjaquet-Mocetti et al., 2008 ; Polzonetti et al., 2004**). Parmi ces polyphénols, l'hydroxytyrosol et tyrosol qui contribuent au goût amer, astringence, et à la résistance à l'oxydation (**Visioli et Galli, 2002**). Elles possèdent la plus forte capacité à piéger les radicaux libres par rapport aux différentes parties de l'arbre d'olivier, ils présentent aussi une concentration importante en composants à haute valeur (**Savournin et al., 2001**). Il est mentionné par certains auteurs que l'extrait de feuille d'olivier réduit la pression artérielle et le cholestérol du plasma chez les rats (**Perrinjaquet-Mocetti et al.,**

2008). De plus, les acides gras mono-insaturés disponibles dans les feuilles d'olivier tels que l'acide oléique, diminuent les lipides du plasma dont les lipoprotéines de faible densité (LDL) et lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et préviennent des maladies cardiovasculaires (**Huang et al., 2008**). L'extrait de feuilles d'olivier peut contenir des traces d'éléments vitaux tels que le sélénium, le fer, le zinc, la vitamine C, la β -carotène et une grande partie d'acides aminées (**Polzonetti et al., 2004**). Les feuilles contiennent aussi du cinchonidine, un alcaloïde quinoléique aux propriétés antipaludiques. Les feuilles, l'écorce et les fruits contiennent l'oleuropéine qui possède des activités antioxydantes, hypotensives, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes et antiseptiques (**Ghedira, 2008**).

Les feuilles d'olivier fraîche sont riches en protéines (5,04 à 7,60 g / 100 g de matière fraîche) et en fibres (37,14 à 42,58 g /100 g matière fraîche). Elles présentent une teneur en composés phénoliques totaux variant de 1,38 à 2,32 g/100 g MS selon les variétés (**Boudhioua et al., 2008**).

Esmaeili-Mahani et al., (2010) ont quantifié certains composés identifiés dans un extrait éthanolique de feuilles d'olivier en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les résultats ont montré que l'oleuropéine (356 mg/g), hydroxytyrosol (4,89 mg/g), tyrosol acide (3,73 mg/g) et caféique (49,41 mg/g) ont été les principaux composés.

V. Activités biologiques

Les feuilles ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels dans les pays européens et méditerranéens comme des extraits, des tisanes, et des poudres. Ils contiennent plusieurs composés potentiellement bioactifs (**Wainstein et al., 2013**).

Les feuilles d'olivier sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle modérée. L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète (au cours de la grossesse ou en cas d'obésité) (**Ghedira, 2008**). Elles ont été aussi largement utilisées en tant que remède pour le traitement de la fièvre et d'autres maladies comme le paludisme. Elles ont été consommées sous forme d'un extrait, d'un ensemble de poudre ou tisane. Ces propriétés comme : antioxydantes, anti-hypertensive, anti-inflammatoire, hypoglycémique, hypocholestérolémiantes, anti-viraux et anti-cancérogènes (**Visioli et al., 2002**). Les feuilles possèdent également des propriétés antimicrobiennes contre certains micro-organismes tels que des bactéries, des champignons et mycoplasmes (**Ghanbari et al., 2002**).

Chapitre 3:

Le stress oxydatif

Le stress oxydant

En condition physiologique, l'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (ERO) (ou ROS, pour reactive oxygen species) (**Halliwell, 1994**). Aux doses faibles, les ERO sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la transduction du signal, l'entretien et le fonctionnement de l'organisme ainsi que dans le processus de la fécondation, de la maturation et du mouvement cellulaires (**Favier, 2003**). Elles jouent aussi un rôle majeur dans la production de médiateurs cellulaires, l'élimination des produits toxiques et la défense contre l'invasion des microbes et des virus, de même que contre les cellules tumorales (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Ces espèces réactives participent à de nombreuses fonctions biologiques. À titre d'exemple le $\text{NO}\cdot$ joue un rôle dans plusieurs processus physiologiques tel que la protection cardiaque, la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission et les mécanismes de défense (**Penna et al., 2009**). Les espèces réactives ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\text{NO}\cdot$) intervient aussi dans la maturation, l'hyperactivation des spermatozoïdes et la fusion de spermatozoïde avec l'ovocyte. Les espèces réactives oxygénées et azotées participent aussi à la différenciation cellulaire l'apoptose, l'immunité et la défense contre les micro-organismes (**Roberts et Sindhu, 2009**).

Les ERO deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme à des doses excessives. Cette surproduction des ERO au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydatif qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

I. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des espèces réactives oxygénées (ERO) et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (**fig. 6**) (**Sayre et al., 2008 ; Browne et al., 2008**). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (**Kirschvink et al., 2008**). L'équilibre

ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (Mac Laren, 2007).

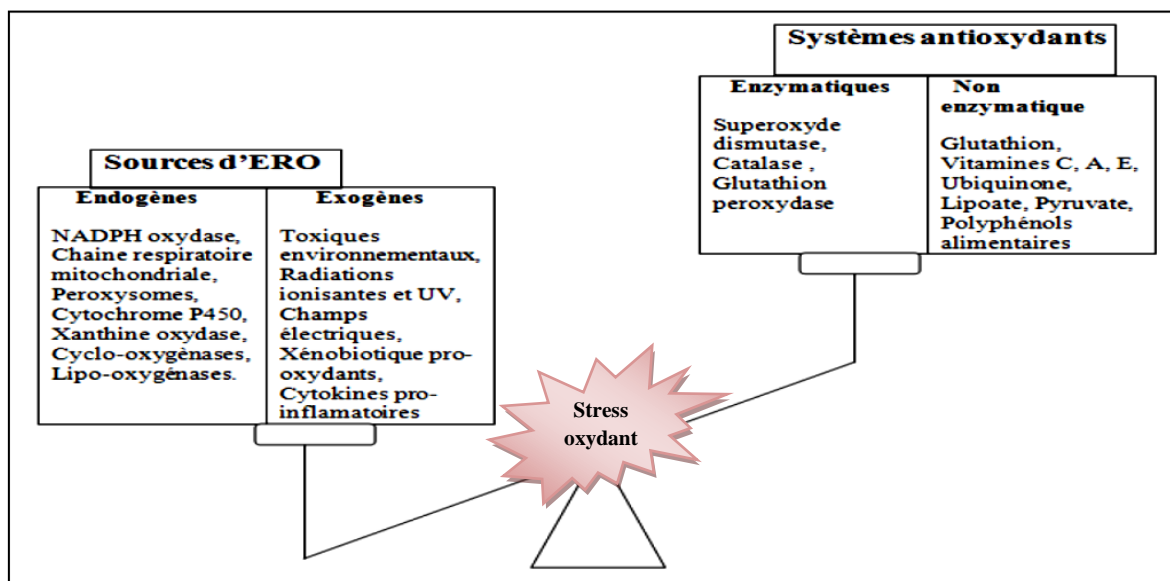


Figure 6: Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant (Nkhili, 2009).

II. Sources des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les ERO produits d'une manière endogène proviennent essentiellement du métabolisme mitochondrial (Pattwell and Jackson, 2004), du peroxysome et du réticulum endoplasmique (De and Baudhuin, 1966).

En situation normale, les ERO (tableau 2) sont produites en permanence par notre organisme (rôle physiologique) mais un système efficace de défenses antioxydantes (vitamines, enzymes, oligoéléments) permet de réguler cette production afin de prévenir tout dégât cellulaire excessif.

Tableau 2 : Les principales espèces oxygénées réactives (Bartos, 2003).

Radical	Formule	Formule
Peroxyde d'hydrogène		H ₂ O ₂
Anion superoxydes		O ₂ • ⁻
Hydroxyle		OH•
Peroxyle		ROO•
Hydroperoxydes*		ROOH
Alcoxyles		RO•
Oxygène singulet		1O ₂
Oxyde nitrique		NO•

*Espèce active de l'oxygène, non radicalaire

II.1. Les espèces réactives de l'oxygène endogènes

Les ERO produits d'une manière endogène proviennent essentiellement du métabolisme mitochondrial (Pattwell and Jackson, 2004), du peroxysome et du réticulum endoplasmique (fig. 7) (De and Baudhuin, 1966).

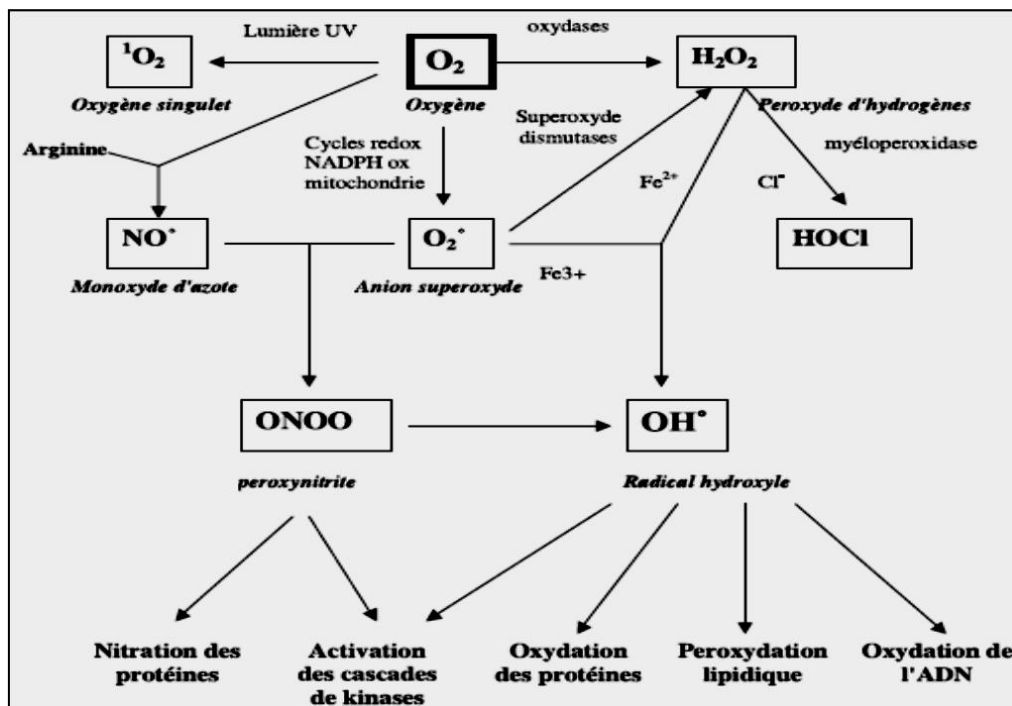
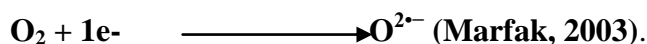


Figure 7 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

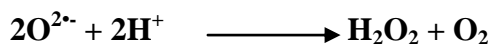
II.1.1. Les mitochondries

Comme cité précédemment, la chaîne respiratoire est la principale source d'ERO endogènes à l'échelle de la cellule. On estime que 2 à 5% des électrons s'échappent à différents niveaux de la chaîne respiratoire aboutissant à la formation des ERO.

Le premier produit toxique génère à partir de l'O2 est l'anion superoxyde O^{2•-} ; une réaction est catalysée par le cytochrome oxydase peroxymes, microsomes, le cytochrome P450 et b5 de la chaîne du transport d'électron (Sevanian et al., 1990).



Il est ensuite converti en peroxyde d'hydrogène (H2O2) par les superoxydes dismutases (SOD) présentes au niveau de l'espace inter membranaire de la mitochondrie.



Bien que le H2O2 soit moins réactif que l'anion superoxyde, il peut se décomposer en radical hydroxyle (OH•) très toxique en présence de fer ferreux (Fe²⁺) ou de cuivre.



L'OH[•] est lui-même à l'origine de nombreuses autres espèces oxydantes par perte d'un électron ou d'un proton (**Pattwell et Jackson, 2004**).

II.1.2. Les peroxysomes

Le peroxysome est un petit organite impliqué dans la synthèse et la dégradation de plusieurs composants cellulaires. Bien que les acides gras soient les premières cibles du peroxysome, ce dernier dégrade également les polyamines, les glyoxylates, certains acides aminés, la majorité des xenobiotiques et les eicosanoides produits de dégradation de l'acide arachidonique (**Wanders et Waterham, 2006**).

Les enzymes assurant ces dégradations sont des α et des β -oxydases. Ces réactions d'oxydation nécessitent un recrutement massif d'O₂ au niveau du peroxysome. La libération d'électrons lors des réactions d'oxydo-réduction aboutit à la formation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Il y a d'autres ERO qui ont été observés également comme le O^{2•-}, OH[•] et le NO[•] (**Schrader et Fahimi, 2006**).

II.1.3. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse (REL) est le siège de détoxification des drogues liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (**Freeman et al., 1983; Turrens et al., 1982**). De ce fait, le REL constitue un site important de réactions oxydatives permettant ainsi la dégradation des produits toxiques. La principale enzyme impliquée dans ces réactions est le cytochrome P450 qui catalyse des réactions d'oxydation des acides gras insaturés et des xénobiotiques ; il en résulte une production importante d'ERO (**Morel et Barouki, 1999**).

II.2. Les espèces réactives de l'oxygène exogènes

Les ERO peuvent provenir de sources extérieures telles que les rayonnements UV (Ultra-violet), les radiations ionisantes (**Afonso et al., 2007**), certains produits chimiques comme les éléments de traces métalliques (le fer, le cuivre, le chrome, le cobalt, le cadmium, le zinc, le plomb et l'arsenic) ou des habitudes néfastes à la santé (tabac, drogue et alcool) (**Hadi, 2004**). Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels), sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (**Hadi, 2004**).

III. Le système anti-oxydant

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par ERO et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO. On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (**Favier, 2003**) :

- les systèmes enzymatiques : superoxyde dismutases SOD, catalases et glutathion peroxydases ;
- les systèmes non enzymatiques comme les vitamines C et E, les polyphénols,...etc (**Leverve, 2009**).

Aussi, le maintien de ces systèmes enzymatiques nécessite la présence d'un certain nombre d'oligoéléments : cuivre, manganèse, zinc et sélénium en **particulier** (**Jacotot, 1997**).

III.1. Défenses enzymatiques

L'un des systèmes de défense antioxydants enzymatiques est constitué de trois enzymes : le superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GSH-Px) et la catalase. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (**fig. 8**) (**Lehucher-Michel et al., 2001**).

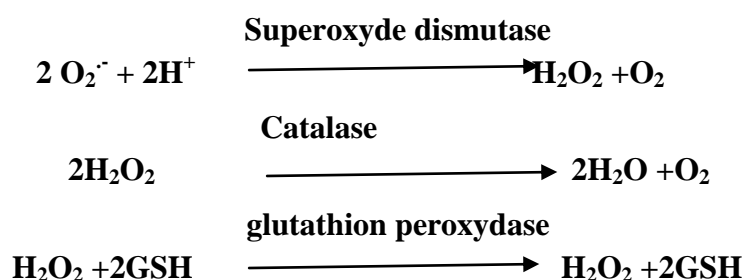


Figure 8 : Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO (**Halliwell, 2006**).

Il existe de nombreuses autres enzymes (**fig. 9**) antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, le glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases. La plupart de ces enzymes, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le

NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier, 2003).

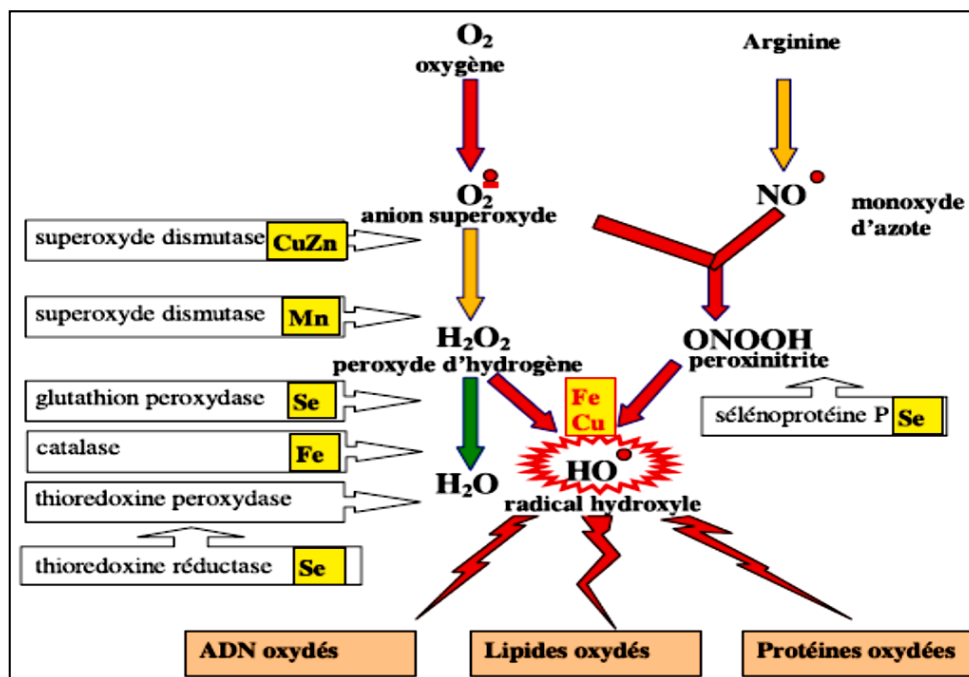


Figure 9 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

III.2. Le système non-enzymatique

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO. Il est géré essentiellement par des petites molécules alimentaires comme les vitamines C et E, la b-carotène, l'acide α -lipoïque et les polyphénols les ions comme Zinc Manganèse Cuivre Sélénium ce qui empêche la production du radical hydroxyle, hautement toxique (Kohen et Nyska, 2002).

Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases. Ce type d'antioxydant est appelé piégeur « scavenger » pour les Anglo-saxons. De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus

important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO• (Favier, 2003 ; Flora, 2009).

III.2.1. Antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes RO_2 . Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulier (1O_2), ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

III.2.2. Les antioxydants synthétiques

Il s'agit du butylhydroxytoluène (BHT), du butylhydroxyanisole (BHA) et des esters de l'acide gallique : gallate de propyle, gallate doctyle, et de dodécyle. Le BHT est un antioxydant de rupture de chaîne, très efficace et peu coûteux. Le BHA est un mélange de deux isomères de position dont l'efficacité est un peu inférieure à celle du BHT.

Il existe d'autres antioxydants synthétiques peu utilisés tels que la TBHQ (tertiobutylhydroquinone) utilisée pour la conservation des huiles brutes, l'acide nordihydrogualarétique (NDGA), ce dernier est utilisé dans les produits à usage topique et le 4-hydroxyméthyl 2,6-ditertiobutylphénol ou Ionox 100, dont les propriétés antioxydantes sont voisines de celles du BHT (Johnson, 1988).

IV. Alimentation et stress oxydatif

La production des ERO peut se faire au niveau cellulaire en réponse à divers stimuli, tel que la surcharge métabolique elle-même provoquée par une surabondance de macronutriments.

En effet, lorsque l'apport calorique dépasse la dépense énergétique, l'augmentation induite par le substrat en excès active le cycle de Krebs ce qui provoque la formation des ERO. Ainsi, l'ingestion excessive de macronutriments induit la production des ERO (Codoner-Franch *et al.*, 2011). Dans ce sens, une étude a démontré que l'ingestion de 75g de glucose induit une augmentation de la production de superoxyde dans les leucocytes, libérés ensuite dans le milieu extracellulaire (Mohanty *et al.*, 2000). Une réponse similaire a également été observée suite à l'ingestion des graisses saturées (Mohanty *et al.*, 2000).

Ainsi, un repas riche en graisse et en glucides induit une réponse oxydative et inflammatoire plus intense et prolongée avec une production accrue des ERO chez les patients obèses par rapport aux sujets normo-pondérés (**Patel et al., 2007**).

Pour cela, il est possible de choisir des aliments antioxydants et non inflammatoire à fin de minimiser l'inflammation et le stress oxydant postprandial. L'avènement de la biologie moléculaire montre le rôle de certaine molécule de petite taille dans la défense antioxydante, en effet cette défense peut être renforcée par des apports exogènes.

Le schéma suivant montre qu'une bonne alimentation fournie directement l'essentiel des éléments pouvant assurer une bonne défense antioxydante. Cette alimentation garantie :

- Un apport en Vitamines (Vit) A et C, les caroténoïdes et flavonoïdes qui ont pour rôle la neutralisation des entités radicalaires en les piégeant (Scavengers).
- Les oligoéléments tels que le Fer, Sélénium, Cuivre, Zinc et le Manganèse indispensable pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu, Zn-SOD, Se-GPx).

Sur la base de ces données, les scientifiques accordent de plus en plus d'importance à une alimentation riche en fruits et légumes, cette constatation amène donc une réflexion importante sur l'effet d'une thérapie antioxydante à long terme dans le cadre de la prévention de pathologies où le stress oxydatif est impliqué (ex : maladies cardiovasculaires). Dans cette optique l'étude SUVIMAX a proposé d'évaluer quel sera l'impact d'une prise journalière pendant 8 ans de d'un mélange d'antioxydants à des doses physiologiques (30 mg de Vit E, 120 mg de Vit C, 6 mg de b-Carotène, 100 µg de sélénium et 20 mg de Zinc sur l'incidence de l'apparition des maladies cardiovasculaires (**Pincemail et al., 2002**).

V. Mécanismes et conséquences biologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif est le résultat du déséquilibre entre le taux de production des ERO et l'activité anti-oxydante. Etant des éléments très réactifs, les ERO ont le pouvoir d'oxyder d'une manière concomitante les lipides comme les acides gras insaturés, les protéines et l'ADN (Acide Désoxyribo-Nucléique) (**Dalle-Donne et al., 2003; Valko et al., 2006**).

V.1. Effets du stress oxydatif sur les biomolécules

V.1.1. La peroxydation lipidique

Les lipides sont des molécules très affectées par le stress oxydant. La peroxydation lipidique est l'ensemble des réactions entre les acides gras polyinsaturés (AGPI) et les ERO ou les lipoprotéines et les ERO. Les AGPI sont localisés préférentiellement au niveau

des membranes plasmiques tandis que les lipoprotéines sont présentes essentiellement dans le plasma. Les complexes lipoprotéiques ont pour but le transport des lipides au niveau du sang (**Gotto et Kon, 1970**).

La peroxydation lipidique est un mécanisme très complexe qui comprend une série de réactions aboutissant à la formation de produits terminaux toxiques pour les protéines et l'ADN (**Muller et al., 2007**). La peroxydation lipidique est associée à plusieurs maladies comme le diabète et les maladies vasculaires.

V.1.2. L'oxydation des protéines

L'oxydation protéique est le résultat de l'interaction directe entre les protéines et les ERO ou indirectement entre les protéines et les produits sous-jacents du stress oxydant (ERO secondaires).

Certains acides aminés sont particulièrement sensibles au stress oxydant tel les cystéines et les méthionines (**fig. 10**). L'oxydation protéique induit la formation des protéines carbonylées et des produits dérivés tels les aldéhydes et les cétones. De plus, l'oxydation protéique aboutit aux clivages des ponts bi-tyrosines et des chaînes peptidiques. Ces dommages protéiques peuvent induire la mort cellulaire à travers l'inactivation de certaines protéines clés dans des processus vitaux telles que les enzymes mitochondriales ou les protéines membranaires (**Stadtman, 2006; Stadtman et Levine, 2000**).

Néanmoins, la cellule possède plusieurs systèmes comme le protéasome, capables de reconnaître et d'éliminer les protéines endommagées. Les cellules peuvent également restaurer certaines protéines à travers la surexpression des protéines chaperonnes (les protéines du choc thermique). Les protéines du choc thermique (Heat Shock Proteins, HSPs) sont ubiquitaires. Elles ont été mises en évidence par Tissières et ses collaborateurs (**Tissieres et al., 1974**) dans des cellules de drosophile mélanogaster exposées à des hautes températures. Il s'est avéré plus tard que ces protéines ne sont pas spécifiques au choc thermique mais sont exprimées en réponse à différents types de stress (**Kelley et Schlesinger, 1978**).

Dans les conditions physiologiques, ces protéines sont impliquées dans le processus de repliement tridimensionnel des protéines naissantes. Cependant, leur expression est accentuée lors d'un stress ou elles assurent la réparation des protéines endommagées et préviennent les interactions inappropriées entre les différentes protéines.

En fonction de leurs poids moléculaires, les HSPs sont classés en six familles. En dépit de leurs propriétés communes, chaque famille présente des particularités se rapportant à leur mécanisme d'action, leur localisation intracellulaire, leur dépendance à l'ATP (Adénosine TriPhosphate) comme substrat énergétique ou la nature inductible de leur expression. À titre d'exemple, les HSP70 et les HSP 60 (chaperonnes mitochondriales) sont exprimées de manière constitutive dans la cellule. Cependant, au moment du stress, l'expression de l'HSP 60 est constante tandis que l'expression de la HSP 70 est stimulée (Burel *et al.*, 1992).

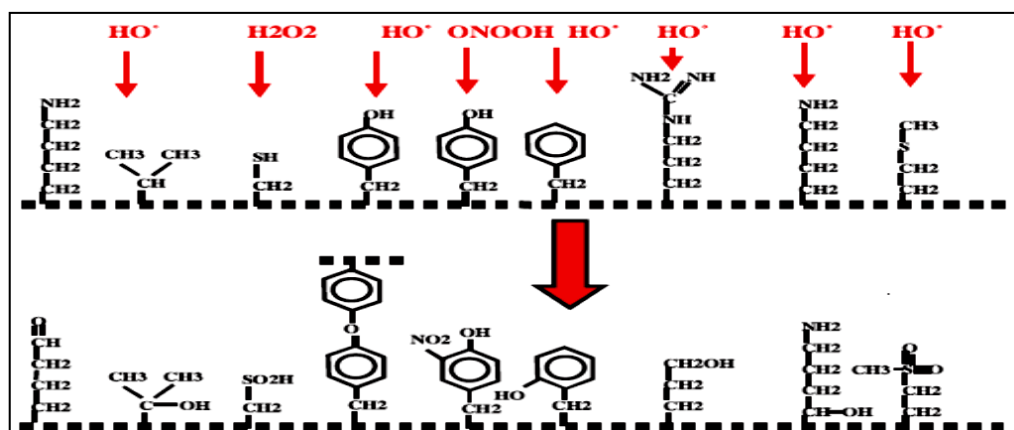


Figure 10: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

V.1.3. L'oxydation des acides nucléiques

Deux types d'ADN existent au niveau cellulaire : l'ADN génomique et l'ADN mitochondrial. Ce dernier semble être plus sensible aux dommages induits par les ERO, d'une part à cause de sa localisation proche d'une source d'ERO et d'autre part, à cause de l'absence des histones. De même les systèmes de réparation de l'ADN mitochondrial semblent être moins efficaces par rapport aux mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN nucléaire (ADNn) (Bohr, 2002; Mecocci *et al.*, 1993; Richter *et al.*, 1988; Sohal *et al.*, 1994; Stevnsner *et al.*, 2002).

Les principaux dommages observés au niveau du génome (fig.11) sont induits par le radical hydroxyl $\text{OH}\cdot$ qui interagit avec les bases puriques et pyrimidiques. Des centaines de produits peuvent être générés par ces réactifs mais le principal produit connu est la 8-oxoguanine qui constitue un marqueur de stress oxydatif et de cancérogenèse (Dizdaroglu *et al.*, 2002). En plus de ces produits, l'oxydation de l'ADN génère des cassures simples et doubles brins. La persistance du stress oxydatif peut perturber les

mécanismes de réparation d'ADN ce qui peut mener soit à l'apoptose ou à la cancérogenèse.

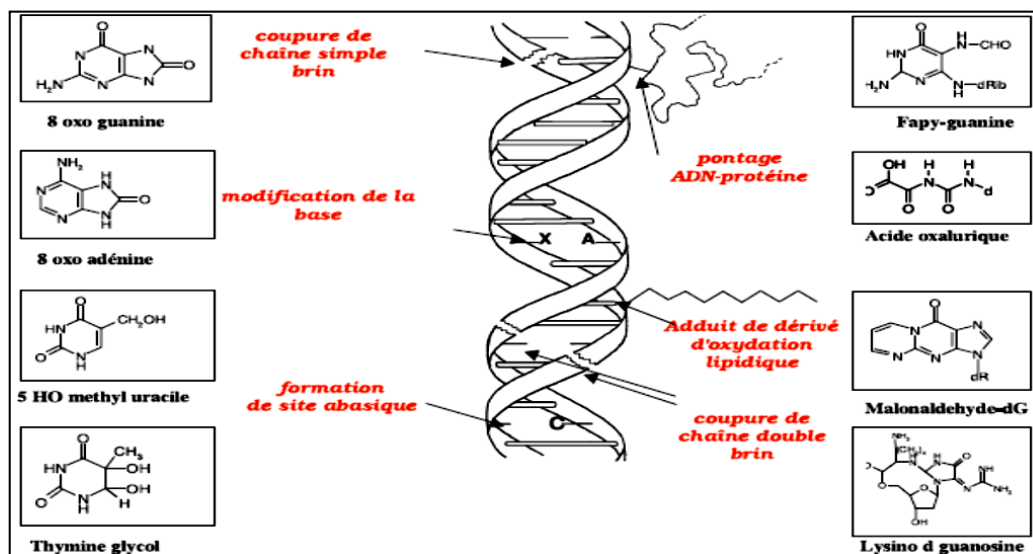


Figure 11 : Les lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

V.2. Exemples d'effets du stress oxydatif sur les organites

V.2.1. La mitochondrie

Comme nous l'avons souligné auparavant, les mitochondries sont les principaux sièges de production des ERO. Ces organites sont également des cibles directes du stress oxydatif. Le radical d'oxygène $O_2^{\cdot-}$ interagit avec l'oxyde d'azote NO^{\cdot} : il en résulte la formation d'un radical très toxique $OONO^{\cdot-}$ capable d'inhiber le fonctionnement de la chaîne respiratoire, et d'endommager les constituants de la mitochondrie tels la membrane mitochondriale, le complexe de la chaîne respiratoire et l'ADN mitochondrial, ce dernier étant impliqué dans l'expression des sous unités du complexe de la chaîne respiratoire. Les dommages au niveau de l'ADN mt amplifient également le taux de production des ERO (Echtay *et al.*, 2003).

V.2.2. Les peroxysomes

L'augmentation de la concentration en ERO à l'échelle cellulaire induit une augmentation du volume du peroxysome corrélée à une augmentation du taux d'enzymes associées. Des changements morphologiques dus à l'élongation de la membrane peroxysomale ont aussi été détectés dans des cellules exposées à un stress par les UV. Cependant, ce phénomène est bloqué par un traitement aux anti-oxydants ce qui démontre une implication directe des ERO dans ce processus d'élongation. Sachant que le

peroxysome est une organelle clé dans la lutte anti-oxydative, l'élongation de la membrane peroxysomale pourrait être un pré requis pour la division peroxysomale nécessaire pour le métabolisme des ERO (Schrader et Fahimi, 2006).

V.3. Effets sur la cellule : stress oxydatif, mitochondries et apoptose

Le stress oxydatif est connu comme étant un inducteur d'apoptose qui est définie par une série d'événements conduisant à la mort cellulaire. L'apoptose peut être déclenchée par voie intrinsèque ou extrinsèque à travers l'activation des récepteurs de mort cellulaire. Plusieurs changements morphologiques sont observés dans les cellules apoptotiques comme la condensation de la chromatine, la formation de bulles au niveau de la membrane plasmique et la fragmentation de l'ADN. Ces événements mènent à la fragmentation de la cellule et à la formation des corps apoptotiques.

À travers leurs actions sur l'ADN, les ERO activent la protéine P53 et sa voie de signalisation sous-jacente. La P53 est un facteur de transcription qui favorise la transcription de gènes clés impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose. Dans les conditions de stress oxydatif, l'activation de la P53 active l'expression de plusieurs gènes pro-apoptotiques tels que les gènes *bax*, *fas* et *Apaf-1* et réprime l'expression de la protéine anti-apoptotique *bcl-2* (Liu and Xu, 2011; Mates et al., 2012).

Le stress oxydatif induit l'apoptose également à travers l'activation de la P38 MAPK. Dans des conditions sévères de stress oxydatif, il est observé une augmentation de la perméabilité membranaire des mitochondries à des molécules de taille supérieure à 1500 Da.

Cette augmentation de perméabilité perturbe le fonctionnement de la chaîne respiratoire induisant une augmentation de la production des ERO, une baisse de la production d'ATP, ainsi qu'un efflux de calcium, de glutathion réduit et d'autres réducteurs. Ceci est accompagné d'une augmentation significative de la pression osmotique due à l'accumulation des protéines dans la mitochondrie. Cette étape est suivie par un influx d'eau causant un gonflement de la mitochondrie. Cet influx d'eau a pour objectif le rétablissement de l'équilibre osmotique entre le cytoplasme et la mitochondrie. Une altération du potentiel transmembranaire est aussi observée dans des conditions de stress oxydatif (Chernyak and Bernardi, 1996).

L'augmentation de la perméabilité membranaire permet également la libération des protéines clés d'apoptose qui sont localisées dans la mitochondrie comme le cytochrome C et le facteur inducteur d'apoptose (AIF) (Zamzami et al., 1996).

Deuxième partie

Partie expérimentale

Chapitre 4

Materiel et Méthodes

Matériel et méthodes

I. Opérations de prétraitement du matériel végétal

L'extraction est précédée généralement par une ou plusieurs opérations de préparations ou de prétraitement de la matrice végétale. Les opérations de prétraitement peuvent, suivant les cas, comprendre plusieurs étapes qui vont du nettoyage au séchage et broyage.

I.1. Récolte de la matière végétale

Les feuilles fraîches (**fig. 12**) de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*) sont récoltées en Algérie dans la région de Draa El Mizan Wilaya de Tizi-Ouzou durant le mois de décembre 2016. La collecte des feuilles était effectuée le matin, juste après évaporation de la rosée. Après récolte, les feuilles étaient transportées au laboratoire de l'université de Bouira puis intensément nettoyées avec de l'eau distillée à 20°C égouttées à l'aide d'un tamis.

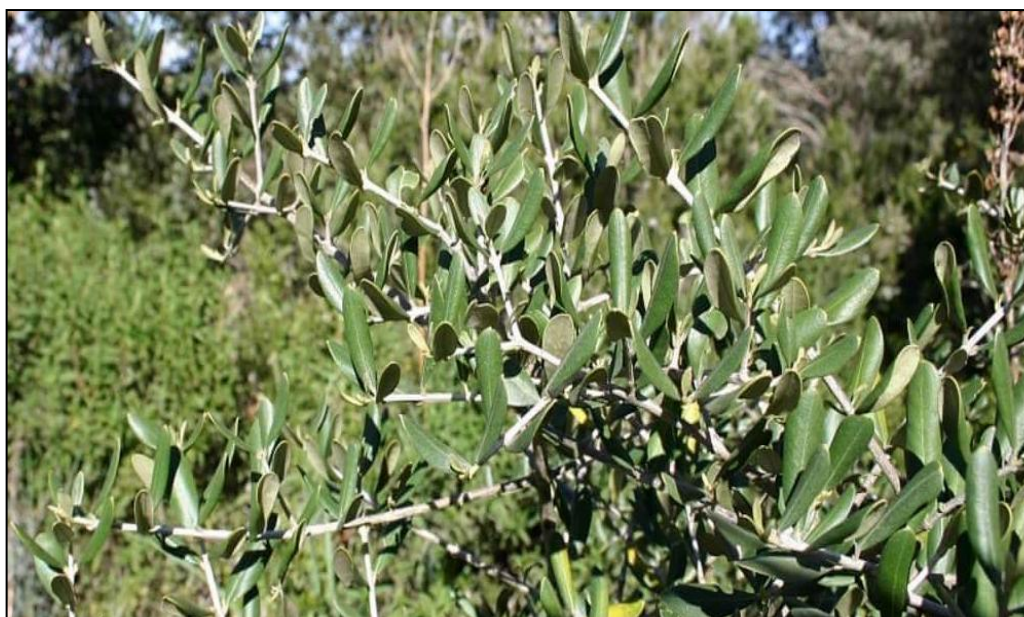


Figure 12 : Photo des feuilles de *Olea europea var. Sylvestris* présent au niveau de la région de Draa El Mizan Wilaya de Tizi Ouzou.

I.2. Séchage et broyage

Les feuilles ont été séchées à 40°C et à l'abri de la lumière dans étuve, jusqu'à perte de 70% du poids, puis Les feuilles ont été broyé à l'aide d'un broyeur à hélice, de type « moulin à café électrique » pour obtenir une poudre d'une granulométrie de l'ordre de

125 μm , dans le but d'augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant d'extraction et à faciliter l'extraction de l'intérieur des tissus végétaux par cassure des tissus et des parois cellulaires. La poudre obtenue a été gardée dans des flacons en verre à l'abri de l'humidité et de la lumière à température ambiante.

I.3. Extraction des polyphénols totaux à partir des feuilles d'olivier

I.3.1. Macération

5 g de la poudre végétale a été mélangé avec 100 ml d'un de ces solvants : eau bi-distillé, eau bi-distillé/ méthanol (30 :70) (v/v), eau bi-distillé /éthanol (30 :70) (v/v). Ce mélange a été agité et macéré sur un agitateur magnétique pendant 48 h à la température ambiante du laboratoire. Puis filtré sur papier filtre lavé à l'eau bi-distillée (**fig. 13**).

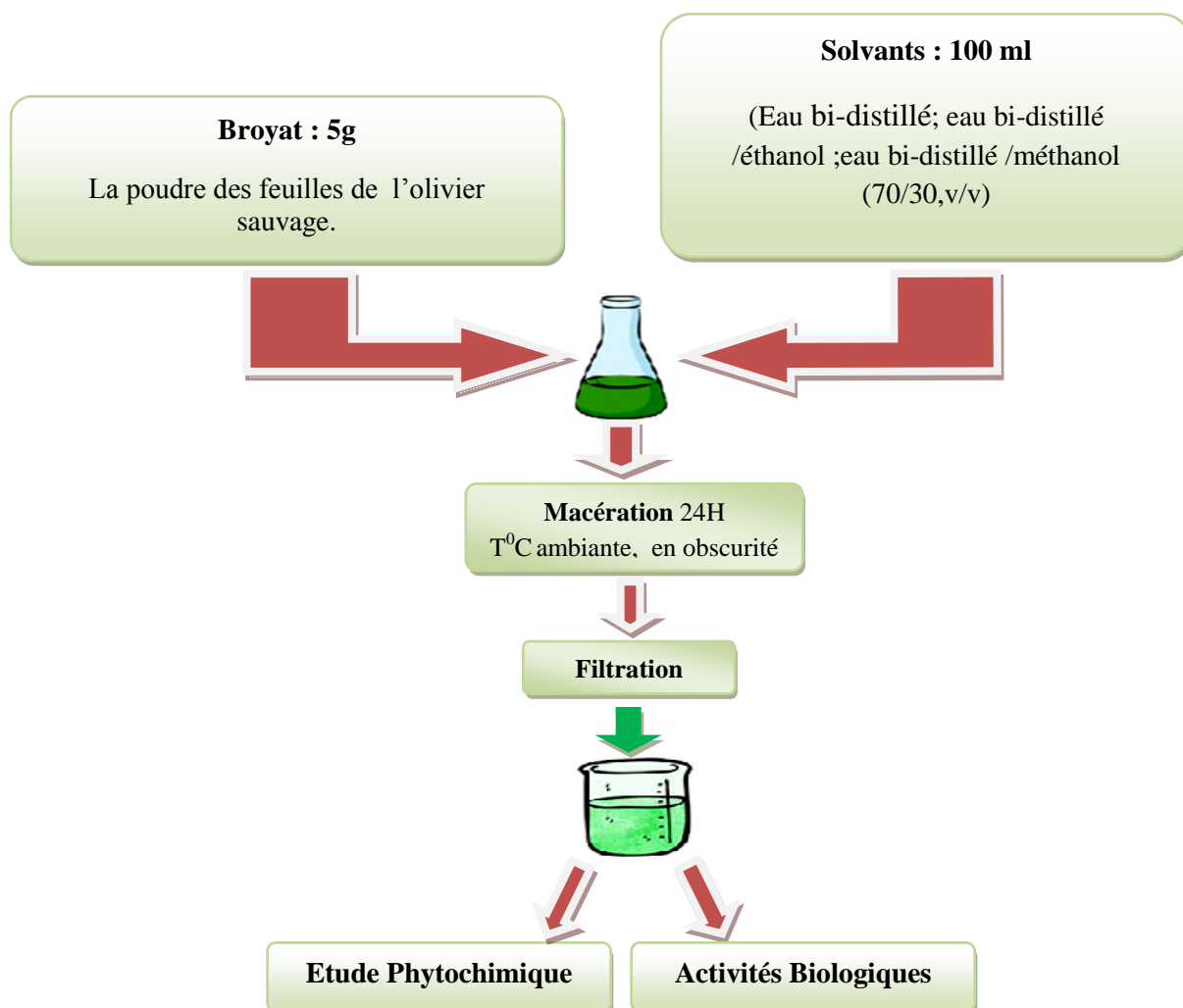


Figure 13: Schéma générale de l'extraction des polyphénols totaux à partir de la poudre des feuilles d'olivier sèches par macération.

I.3.2. L'extracteur Soxhlet

L'extraction par L'extracteur Soxhlet (**fig. 14**) ou l'extraction par solvant organique à chaud est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première (**Marrouf et Tremblin., 2009**)

Dans notre travail on a utilisé deux solvants : 20 g de la poudre végétale a été mélangé avec 200 ml d'un de ces solvants : eau bi-distillé /éthanol (70/30, v/v); eau bi-distillé /méthanol (70/30, v/v).

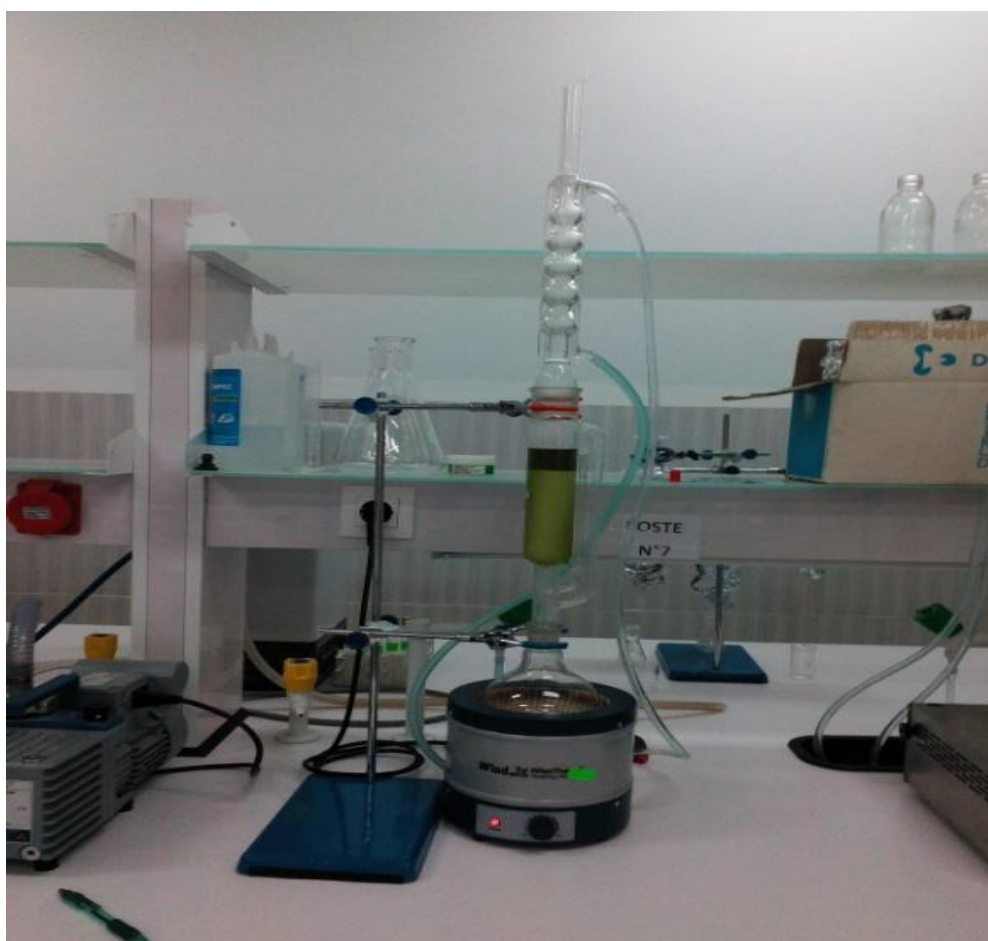


Figure 14 : Extraction des polyphénols par l'extracteur Soxhlet.

Cette étude expérimentale est faite en suivant un Protocole résumé dans la **fig. 15**.

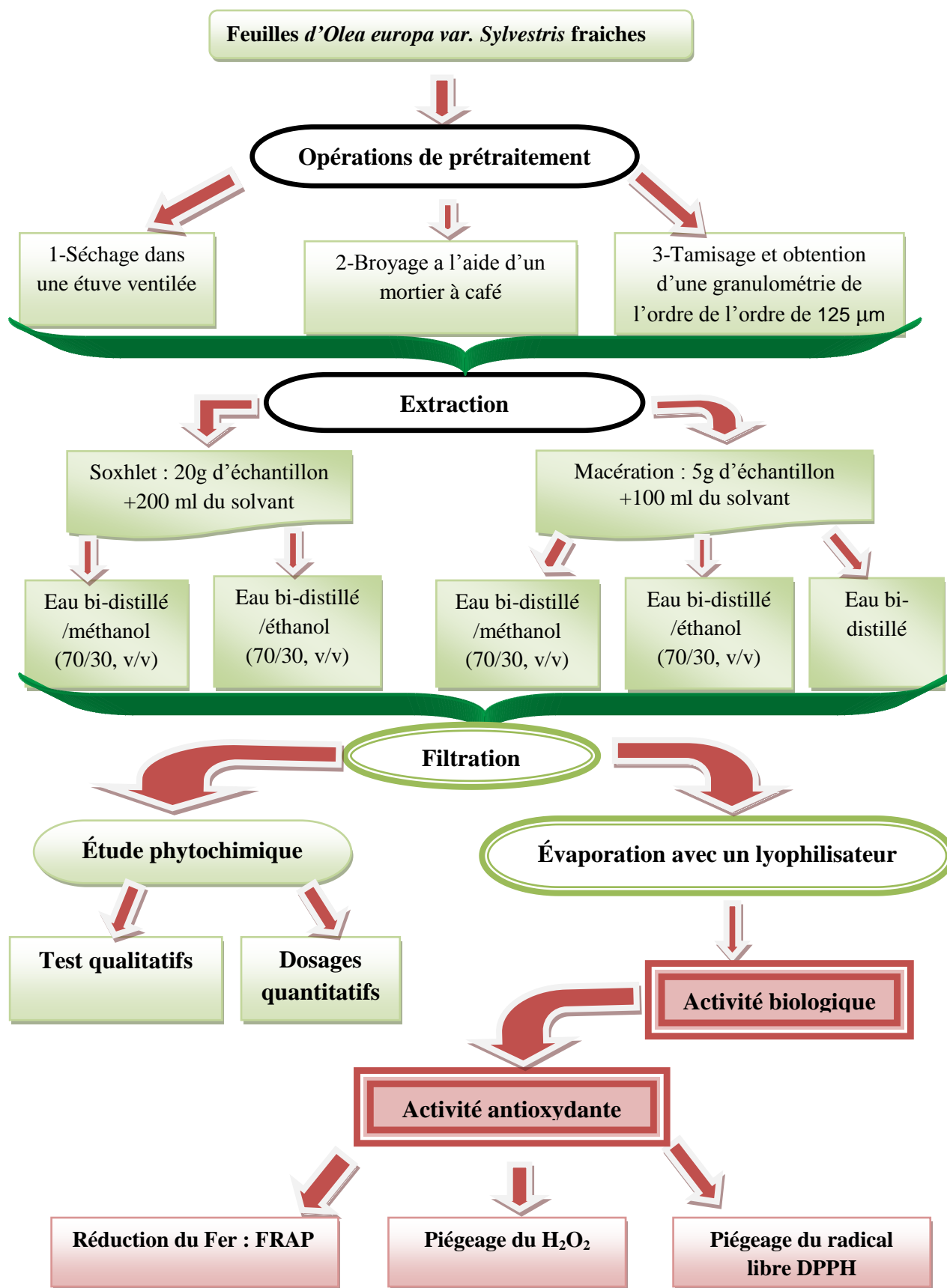


Figure 15 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

II. Méthodes d'analyse

II.1. Taux d'humidité

Le taux d'humidité, dans nos échantillons (la poudre des feuilles sèches de notre plante), a été déterminé par le procédé de dessiccation à une température de 105° C dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'un poids constant (**Linden et Lorient, 1994**).

Considérons :

x : Poids de l'échantillon ;

y : Poids de l'échantillon après déshydratation ;

T % : Taux d'humidité exprimé en pourcentage ;

$$T (\%) = \frac{x-y}{x} \times 100$$

Pour plusieurs mesures, on calcule l'humidité moyenne :

$$T \% (\text{moy.}) = (T_1\% + T_2\% + \dots + T_n \%) / n$$

Moy. : Moyenne ;

T1 % : Humidité de l'échantillon N° 1;

T_n % : Humidité de l'échantillon N° n.

n : Nombre totale d'échantillon ;

II.2. Le Rendement

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec, avec le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme.

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement } (\%) = \frac{M_0}{M_1} \times 100$$

M₀ : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé.

M₁ : Masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

II.3. Etudes phytochimique

II.3.1. Dosage qualitatif

II.3.1.1. Les alcaloïdes : Réactifs de Bouchardt : 2,5 g d'iodure de potassium ; 100 ml d'eau distillée.

À 1 ml de chaque extrait on a ajouté 5 gouttes de réactif de Bouchardt puis on a incubé les tube pendant 15 mn. La présence des alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité brun (Mamadou, 2011).

II.3.1.2. Les composés phénoliques

II.3.1.2.1. Les composés phénoliques simples

- **Flavonoïdes**

On a ajouté quelques gouttes d'Hcl concentré à 5 ml d'extrait plus 3 copeaux de Magnésium. La présence de flavonoïdes due par l'apparition de coloration : rouge, orange ou rose (Karumi et al., 2004).

II.3.1.2.2. Les composés phénoliques complexes

- **Tanins**

Les tanins sont mis en évidence à partir de 1 ml d'extrait placé dans un tube en présence de quelques gouttes de FeCl₃ (1% préparé au méthanol). Après agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiqes (Karumi et al., 2004 ; Gacem, 2011)

- **Quinones libres**

Sur 3 ml de chacun de nos extraits, on ajoute quelques gouttes de soude (NaOH) 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (Oloyde, 2005).

- **Terpénoïdes : Test de Slakowski**

La mise en évidence des stérols et triterpènes est fondée sur la réaction de Lieberman-Burchard.

Les extraits sont additionnés chacun de 0,5 ml d'anhydride acétique puis de 0,5ml de chloroforme, après dissolution, les solutions sont transférées dans des tubes à essai auxquels sont ajoutés 1ml d'acide sulfurique concentré. La réaction est effectuée à froid. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, avec coloration de la couche

surnageante de vert ou de violet, traduit la présence de stérols et de triterpènes (**Bruneton, 1999**).

- **Les saponosides**

Les saponosides sont caractérisés par leurs pouvoir moussant en solution aqueuse qu'on peut exprimer par l'Indice de Mousse (IM) (**Bruneton., 1999**).

Pour la détection des saponosides, une série des dilutions a été préparée pour chaque extrait (10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%). Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire successivement 1,2,3,...,10 ml pour chaque extrait . On a ajusté le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée, puis agité chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde en maintenant le tube fermé à l'aide du pouce. On a Laissé reposer 15 mn et mesurer la hauteur de la mousse dans chaque tube.

Le tube N dans lequel la hauteur de mousse est de 1 cm ou plus sert de base au calcul de l'indice.

L'indice de mousse (IM) est calculé par la formule suivante :

$$\text{IM} = 1000/\text{N}$$

N : nombre de tubes dans lequel la hauteur de mousse est égale ou supérieure à 1 cm.

II.3.2. Dosage quantitatif

II.3.2.1. Dosage de chlorophylle a, b et caroténoïdes

Le dosage de la chlorophylle et des caroténoïdes a été réalisé selon la méthode décrite par **Lichtenthaler, (1982)**. On a mesuré par un spectrophotomètre les absorbances à différentes longueurs d'ondes des extraits dilués à (1/10) : 664 nm pour la chlorophylle a ; 648 concernant la chlorophylle b et 470 nm pour les caroténoïdes. Les concentrations de la chlorophylle a, chlorophylle b et les caroténoïdes dans les extraits ont été calculées selon les formules suivantes :

La chlorophylle a : $C_a (\mu\text{g/ml}) = (13,36 A_{664,1} - 5,19 A_{618,6}) \times 10$

La chlorophylle b : $C_b (\mu\text{g/ml}) = (27,43 A_{618,6} - 8,12 A_{664,1}) \times 10$

Les caroténoïdes : $C_{X+C} (\mu\text{g/ml}) = ((1000 A_{410} - 2,13 C_a - 97,64 C_b) \times 10) / 209$

II.3.2.2. Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

La méthode est celle utilisant le réactif de FolinCiocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux, dont l'absorption maximum est comprise entre 700 et 760 nm (**Boizot et Charpentier, 2006**).

- **Mode opératoire :**

Le dosage des polyphénols des 5 extraits est réalisé selon la méthode décrite par **Vermeris et Nicholson, (2006)**. 0,1 ml de l'échantillon est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% ;

- ✓ Agiter au vortex ;
- ✓ Incuber pendant 5 minutes à température ambiante ;
- ✓ Ajouter 100 μ l de réactif de FolinCiocalteu à 0,2N ;
- ✓ 2ème incubation pendant 30 minutes au bain-marie ;
- ✓ La lecture est faite à 700 nm contre un blanc ;

Les résultats sont exprimés en μ g équivalent d'acide gallique par milligramme de matière végétale sèche (**μ g GAE/mg MS**). Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme standard à différentes concentrations (10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 μ g/ml).

Calculé selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de polyphénols} = a \cdot f / b$$

a : Concentration en polyphénols en mg/ml déterminée à partir de la courbe d'étalon

f : Facteur de dilution ($\times 22$).

b : Concentration initiale de l'extrait (1 mg/ml).

II.3.2.3. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

Les flavonoïdes sont dosés par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et la soude ($NaOH$). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm selon la méthode décrite par **Kim et al., (2003)**.

- **Mode opératoire :**

- ✓ On a mélangés 500 µl de l'échantillon avec 2 ml d'eau distillée ;
- ✓ Ajouter 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 15 % ;
- ✓ Incuber pendant 6 minutes à température ambiante ;
- ✓ Ajouter 150 µl de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 6 H₂O) à 10% ;
- ✓ Incuber pendant 6 minutes à température ambiante ;
- ✓ Additionner de 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 % ;
- ✓ Le volume total est complété à 5 ml d'eau distillée ;
- ✓ Agiter et incuber pendant 15 minutes.

La lecture est faite à 510 nm contre un blanc. Une courbe étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme standard à différentes concentrations (10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 µg/ml).

Les résultats sont exprimés en µg équivalent de catéchine par milligramme de matière végétale sèche (µg GAE/mg MS). Selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de flavonoïdes} = a \cdot f / b$$

a : Concentration des flavonoïdes en mg/ml déterminée à partir de la courbe étalon

f : facteur de dilution (× 10)

b : Concentration initiale de l'extrait (1mg/ml).

II.3.2.4. Dosage des tanins condensés

- **Principe**

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en utilisant la procédure rapportée par **Sun et al., 1998**. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500nm.

- **Mode opératoire :**

Un volume de 500 µl de l'extrait brut est ajouté à 3 ml de la solution vanilline/méthanol (4%) et un volume de 1,5 ml d'acide chlorhydrique. Le mélange a été laissé au repos au bain marie réglé à 30°C pendant 20 minutes. L'absorbance est mesurée à 500nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats obtenus sont exprimés en $\mu\text{g GAE/mg MS}$.

II.4. Activité antioxydante

II.4.1. Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Pan et al., 2008**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe de ferrocyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en Fe^{2+} (**fig. 16**). La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}). Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle d'un composé. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700nm.

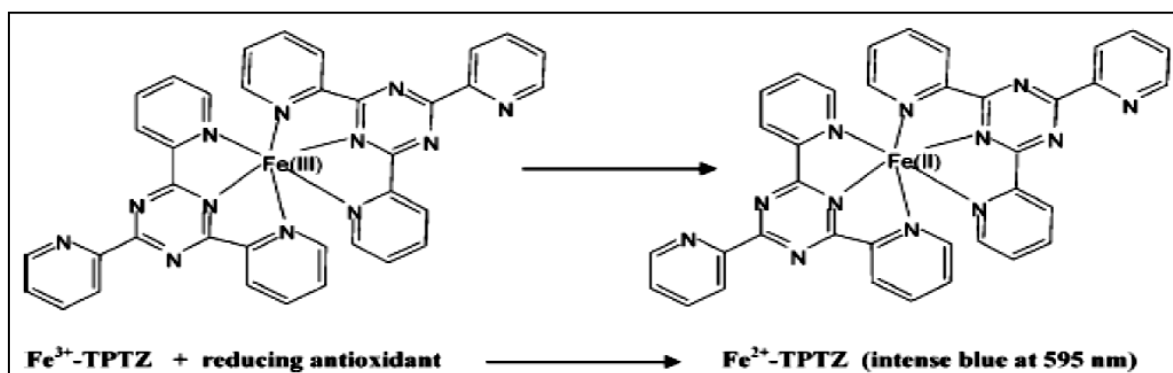


Figure 16 : Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric reducing antioxidant power). TPTZ : ferric2,4,6-tripyridyl-s-triazine. Fe^{2+} : Ions ferreux ; Fe^{3+} : Ions ferriques (**Prior et al., 2005**).

- **Mise en oeuvre pratique**

Un volume égal à 1ml de l'échantillon à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 mg/mL) est mélangé avec 2,5 millilitres d'une solution tampon phosphate 0,2M (pH = 6.6) et 2,5 millilitres d'une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50° C pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Ensuite, 2,5 millilitres d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. 2,5 millilitres du surnageant sont ajoutés à 2,5 millilitres d'eau distillée et 500 μl d'une solution de ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0,1% sont ajoutés également au mélange (**Prior et al., 2005**).

La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

- **Expression des résultats**

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

II.4.2. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'U.V.

Comme la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piégeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue également.

Néanmoins, il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche (**Malgalhaes et al., 2008**).

La réalisation d'une telle méthode nécessite beaucoup de rigueur au moment de la manipulation.

- **Mise en oeuvre pratique**

Pour étudier l'activité du piégeage du H₂O₂, nous avons utilisé la méthode décrite par **Ruch et al., 1989 ; Shon et al., 2008**.

Un volume de 3,4 millilitres de l'extrait brut de chaque extrait à la concentration de 0,1µg / millilitre, préparé dans une solution tampon phosphate à 0,1M (pH = 7,4) sont mélangés avec 600 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 43mM (préparée dans le même tampon phosphate).

La réaction des échantillons avec le peroxyde d'hydrogène est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre à 230 nm pendant 40 minutes à 10 minutes d'intervalle.

Dans les mêmes conditions opératoires, le BHA (butylhydroxyanisole), à la même concentration choisie, est utilisé comme contrôle positif.

- **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ du piégeage du H}_2\text{O}_2 = [(AC - AT) / AC] \times 100$$

AC : Absorbance du contrôle ; AT : Absorbance du test.

II.4.3. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Bozin *et al.*, 2008).

La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle est indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire le radical DPPH (fig. 17). La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde.

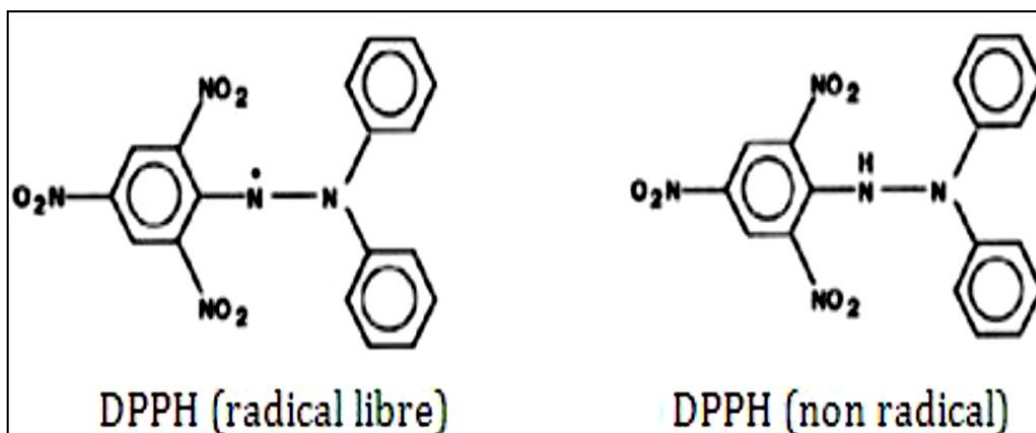


Figure 17 : Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995).

- **Mise en oeuvre pratique**

Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH, est celui de Benhammou *et al.*, 2007.

A différentes concentrations, 25 µl de chaque extrait, sont ajoutés à 1975 µl d'une solution éthanoïque de DPPH à 6,34.10⁻⁵ M (0,0025g dans 100 ml méthanol) ; pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce

dernier est préparé, en parallèle, en mélangeant 25 µl d'éthanol avec 1975 µl d'une solution éthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à la température ambiante, la réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution.

La lecture des absorbances est effectuée à 515nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

- **Expression des résultats**

- **Calcul des pourcentages d'inhibition**

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I\% = [(AC-AT)/AC]*100$$

AC : Absorbance du contrôle ;

AT : Absorbance du test effectué.

- **Calcul des IC₅₀**

IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 %, est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH•. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées (**Fabri et al., 2009**).

Chapitre 5

Résultats et discussion

I. Taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % (Paris et Moyse, 1965). Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans les feuilles sèches de notre plantes. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité inférieure à 10% (fig. 18), avec une proportion de 5 %. La teneur en eau, doit être inférieure à 10%, ce qui confère à notre poudre une meilleure conservation à long terme.

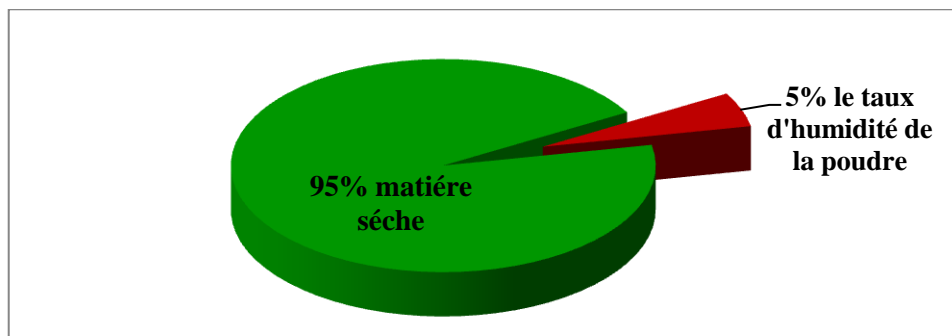


Figure 18 : Teneur en humidité des feuilles sèches de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

II. Rendements des extraits bruts

Après avoir effectué la préparation des extraits, on les récupère et on calcule le rendement, le **tableau 3** résume les différents résultats.

Tableau 3: Rendement des extraits obtenus par extraction macération et Soxhlet des feuilles de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

Les extraits	Rendements (%)
Soxhlet éthanol	14,34
Soxhlet méthanol	22,44
Macération éthanol	40,66
Macération méthanol	33,84
Macération aqueuse	28,942

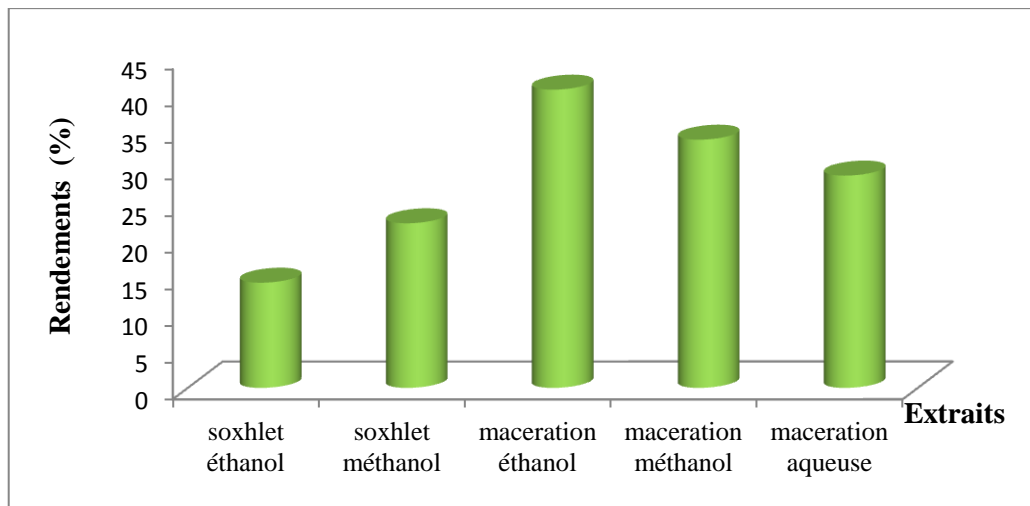


Figure 19 : Rendements des extraits par macération et Soxhlet pour l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

On remarque que le rendement le plus élevé (**fig. 19**) est obtenu pour la méthode d'extraction par macération à froid. L'extraction par éthanol représente le rendement le plus élevé 40,66%, suivi par l'extraction par méthanol 33,84 % ensuite l'extraction aqueuse 28,942 %.

La méthode d'extraction par reflux à température 70°C a présenté un rendement relativement faible par rapport aux extraits obtenus par macération, le meilleur rendement est obtenu pour l'extrait méthanolique (22,44%) suivi par l'extrait éthanolique (14,34%).

Nous pouvons donc dire que l'extraction par macération en utilisant l'éthanol est la méthode adéquate pour extraire les polyphénols du l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*). Donc le choix du solvant et des méthodes d'extraction est primordial, il joue un rôle déterminant sur la quantité ainsi que sur le type de composés phénoliques à extraire.

L'extraction peut être influencée par le solvant, la méthode et le temps d'extraction mais aussi par la taille des particules, les conditions de préparation des échantillons, la durée et les conditions de stockage.

III. Etude phytochimique

III.1. Tests qualitatifs

La phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques, réalisée sur les extraits reconstitués à partir de la poudre lyophilisée de chaque échantillon végétal, génère pour une première estimation des données préliminaires sur les constituants des extraits. Ces tests permettent de déterminer à

quelle famille chimique appartiennent les composés isolés, facilitant ainsi la détermination future de leurs structures.

Le criblage phytochimique est consigné dans le **tableau 4**, il révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolite secondaire existants dans les cinq extraits obtenus à partir des feuilles de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*). en utilisant les différentes techniques d'extractions (soxhlet méthanol et éthanol ; macération avec du méthanol, avec du l'éthanol et avec l'eau bi-distillée).

Tableau 4: Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les différents extraits de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

Familles chimiques		Extraits				
		Soxhlet		macération		
		méthanol	éthanol	méthanol	éthanol	aqueuse
Les alcaloïdes		-	-	-	-	-
Les composés phénoliques	Flavonoïdes	+++	+++	+++	+++	+++
	Tanins	+++	+++	+++	+++	++
Quinones libres		+	+++	+++	++	+++
Terpénoïdes		+++	+++	++	++	++
Saponosides	100%	1	1.1	0	1.5	1.1
	90%	1.3	1.4	0.4	0.6	0.9
	80%	1.4	1.4	0.2	2	0.7
	70%	1.4	1.4	0.7	2	0.9
	60%	1.3	1.3	0.6	3.2	0.6
	50%	1.1	1.2	1.2	2.1	0.7
	40%	1.2	1.3	1.6	1.8	0.9
	30%	1.4	1.3	1.8	3.3	0.6
	20%	1.6	1.7	1.6	2.2	0.6
	10%	1.1	1.5	1.2	2.1	0.7
IM	100	100	200	111.11	1000	

(+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

D'après les résultats obtenus, nous remarquons la présence des flavonoïdes (**fig. 24**), des tanins (**fig. 21**), des quinones libres (**fig. 20**), des terpénoïdes (**fig. 23**) et des saponosides (**fig. 22**). Nous observons aussi l'absence des alcaloïdes (**fig. 25**) dans les différents extraits de l'olivier sauvage. L'analyse de ces résultats ne permet pas de mettre des conclusions définitives sur le solvant et la méthode d'extraction qui donne une meilleure caractérisation des composés phytochimiques existantes dans nos extraits.

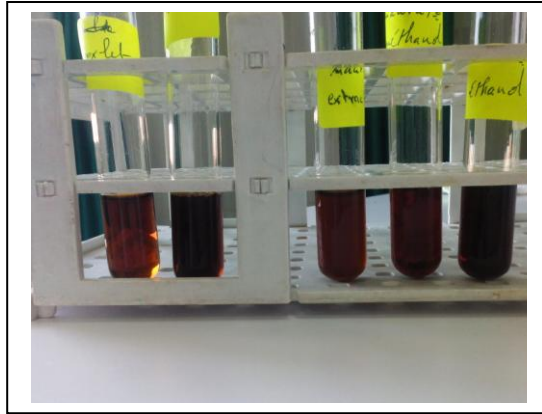


Figure 20: La présence des quinones libre dans les extraits indiqués par une couleur qui vers au jaune, rouge ou violet.



Figure 21: La présence des Tanins libre dans les extraits indiqués par une couleur verte ou bleu noir.



Figure 22: La présence des saponosides dans les extraits indiqués par la mousse.

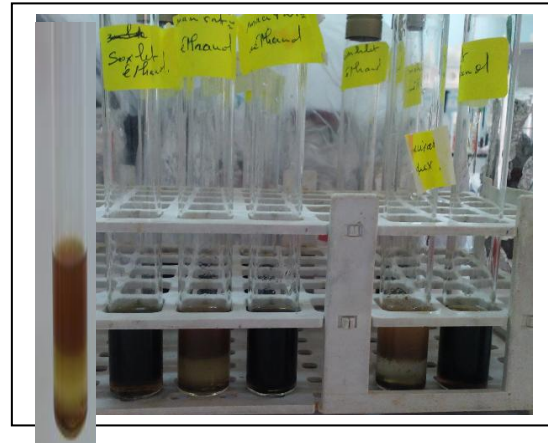


Figure 23: La présence des Terpénoides dans les extraits indiqués par la fromation d'un anneau rouge, brunâtre ou violet.

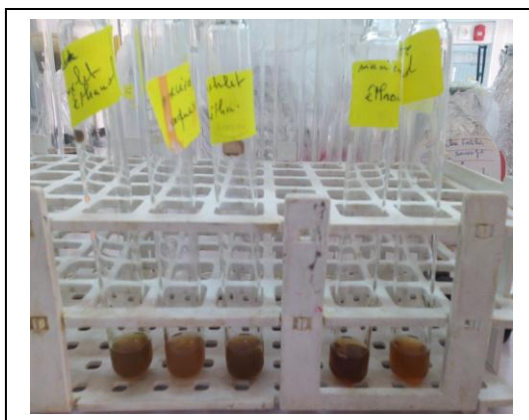


Figure 24: La présence des flavonoïdes dans les extraits indiqués par une couleur rouge, orange ou rose.



Figure 25: L'absence des alcaloïdes dans les extraits indiqués par l'absence d'un précipité brun.

III.2. Dosage quantitatif

III.2.1. Dosage de chlorophylle a, b et caroténoïdes

Le dosage de la chlorophylle et des caroténoïdes a été réalisé selon la méthode décrite par **Lichtenthaler, (1982)**. Les résultats sont présentés dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Les teneurs de la chlorophylle a, b et des caroténoïdes dans les extraits de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

Extrait	La teneur en chlorophylle a (mg)	La teneur en chlorophylle b (mg)	La teneur en caroténoïdes (mg)
Soxhlet méthanol	19,65	53,60	4,90
Macération méthanol	7,25	9,19	6,64
Soxhlet éthanol	4,81	10,19	3,52
Macération éthanol	11,74	15,44	15,97
Macération aqueuse	13,88	14,14	4,83

Le **tableau 5** montre que la teneur de la chlorophylle a et b est très élevée dans l'extrait méthanolique par la méthode Soxhlet, donc cet extrait ne va pas me donner des bons résultats à cause du taux de la chlorophylle. Par contre le taux le plus élevé des caroténoïdes est enregistré par la macération éthanol, sachant que les caroténoïdes ont une forte activité antioxydante (**fig. 26**).

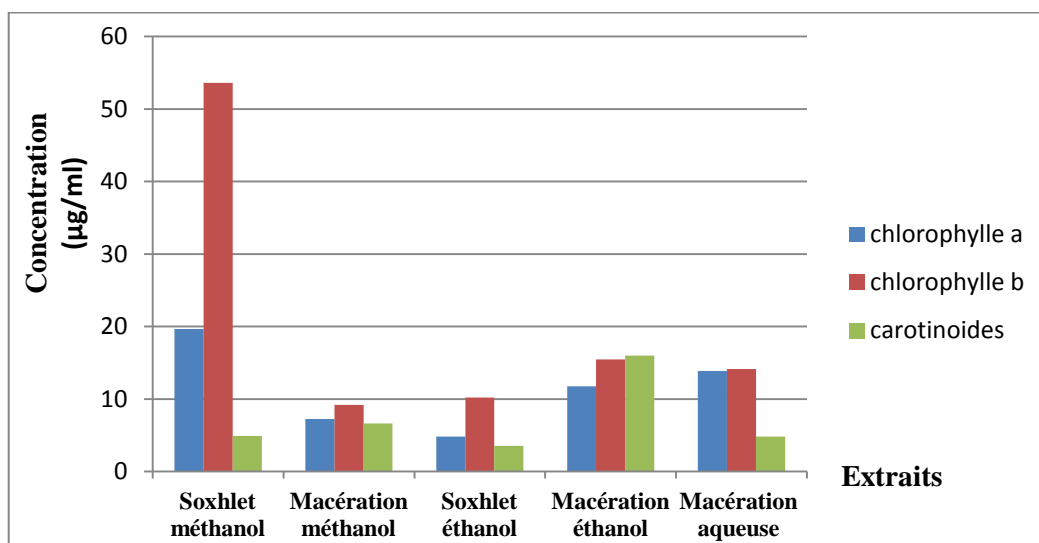


Figure 26 : Les teneurs des extraits de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*) en chlorophylle a, chlorophylle b et caroténoïdes.

III.2.2. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins

L'étude quantitative des extraits bruts, préparés à partir des feuilles de *Olea europea var. Sylvestris* au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes et des tanins. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques de plante leur est attribué surtout leur activité antioxydante. Trois droites d'étalonnages (**fig. 27, 30 et 32**) ont été tracées pour cet objectif, et qui sont réalisées avec des solutions d'étalons à différentes concentrations.

Les quantités des polyphénols, des flavonoïdes et les tanins correspondants ont été rapportées en microgramme d'équivalents de l'étalon utilisé par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EE/mg d'extrait}$) et déterminés par l'équation de type : $y = a x + b$.

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**) et l'acide gallique a été utilisé comme étalon (**fig.27**). Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (**Kim et al., 2003**) et la catéchine a été utilisé comme étalon (**fig. 30**). Le dosage des tanins a été effectué selon la méthode à la vanilline (**sun et al. 1998**), et l'étalon a été la quercétine (**fig. 32**). Les résultats sont représentés dans le **tableau 7**.

- **Les polyphénols totaux**

La courbe d'étalonnage réalisée avec l'étalon acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux est représentée dans la **figure 27**.

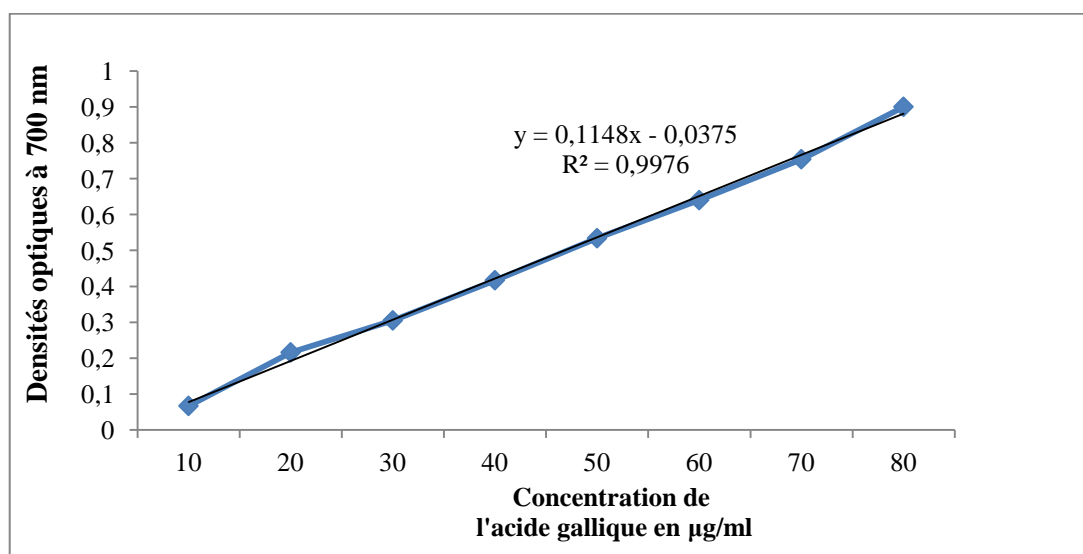


Figure 27: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

La teneur des polyphénols totaux dosés dans chaque extrait est présentée dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Résultats du dosage de polyphénols, des flavonoïdes totaux et des tanins des extraits de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

Les extraits	Les polyphénols		Concentrations des flavonoïdes en µg GAE/mg de matière sèche	Concentration des tanins en µg GAE/mg de matière sèche
	Concentrations en µg GAE/mg de matière sèche	Rendements (%)		
Soxhlet méthanol	72,15	0,36	43,08	13,10
Macération méthanol	65,64	1,31	35,18	10,65
Soxhlet éthanol	68,51	0,34	37,70	8,11
Macération éthanol	74,26	1,49	32,66	16,19
Macération aqueuse	44,56	0,89	24,84	1,71

Les résultats enregistrés dans le **tableau 6** indiquent une variabilité des teneurs en phénols totaux dans les différents extraits de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*) (**fig. 28**). Cette variabilité dépend de la méthode et de solvant d'extraction.

La quantité la plus élevée a été détectée dans l'extrait éthanolique macéré, elle est de l'ordre de 74,26 µg GAE/mg MS avec un rendement de 1,49 % (**fig. 29**), suivis par les extraits obtenus par la méthode Soxhlet : l'extrait méthanolique (72.15 µg GAE/mg MS, et un rendement de 0,36 %), et l'extrait éthanolique (44,56 µg GAE/mg MS, et un rendement de 0,34 %). Puis l'extrait méthanolique par macération avec une concentration de 65,64 µg GAE/mg MS et un rendement de 1,31%. La plus faible teneur des phénols totaux a été détectée dans l'extrait aqueux avec une concentration de 28,942 µg GAE/mg MS et un rendement de 0,89 %.

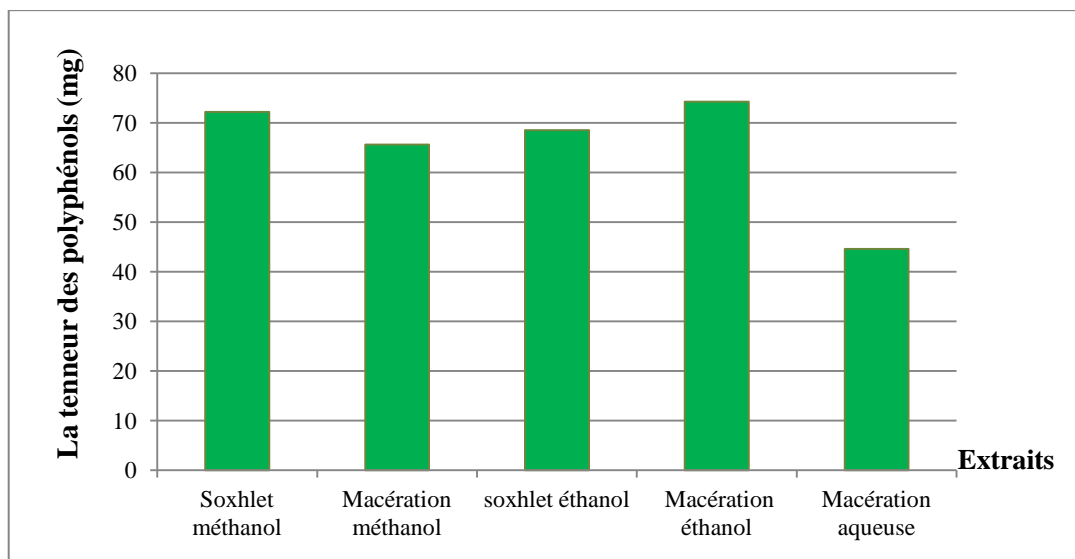


Figure 28 : Les teneurs en polyphénols totaux dans les cinq extraits étudiés de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

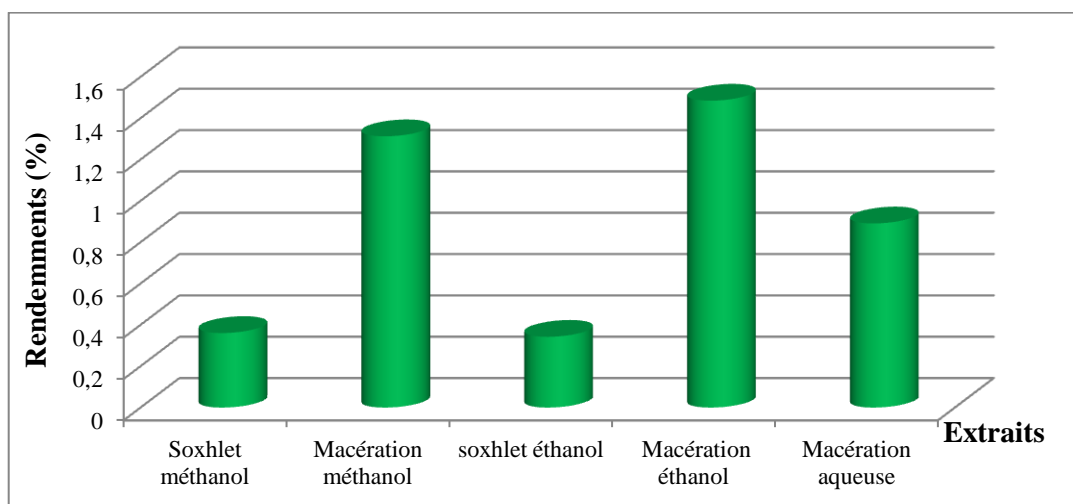


Figure 29 : Les rendements en polyphénols des extraits par rapport à la poudre utilisée de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

Les figures 28 et 29 montrent que les teneurs en polyphénols totaux est différentes dans les divers extraits de l'*Olea europea var. Sylvestris*. Cette différence pourrait être expliquée par la nature du solvant utilisé et la méthode d'extraction.

- **Les flavonoïdes**

La teneur sont exprimées en μg d'équivalent catéchine par mg de matière sèche (μg EC/mg MS). La courbe d'étalonnage utilisée pour calculer ces teneurs est représentée dans la figure ci-après.

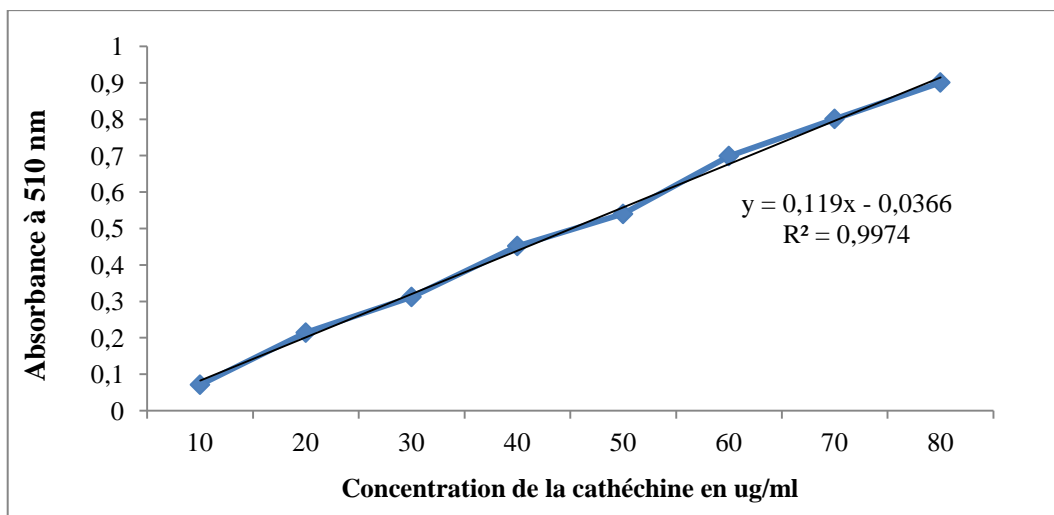


Figure 30 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Les résultats de dosage des flavonoïdes sont représentés sur la **figure 30**

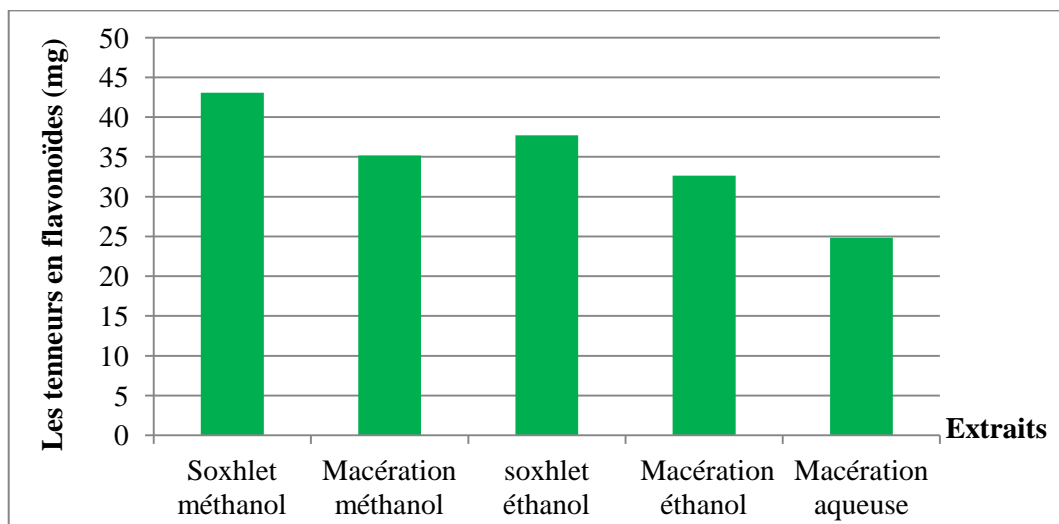


Figure 31: Les teneurs en polyphénols totaux dans les cinq extraits étudiés de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

La teneur en flavonoïdes totaux est variable, et diffère d'un extrait à un autre. Les résultats indiquent que la méthode Soxhlet, comparé à l'extraction par macération, présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes, dont l'extrait méthanolique donne la plus grande concentration qui est de 43,07 µg EC/mg MS, suivi par l'extrait éthanolique avec une concentration de 37,70 µg EC/mg MS. Pour la macération c'est le méthanol qui donne la teneur la plus élevée avec 35,18 µg EC/mg MS, puis l'éthanol avec 32,66 µg GAE/mg MS et en fin, l'eau avec 24,84 µg GAE/mg MS.

- Les tannins

La teneur des tanins a été déterminée à partir d'une courbe réalisée avec la quercitrine (**fig. 32**). Les résultats sont exprimés en μg d'équivalent quercitrine par mg de la matière sèche ($\mu\text{g EQ/mg MS}$).

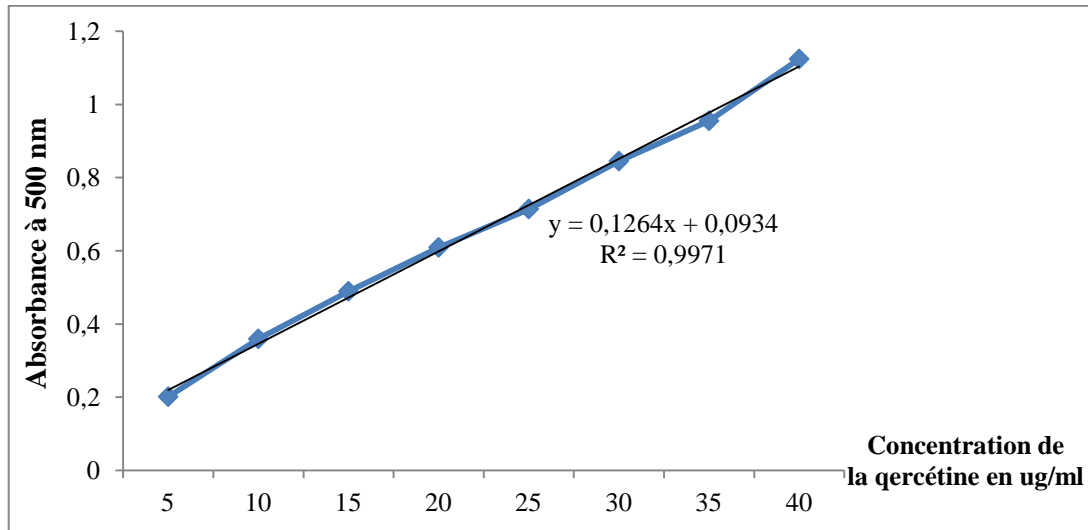


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.

La teneur des tannins dans les différents extraits est donnée dans la **figure 33**.

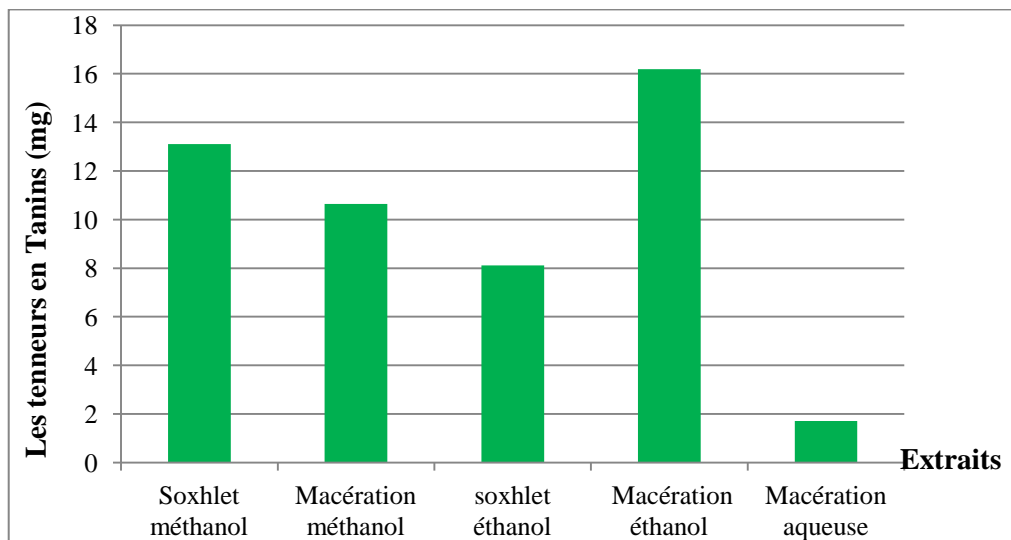


Figure 33 : Les teneurs en Tanins dans les cinq extraits étudiés de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

D'après les résultats qui sont représentés la **figure 33**. La macération par éthanol a donné la teneur la plus élevée de 16,19 $\mu\text{g EQ/mg MS}$, puis Soxhlet méthanol 13,10 $\mu\text{g EQ/mg MS}$.

GAE/mg MS, suivi par macération méthanol 10,65 µg GAE/mg MS, et Soxhlet éthanol 8,12 µg GAE/mg MS et en fin, macération aqueuse 1,71 µg GAE/mg MS.

Les polyphénols, classe de molécules plutôt hydrosolubles, sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte. Selon Mohammedi et Atik, (2011), l'utilisation de solvants mixtes aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols. La supériorité des solvants mixtes seraient dues à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans les extraits obtenus par des solvants mixtes comparés à ceux obtenus par des solvants purs (Trabelsi et al., 2010). Ainsi, les solvants qui ont été retenus pour notre étude sont le méthanol/eau (70/30, v/v) et l'éthanol/eau (70/30, v/v), dont la polarité sera qualifiée d'intermédiaire, et l'eau dont la polarité est la plus élevée, ce qui nous a permis d'avoir des quantités élevés des polyphénols.

L'extrait éthanolique par macération a donné la plus grande valeur en composés phénoliques et des Tanins, donc pour extraire les polyphénols et les tanins veulent mieux d'utiliser la macération par le solvant hydroéthanolique. Tandis que, l'extrait hydrométhanolique par méthode Soxhlet a donné la valeur la plus élevée des flavonoïdes, donc pour extraire les flavonoïdes veulent mieux d'utiliser la méthode Soxhlet avec le méthanol comme solvant.

En comparant le pourcentage des flavonoïdes et des tanins dans les polyphénols dans tous les extraits (tableau 7), nous remarquons que les flavonoïdes représente le plus grand pourcentage, comparant aux tanins qui sont faibles et le reste est représenté par d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques que celles des flavonoïdes et des tanins (acides phénoliques, Quinones libres...) (fig. 34), Ceci nous laisse à penser que les polyphénols sont représentés surtout par la famille des flavonoïdes qui a donné une coloration (rose, orange ou rouge) dans l'examen phytochimique.

Tableau 7: Le pourcentage des Tanins et des flavonoïdes dans les polyphénols.

Les extraits	% des Tanins	% des Flavonoïdes	% d'autres polyphénols
Soxhlet méthanol	18,16	59,70	22,14
Macération méthanol	16,22	53,59	30,18
Soxhlet éthanol	11,85	55,02	33,13
Macération éthanol	21,80	43,97	34,23
Macération aqueuse	3,84	55,75	40,41

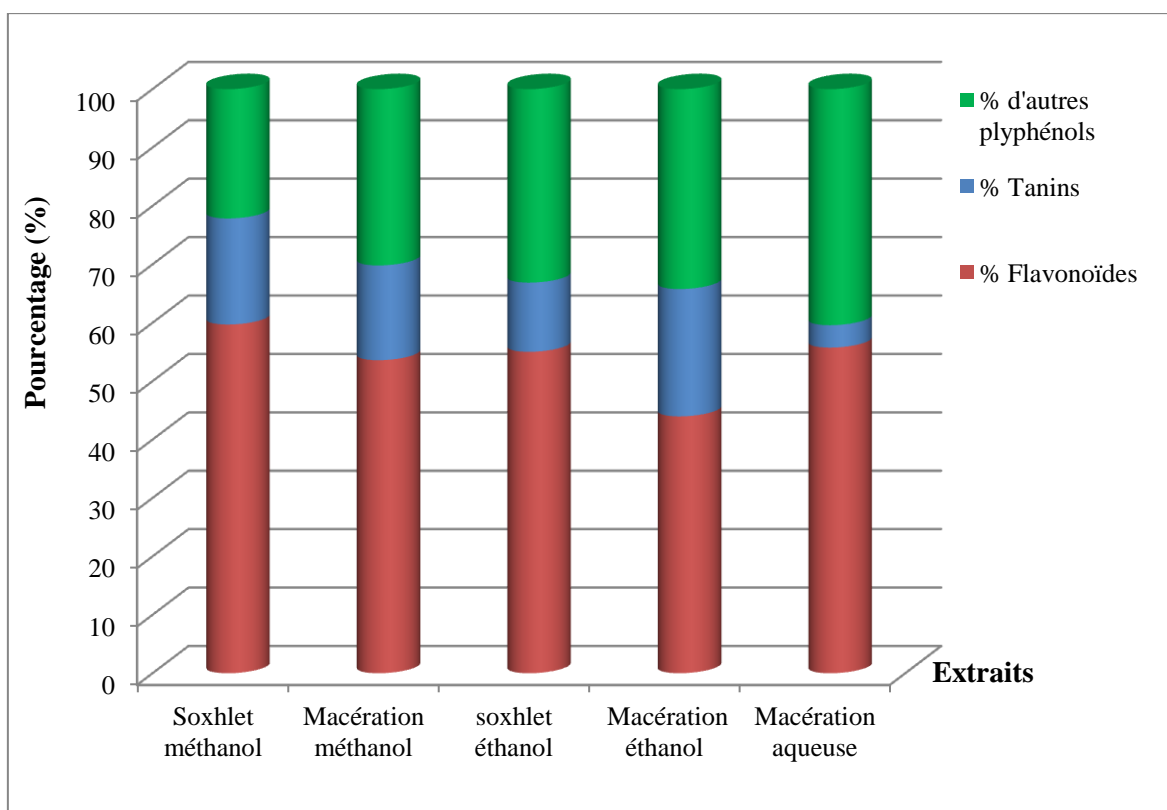


Figure 34 : Représentation des pourcentages des flavonoïdes et des tanins dans les polyphénols totaux pour les différents extraits.

D'après les résultats obtenus de l'examen phytochimique qualitatif et quantitatif, on constate que l'olivier sauvage est riche en polyphénols qui sont connus pour leurs différentes activités dont l'activité antioxydante. Par conséquent, nous nous sommes intéressés au pouvoir antioxydant des extraits bruts des feuilles d'*Olea europea* var. *sylvestris*.

IV. Activité antioxydante

IV.1. Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant power)

La réduction du fer c'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} (Karagozler *et al.*, 2008).

Une étude récente faite sur cette capacité de réduction du fer par les polyphénols des plantes a indiquée que le noyau catéchol est la structure qui est associée positivement dans le pouvoir réducteur et selon cette étude cette structure augmente le pouvoir réducteur

d'un composé à 36% par rapport à un autre qui n'en contient pas. Ils ont suggéré que cette activité a été due à la participation des groupements –OH liés au noyau catéchol.

L'activité des groupements –OH du catéchol peut être modulée par une variété de substituant sur le noyau aromatique. Par exemple, la substitution sur le noyau phénolique d'un groupement donneur d'électron ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$, ou d'autre substituant aliphatiques) promouvra des réactions dans lesquelles les noyaux phénoliques acquièrent une tendance de donner des électrons via un groupement –OH, et finalement augmentent leur capacité de réagir comme des réducteurs. D'autre part, la double liaison dans le substituant aliphatique conjuguée avec le noyau aromatique diminue la réactivité du groupement –OH (DeGraf-Johnson *et al.*, 2007).

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les différents extraits. Les valeurs obtenues pour les différentes concentrations testés (0,05 mg/l ; 0,1 mg/l ; 0,2 mg/l, 0,4 mg/l, 0,6 mg/l, 0,8 mg/l, 1 mg/l) sont représentés sur le **graphe n° 35**.

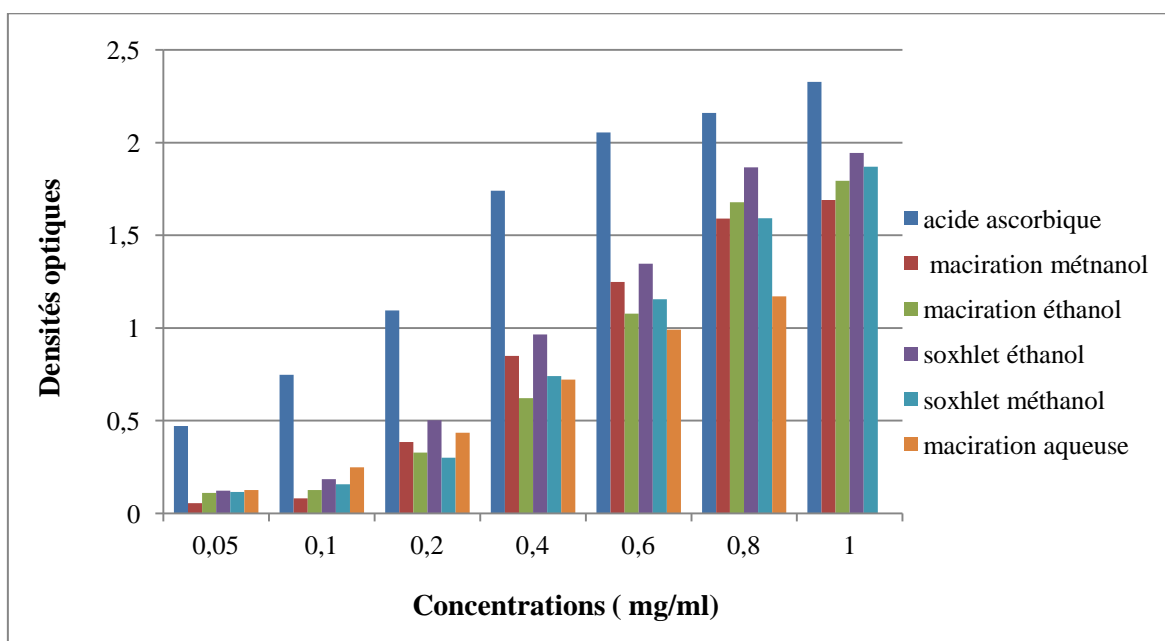


Figure 35 : Le pouvoir réducteur de tous les extraits de l'olivier sauvage (*Olea europaea var. Sylvestris*) en fonction de différentes concentrations.

Les résultats représentés dans les **figures (36)** indiquent en premier lieu que la capacité de réduction diffère d'un extrait à un autre, et en deuxième lieu ils indiquent que la capacité de la réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

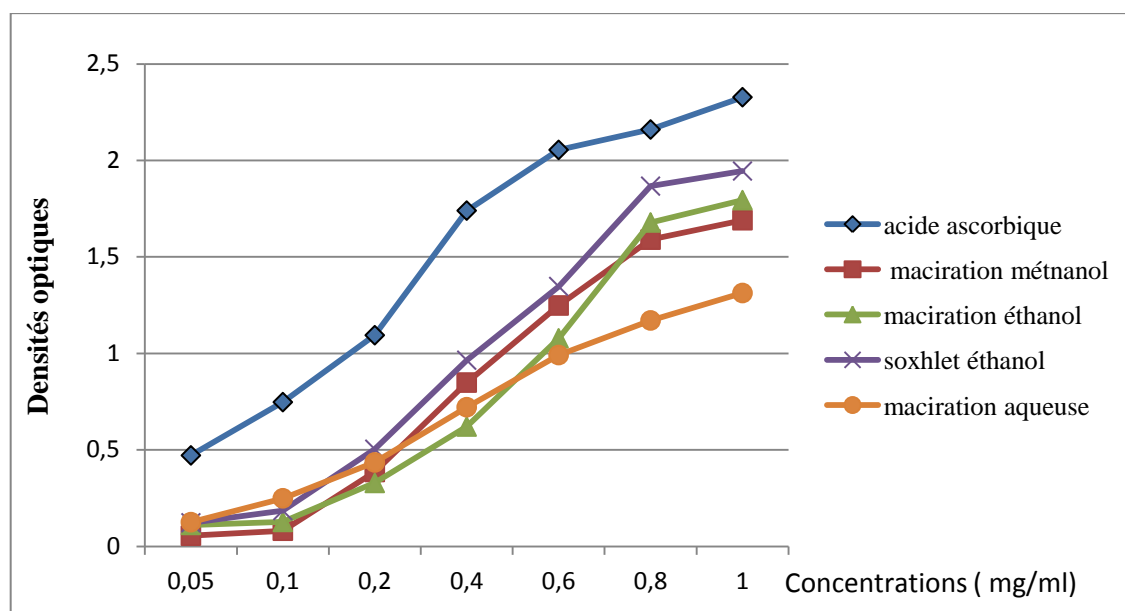


Figure 36: Pouvoirs réducteurs des extraits de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*) et de l'acide ascorbique.

Nous remarquons sur la **figure (36)**, que tous nos extraits présentent des activités antioxydantes proche de celle de la référence (acide ascorbique), pour ce dernier la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 1 mg/ml. Cette réduction est faite grâce à la richesse de nos extraits en polyphénols et elle est beaucoup plus importante dans l'extrait Soxhlet éthanol (DO = 1,94) avec un écart moyen de 0,52. Suivi par soxhlet éthanol (DO = 1,87), puis macération éthanol (DO = 1,79) et macération méthanol (DO= 1,69), et en fin l'eau qui a présenté une faible activité (DO = 1,31).

Les résultats de cette étude indiquent que cette plante peut être utilisée comme source naturelle d'antioxydants, facilement accessible.

IV.2. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène

Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas un radical libre proprement dit, mais il représente une source importante des radicaux libres hydroxyles qui sont toxiques, surtout en présence d'ions métalliques comme le cuivre ou le fer. Aussi, le peroxyde d'hydrogène peut traverser les membranes cellulaires et peut donc oxyder et endommager de nombreux composés cellulaires.

Dans la présente étude, on soumet cette molécule qui est plutôt toxique à l'effet des antioxydants (concentration égale à 0,1 µg/mL) présents dans les extraits végétaux et on suit l'évolution de la réaction en fonction du temps (40 minutes) puis on calcule le pourcentage du piégeage du H₂O₂.

La diminution de ce pourcentage est proportionnelle à la diminution de l'absorbance. Cette dernière est due à la molécule de H_2O_2 qui absorbe dans l'UV à 230 nm (Magalhaes *et al.*, 2008).

Les résultats relatifs au piégeage du H_2O_2 par les différents extraits sont récapitulés dans le **tableau 8**. Les résultats montrent qu'au cours de la cinétique (40 minutes) l'absorbance à 230 nm diminue en fonction du temps (**fig. 37**). Cela prouve que le peroxyde d'hydrogène cause de cette absorbance, est bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas un radical libre proprement dit, mais il représente une source importante des radicaux libres hydroxyles qui sont toxiques, surtout en présence d'ions métalliques comme le cuivre ou le fer.

Tableau 8 : Cinétique de l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits pour l'*Olea europea var. Sylvestris* (les valeurs représentent les pourcentages d'inhibitions).

Les extraits	Le temps (min)				
	0	10	20	30	40
Macération méthanol (MM)	55,37	53,67	50,85	47,46	44,63
Soxhlet méthanol (SM)	51,98	49,71	48,59	46,33	42,37
Macération éthanol (ME)	56,50	52,54	48,02	41,81	36,72
Soxhlet éthanol (SE)	47,46	45,20	38,42	33,90	27,68
Macération aqueuse (MA)	46,33	40,11	35,59	32,77	29,38
Butylhydroxyanisole (BHA)	58,20	56,50	53,67	48,02	45,20

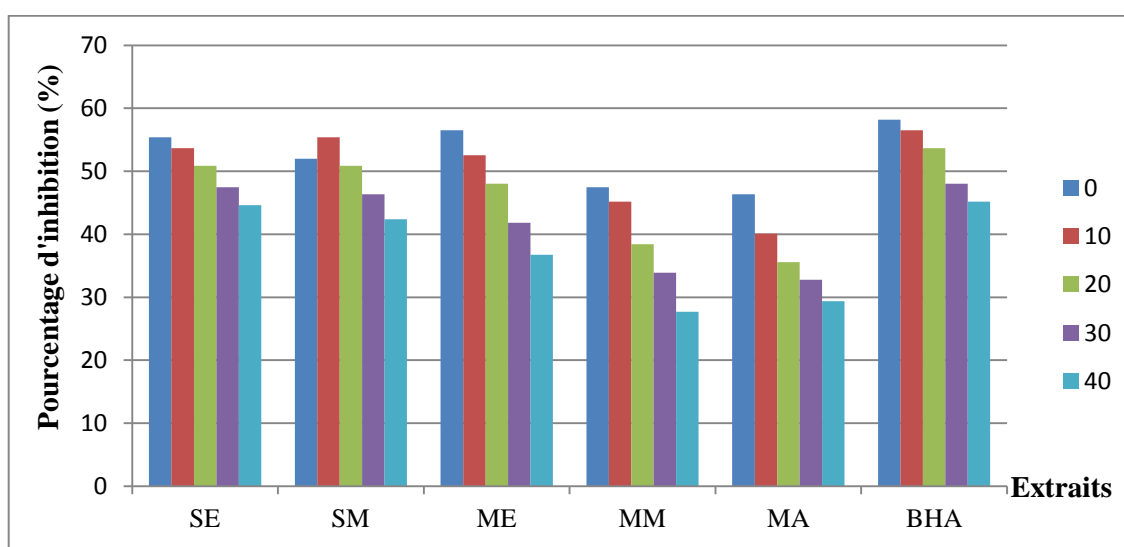


Figure 37 : Les résultats des pourcentages d'inhibition de H_2O_2 par les extraits de l'*Olea europea var. Sylvestris* en fonction du temps

Dans l'étude menée par **Shon et al., (2007)**, les auteurs utilisent les valeurs obtenues à t_0 et comparent l'activité des extraits par rapport au contrôle positif ; type d'expression de résultats que nous avons adoptés dans notre cas. La **figure 38** montre les pourcentages de piégeage du peroxyde d'hydrogène trouvés à t_0 pour les différents extraits étudiés et celui du BHA.

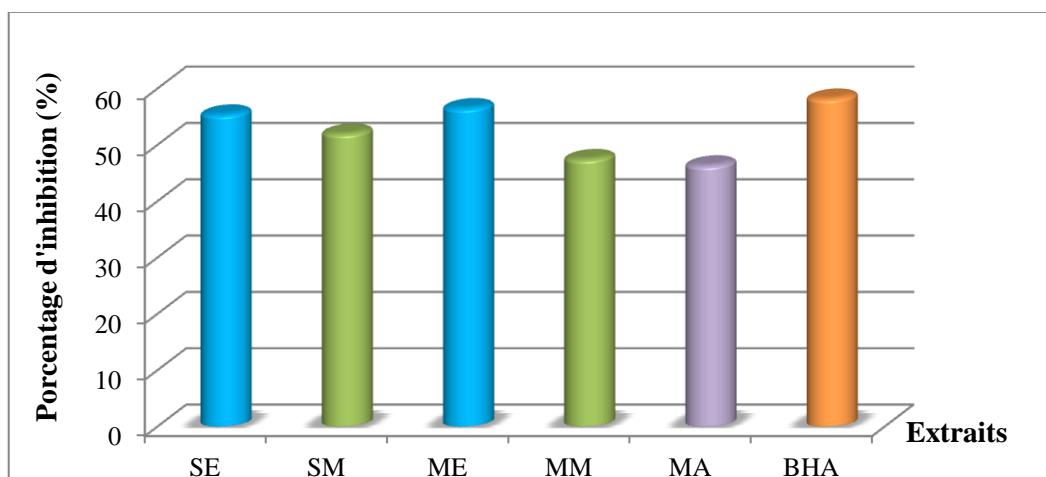


Figure 38: Les pourcentages de piégeage peroxyde d'hydrogène pour les différents extraits étudiés comparés à celui du BHA ($t=0$).

A la concentration utilisée ($0,1 \mu\text{g/mL}$) et au temps initial ($t=0$), les extraits de la plante étudiée ont une bonne activité pour le piégeage de H_2O_2 avec les pourcentages d'inhibition suivants : 56,5% pour macération éthanol; 55,37% pour macération méthanol, 51,97 pour Soxhlet méthanol, 47,46 pour Soxhlet éthanol et 46,33% pour macération aqueuse respectivement comparativement au contrôle positive BHA qui exerce un effet avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 58,22%.

IV.3. Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (**Bozin et al., 2008**). L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin BHT (antioxydant de référence).

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits (**figs. 39**). D'après les figures, on remarque aussi que les courbes sont la même allure. Plus on augmente la concentration, plus l'activité antiradicalaire augmente jusqu'à atteindre un palier. Au-delà de ce maximum, l'activité reste constante. Nous interprétons ce phénomène par le transfert de(s) électron(s) célibataire(s) qui sont localisés dans l'orbitale donnée, l'antioxydant va réagir complètement avec le radical, et quand nous augmentons la concentration, l'activité antioxydante reste constante puisque cela s'accompagne par la saturation des couches électroniques du radical (Ghedadba et al., 2004).

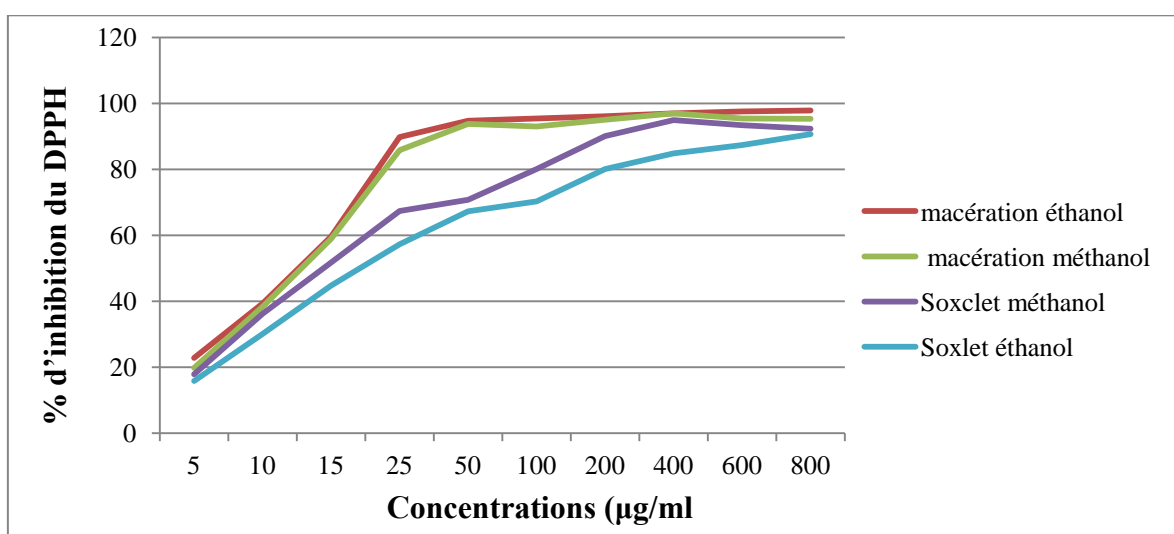


Figure 39 : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

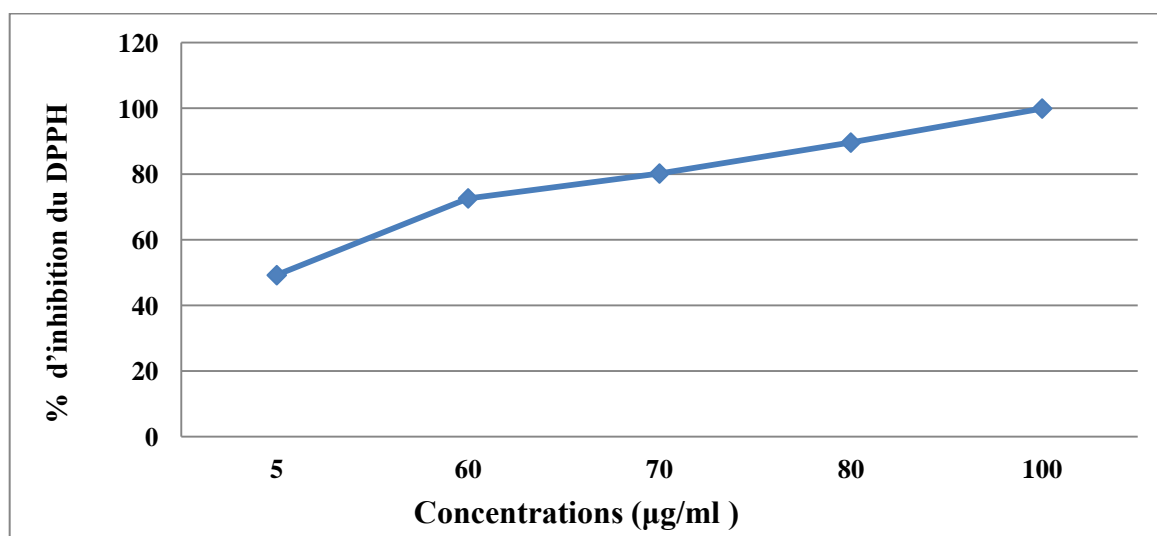


Figure 40 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour BHT.

Les résultats rapportés dans la **figures 39** ; indiquent que l'extrait éthanolique par macération a montré l'activité la plus élevée avec de faibles concentrations par rapport aux autres extraits. Pour 800 µg/ml, l'extrait éthanolique a atteint un pourcentage d'inhibition de 97,89%. À cette même concentration, l'extrait méthanolique par macération produit un pourcentage d'inhibition de 95,31%, puis l'extrait méthanolique par Soxhlet avec un pourcentage de 92,31 % , alors que l'extrait éthanolique par Soxhlet a présenté le plus faible pourcentage d'inhibition de 90,72%. Le BHT a présenté le meilleur pourcentage d'inhibition par rapport aux extraits des feuilles de l'olivier sauvage, il a produit un pourcentage d'inhibition de 99,58% à une concentration de 100 µg/ml (**fig. 46**).

Pour les testes utilisant les radicaux les résultats sont souvent exprimés en IC 50 qu'est défini comme étant la concentration d'extrait pour la quelle la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50 % de l'activité de DPPH ; une valeur plus faible de l'IC50 indique une activité antioxydante plus élevée. Ainsi une valeur faible de IC 50 indique une activité anti-oxydante importante (**Kadri et al., 2011**).

De ce fait nous avons déterminé pour les quartes extraits la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH ou IC50. À partir des équations des régressions linéaires, nous avons calculé les IC50 des extraits des feuilles de l'olivier sauvage. Les valeurs des IC50 sont représentées dans **la figure 47** et le **tableau 9**.

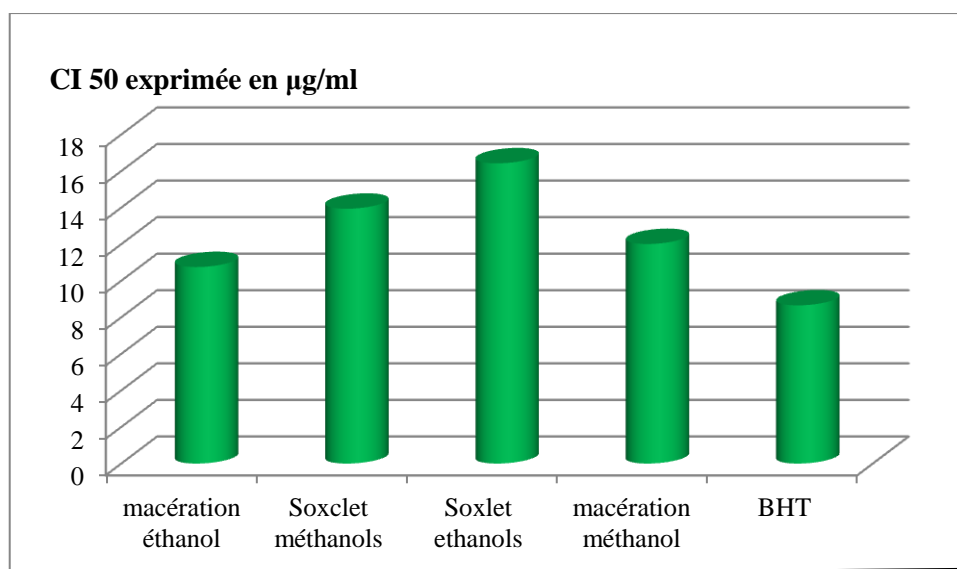


Figure 41: Activité anti-radicalaire des extraits de l'olivier sauvage (*Olea europea* var. *Sylvestris*) et le BHT.

Tableau 9 : Valeurs des IC 50 des extraits de l'olivier sauvage (*Olea europea var. Sylvestris*).

	Macération n éthanol	Soxhlet méthanol	Soxhlet éthanol	macération méthanol	BHT
CI 50 exprimée en µg/ml	10,75	13,94	16,43	12,01	8,66

D'après les valeurs obtenues, l'extrait éthanolique par macération présente une IC50 inférieure à ceux des autres extraits (IC50 = 10,75 µg/ml) et elle est proche de celle de BHA (IC 50 = 8,66 µg/ml), qui possède une activité antioxydante très élevée (**fig. 46**). Ces résultats dus à la richesse de cet extrait en polyphénols dont il a donné le meilleur rendement. Suivi de l'extrait méthanolique par macération (IC 50 = 12,01 µg/ml), puis extrait éthanolique (IC 50 = 13,94 µg/ml) et éthanolique (IC 50 = 16,43 µg/ml) par Soxhlet. En général notre plante possède une activité antioxydante très puissante.

Conclusion

Conclusion

Le stress oxydatif est la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose et le diabète (Atawodi, 2005 ; Georgetti *et al.*, 2003).

Durant ces dernières années, les recherches scientifiques se sont orientées vers les composés des plantes médicinales destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. En effet, les industries pharmaceutiques cherchent de plus en plus dans la diversité des molécules biologiques végétales dans le but d'avoir de nouveaux composés pourvus de propriétés inédites. Ces molécules issues des plantes médicinales sont considérées comme une source très importante de médicaments. Ce qui explique qu'aujourd'hui la phytothérapie dite naturelle semble gagner du terrain en évoluant en parallèle avec la médecine moderne. De ce fait, de nombreuses études s'intéressent, de plus en plus, aux effets antioxydants d'origine naturelle. Dans ce travail, nous avons évalué le pouvoir antioxydant d'*Olea europea* var. *Sylvestris*, une plante utilisée depuis l'antiquité par l'être humain.

L'extraction a été faite par deux méthodes macération et Soxhlet et en utilisant trois solvants. Les résultats obtenus montrent que la macération a présenté le rendement le plus élevé par rapport au soxhlet. L'extrait éthanolique par macération a donné le rendement le plus élevé (40,66 %) suivi de l'extrait méthanolique (33,84 %) puis l'extrait aqueux (28,94 %). Tandis que pour la méthode soxhlet, le méthanol a donné un rendement de 22,44 % qui est plus élevé que l'éthanol (14,34 %).

L'analyse phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins et des coumarines, des quinones libres, des terpénoïdes, des saponosides en quantité variable dans les différents extraits. Cependant, les alcaloïdes ont été absents.

L'analyse quantitative des extraits, a montré des résultats importants pour le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes et des tanins. L'extrait éthanolique par macération s'est révélé le plus riche en polyphénols totaux et tanins par rapport aux autres extraits. Mais l'extrait méthanolique par soxhlet, a donné le plus grand rendement en flavonoïdes.

Conclusion

Le pouvoir antioxydant des feuilles de l'olivier sauvage a été évaluée par les trois techniques ; le piégeage du radical libre DPPH, piégeage du peroxyde d'hydrogène et la réduction du fer FRAP. Pour la première technique, les résultats révèlent que l'extrait méthanolique par macération des feuilles de l'olivier sauvage présente l'activité la plus élevée avec une IC50 de 10,75 µg/ml expliqué par son rendement élevé en polyphénols suivi de l'extrait éthanolique par macération avec une IC50 de 12,01 µg/ml , puis l'extrait méthanolique par Soxhlet IC50 de 13,94 µg/ml et enfin l'extrait éthanolique par Soxhlet avec une IC50 de 16,43 µg/ml. Le test de piégeage du peroxyde d'hydrogène a montré le même résultat que le DPPH. Par contre la technique de réduction du fer FRAP a montré que la capacité réductrice de l'extrait éthanolique par Soxhlet est plus élevée que les autres extraits à une concentration de 1 mg/ml expliqué par sa richesse en flavonoïdes, dont il a donné le rendement le plus élevé.

Les résultats de ce travail suggèrent l'importance de l'espèce d'*Olea europea* var *sylvestris* pour l'usage dans la pharmacie et la phytothérapie. Basé sur cette information, on pourrait conclure que les feuilles de l'olivier sauvage sont l'une des sources naturelles des composés antioxydants les plus importantes.

D'autres études approfondies seront nécessaires et se résument dans les points suivants :

- L'isolement et l'identification de la ou les molécule (s) bioactive (s) responsables de l'activité antioxydante par des techniques chromatographiques et spectrales ;
- Développer des médicaments antiradicalaires à base de plantes, doués d'une activité antioxydante.
- Des études *in vivo* seront souhaitables pour déterminer les tissus et organes cibles, et rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aerts R., November E., Van der Borgh I., Behailu M., Hermy M., Muys B., (2006). Effects of pioneer shrubs on the recruitment of the fleshy-fruited tree *Olea europaea* ssp. *Cuspidata* in Afri-montane savanna. *Applied Vegetation Science*. Vol. 9; pp 117–126.

Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme*. Vol. 74; pp 636–643.

Aranda S., Montes-Borrego M., Jiménez-Díaz R.M., Landa, B.B., (2011). Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*. *Plant Soil*. Vol. 343; pp329–345.

Artaud Monique., (2008). L'olivier et ces contributions dans la prévention et le traitement du syndrome métabolique. pp 06-07.

Atawodi S. E., (2005). Antioxidant potential of African plants. *African J. of Biotec.* Vol.4 (2); pp 128-133.

B

Bartosz G., (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. Vol. 9; pp 5-21.

Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Panovska, T.K., (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf., *Advances in Food Sciences*. Vol. 29 (3); pp 155-161.

Besnard G., Khadari B., Villemur P., Bervillé A., (2000). Cytoplasmic male sterility in the olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* Vol. 100; pp 1018-1024.

Bloomer R.J., and Fisher-Wellman K.H., (2008). Blood Oxidative Stress Biomarkers: Influence of Sex, Training Status, and Dietary Intake. *Gender Medicine*. Vol 5(3); pp 218-28.

Bohr V. A., (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* Vol. 32 ; pp 804-812.

Boizit N., Charpentier J.P., (2006). Méthodes rapides d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des Techniques de l'INRA*. pp79-82.

Boudhioua N., Ben Slimen I., Bahloul N., et Kechaou N., (2008). Etude du séchage par infrarouge de feuilles d'olivier d'origine tunisienne. *Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08 Alger* .pp 111 – 116.

Boudribila M-M., (2004). Les anciens Amazighs avant les phéniciens : Mode de vie et organisation sociale. *AWAL n°29*; pp 17- 31.

Références bibliographiques

Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Goran A., Igetic R., (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*. Vol. 111; pp 925–929.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* Vol. 28 ;pp 25-30.

Breton C., Pinatel Ch., Médail F., Bonhomme F., Berville A., (2008). Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. pp 524-200.

Bruneton J., (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales*. 3eme Ed, Tec&Doc Lavoisier, Paris, pp.1120.

Burel C., Mezger V., Pinto M., Rallu M., Trigon S. and Morange M., (1992). Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*. Vol. 48; pp 629-634.

C

Campbell B. M., & Luckert M., (2002). *Valuation methods for woodland and forest resources* (Eds.). *Uncovering the hidden harvest*, London: Earthscan.

Chernyak B. V., and Bernardi P., (1996). The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur. J. Biochem.* Vol 238; pp 623-630.

Codoner-Franch P., Valls-Belles V., Arilla Codoner A., and Alonso-Eglesias E., (2011). Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Translational Research* December.

Connor D-J., et Fereres E., (2005). The physiology of adaptation and yield expression in olive. *Hort. Rev.* Vol. 34; pp 155-229.

Cronquist A., (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York, USA. pp:1262.

D

Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., and Colombo R., (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*. Vol 329; pp 23-38.

De, D. C., and Baudhuin, P., (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* Vol. 46; pp 323-357.

Degrift- Johnson J., Kolodziejczyk K., Krol M., Nowak P., Krol B., Nowak D., (2007). Ferric-Reducing Ability Power of Selected Plant Polyphenols and their Metabolites : Implication for clinical Studies on the Antioxidant Effects of Fruits and Vegetable Consumption, *Basic & Clinical pharmacology & Toxicology*. Vol. 100; pp 345-352.

Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., and Rodriguez H., (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* Vol. 32; pp 1102-1115.

Références bibliographiques

Doveri S., Baldoni L., (2007). Olive in Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Ed C. Kole. Volume 4: Fruits and Nuts; pp: 253-264.

E

Echtay K. S., Esteves T. C., Pakay J. L., Jekabsons M. B., Lambert A. J., Portero-Otin M., Pamplona R., Vidal-Puig A. J., Wang S., Roebuck S. J., et al., (2003). A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* Vol. 22; pp 4103-4110.

Esmaeili-M. S., Rezaeezadeh-R. M., Esmaeilpour K., Abbasnejad M., Rasoulilian B., Sheibani V., Kaeidi A., and Hajjalizadeh Z., (2010). Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinoceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *J. Ethnopharmacol.* Vol. 132; pp 200-205.

F

Fabri R.L., Nogueira M.S., Braga, F.G., Coimbra E.S., Scio E., (2009). *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology.* Vol.100 ; pp 428-433.

Fao et Who., (2003). www.fao.org/docrep/x1880f/x1880f03.htm.

Favier A., (2003). Le stress oxydatif Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* pp108-115.

Flora S.J.S., (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxi Med Cel Long.* Vol.2 : (4) ; pp 191 – 206.

G

Gacem M. A., (2011). Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. Magister en biologie, Université Kasdi Merbah-Ouargla. pp 87.

Gardès-Albert M., (2003). Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D. Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique.* pp: 91-96.

Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharm Sci.* Vol. 5 (2): pp 5.

Ghanbari R., Farooq A., Alkharfy K. M., Gilani A.H. and Saari N., (2012). Valuable Nutrients and Functional. Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) A Review. *Int. J. Mol. Sci.* Vol. 13, pp 3291-3340.

Références bibliographiques

Ghedadba N., Bousselsela H., Hambaba1 L., Benbia S., Mouloud Y., (2014) . Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*. Springer-Verlag France. Vol. 12 ; pp 15-24

Ghedira K., (2008). L'olivier. *Phytothérapie*. Vol. 6 ; pp 83-89.

Gotto A. M., and Kon H., (1970). Observations on the conformation of human serum high-density lipoproteins using infrared spectroscopy, circular dichroism, and electron spin resonance. *Biochemistry*. Vol. 9; pp 4276-4283.

Green P. S., (2002). A revision of *Olea*. (*Oleaceae*). *Kew Bull*. Vol. 57; 91-140.

Guerin J., Mekuria, G., Burr M., Collins G., Sedgley M., (2003). Selection of olive cultivars. *Acta Horti*. Vol. 622; pp 231–234.

H

Hadi M., (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Thèse pour obtenir le titre de docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur, Domaine: Pharmacochimie, Université Strasbourg I. pp155.

Halliwel B., (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52: 253-265.

Halliwel B., Gutteridge JMC., (2006). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Oxford : Clarendon Press.

Hannachi H., Breton C., Msallem M., Salem B. E. H., El Gazzah M., Bervillé A., (2008). Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia, *Scientia Horticulturae*. Vol. 116; pp 280–290.

Huang C.L., Sumpio, B.E., (2008). Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *J. Am. Coll. Surg*. Vol. 207; pp 407–416.

J

Jacotot B., (1997). Vitamine E et athérosclérose. *Rev Méd Interne*. Vol. 15, ;pp 627-629.

Jacques-Meunié D., (1982). *Le Maroc saharien des origines à 1670*, Klincksieck. Paris. Vol. 2; pp 990.

Johnson, D.R., Gu, L.C., (1988). In *Autoxidation and Antioxidants*. John Wiley, New York, , pp 433-448.

K

Kadri A, Zarai A, Békir A, et al., (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol* 10: 3908–14

Références bibliographiques

Karagozler A., Erdag B., Calmaz Emek Y., (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*. Vol. 111; pp 400-407.

Karumi Y., Onyeyili P.A., et Ougbuaja V.O., (2004). Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Sci*. Vol 4, pp 179-182.

Kelley P. M., and Schlesinger M. J., (1978). The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell* 15, pp 1277-1286.

Kim D.O., Chun O.K., Kim Y. J., Moon H.Y., Lee C.Y., (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 51(22); pp 6509-6515.

Kirschvink N., Moffarts B., Lekeux P., (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*. Vol.177; pp 178–191.

Koehlin-Ramonatxo C., (2006). Oxygène, stress oxydatif et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et metabolism*. Vol.20; pp 165–177.

Kohen R, Nyska A., (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicolo Pathol*. Vol 30 ; pp 620 – 650.

L

Lavee Shimon.. (2013). Evaluation of the need and present potential of olive breeding indicating the nature of the available genetic resources involved. *Scientia Horticulturae*. Volume 161; 333–339.

Lichtenthaler H.K., (1982). Synthesis of prenyllipids in vascular plants (including chlorophylls, carotenoids, prenylquinones). In *CRC Handbook of Biosolar Rescrouces*, Vol.1; pp 405-421.

Linden G., Lorient D. (1994). *Biochimie agro-indusrielle*. Ed. Masson, Paris. Pp 360.

Liu D., and Xu Y., (2011). Oxidative stress, and aging. *Antioxid. Redox. Signal*. Vol.15 ; pp : 1669-1678.

Lumaret R., Ouazzani N., Michuad H., Vivier G., Deguilloux M-F., Di Giusto F., (2004). Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean basin. *Heredity*. 92, p: 343-351.

M

Mac Laren D., (2007). *Antioxidants and free radicals* by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier. *Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport*. Vol.8.

Magalhaes L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J., (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta*. Vol.613; pp 01–19.

Maisuthisakul P., Suttajit M., Pongsawatmmit R., (2007). Assessment of phenolic content and free radicalscavenging capacity of some Thai indigenous plants, *Food Chemistry*. Vol.100; pp 1409-1418.

Références bibliographiques

Mamadou Badiaga, (2011). Etude ethnobotanique phytochimique et activité biologiques de *Nauclea latifolia* Smith., une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascale de Clermont-Ferrand.

Marfak A., (2003). Radiolyse Gamma des Flavonoides. Etude de Leur Reactivite avec les Radicaux issus des Alcools : Formation de Depsides. Docteur de l'universite de limoges Spécialité : Biophysique, Universite de Limoges, Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé, Faculté de Pharmacie. Pp 220.

Maria Bardoulat., (2013). Pour en savoir plus, lire : « L'olivier, trésor de santé », Éditions Alpen.

Marrouf G., et Tremblin., (2009). Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences.

Mates J. M., Segura J. A., Alonso F. J., and Marquez J., (2012). Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. Arch. Toxicol. Vol.86; pp 1649-1665.

Mecocci P., MacGarvey U., Kaufman A. E., Koontz D., Shoffner J. M., Wallace D. C., and Beal, M.F. (1993). Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. Ann. Neurol. 34, 609-616.

Mohammedi Z., Atik F., (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. Inter J Pharma Bio Sci. Vol. 2; pp 609-615.

Mohanty P., Hamouda W., Garg R., et al. (2000). Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS^o) generation by leucocytes. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 85; pp 2970-3.

Morel Y., and Barouki R., (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. Biochem. J.. 342 Pt 3; pp 481-496.

Muller F. L., Lustgarten M. S., Jang, Y., Richardson A., and Van R. H., (2007). Trends in oxidative aging theories. Free Radic. Biol. Med. Vol.43 ; pp 477-503.

N

Nkhili Zohra., (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interaction avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant ; thèse Doctorat.

O

Oloyede OI., (2005). Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. Pak J Nutr. Vol 4 ;pp : 379 – 381.

P

Pagnol, J., (1996). L'Olivier. Aubanel Ed, France.

Pan Y., Wang K., Huang S., Wang H., Mu X., He C., Ji X., Zhang J., Huang, F., (2008). Antioxydantactivity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel, Food Chemistry. Vol.106; pp 1264-1270.

Paris R., et Moyse M., (1965). Précis de matière médicale. Edit. Masson. Paris. p 412.

Références bibliographiques

Patel C., Ghanim H., Ravishankar S., et al., (2007). Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-Kappa B activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab.* Vol. 92 ; pp 4476-9.

Pattwell D. M., and Jackson M. J., (2004). Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc. Sport Sci. Rev.* Vol. 32; pp 14-18.

Pelzer L. E., Guardia T., Juarez A. O., et al. (1998). Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmacol.* Vol. 53 (6); pp 421-424.

Penna C., Mancardi D., Rastaldo R., Pagliaro P., (2009). Cardioprotection: A radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787: 781- 793.

Perrinjaquet-Moccetti T., Busjahn A., Schmidlin C., Schmidt A., Bradl B., and Aydogan C., (2008). Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phytotherapy Research.* Vol. 22; pp 1239-1242.

Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne JO., (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Vol 16, Issue 4 ; pp 233-239.

Polzonetti V., Egidi D., Vita A., et al., (2004). Involvement of oleuropein in digestive metabolic pathways. *Food Chemistry.* Vol. 88 ; pp: 1-15.

Prior R L., Wu X., Schaich K., (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements . *Agric. Food Chem.* Vol.53; pp: 4290-4302.

R

Richter C., Park, J. W., and Ames B. N., (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Vol. 85; pp 6465-6467.

Roberts CK., Sindhu, K.K., (2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences.* Vol 84; pp 705–712.

Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E., (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis.* Vol.10 (6); pp 1003-1008.

S

Sayre LM., Moreira PI., Smith MA., Perry G., (2008). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità.* Vol. 41(2); pp 143-164.

Schrader, M., and Fahimi, H. D., (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, pp 1755-1766.

Sevanian A ., Nordenbrand K ., Kim E ., Ernester L ., Hochstein P., (1990). Microsomal lipid peroxidation : The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 . *Free Radic Biol Med.* Vol. 8; pp 145-152

Références bibliographiques

Shon, M., Lee, J., Choi, J., Choi, S., Nam, S., Seo, K., Lee, S., Sung, N., Park, S., (2007). Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of chungkukjang , *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol.20; pp 113-118

Sohal R. S., Agarwal S., Candas M., Forster M. J., and Lal H., (1994). Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech. Ageing Dev.* 76, 215-224.

Stadtman, E. R., and Levine R. L., (2000). Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. p:899, 191-208.

Stadtman, E. R., (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radic. Res.* 40, 1250-1258.

Stevnsner T., Thorslund T., de Souza-Pinto, N. C. and Bohr V. A., (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp. Gerontol.* 37; p: 1189-1196.

Sun BS., Ricardo-Da-Silva JM., Spranger., (1998).MI. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem*, Vol.46 ; pp 4267-4274.

T

Terral JF., Arnold- Simard G., Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Res.* 46, 1996; 176-85.

Terral JF., Arnold-Simard G., (1996). Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Res.* 46, p: 176-85.

Tissieres, A., Mitchell, H. K., and Tracy U. M., (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84, p:389-3984.

Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H., Abdelly C., (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Sci Tech* 43; p: 632-639.

V

Valkova N., and Kultz, D., (2006). Constitutive and inducible stress proteins dominate the proteome of the murine inner medullary collecting duct-3 (mIMCD3) cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, p: 1007-1020.

Vermerris W., Nicholson R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Springer ,Dordrecht. ISBN: 1001-4020-5163-8.

Visioli F., Galli C., (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 42,p; 209-210.

Visioli F., Poli A., Galli C., (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev*: 22; 65–75.

Références bibliographiques

W

Wainstein J., Ganz T, Boaz M, Bar Dayan Y., Dolev E, Kerem Z., Madar Z., (2013). Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Natural medicine*. p; 01-477.

Wanders, R. J., and Waterham, H. R., (2006). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 295-332.

Z

Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Masse, B. and Kroemer, G., (1996). Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett.* 384,p: 53-57.

Zohary D., (1973). Domestication of plants in the Old World. The origin and spread of cultivated plants in W est Asia, Europe and the Nile Valley. Clarendon Press, Oxford.

Zohary D., (1995). Olive. *Olea europaea* (oleaceae) In: Smartt J. and Simmonds N.W. (eds), *Evolution of Crop-Plants*, Longmans, London. p: 279-382.

Annexes

Annexe 1 : Résultats des DO des polyphénols, des tanins et des flavonoïdes.

Familles chimiques	Extraits				
	Extrait méthanolique		Soxhlet éthanol		Extrait aqueux
	Soxhlet méthanol	Macération méthanol	Soxhlet éthanol	Macération éthanol	Macération
DO pour les phénols totaux à 280	0,978	0,546	0,447	0,679	0,679
DO pour les phénols totaux à 760	0.339	0.305	0.32	0.35	0.195
DO pour les Tanins à 530	0,259	0,228	0,262	0,298	0,118
La chlorophylle a 664 (1/10)	0,252	0.076	0.057	0.124	0.14
La chlorophylle b 648 (1/10)	0.27	0.056	0.054	0.093	0.093
Les caroténoïdes 470 (1/10)	0.63	0.23	0.174	0.487	0.242
Flavonoïdes 430	0.476	0.382	0.412	0.352	0.259

Annexe 2 : Résultats des DO de la chlorophylle a, b et des caroténoïdes.

Extrait	DO de la chlorophylle b 648 (1/10)	DO de la chlorophylle a 664 (1/10)	DO de la caroténoïdes 470 (1/10)	La concentration la chlorophylle a	La concentration la chlorophylle b	La concentration des caroténoïdes
<i>Olea europaea Sylvestris</i>						
1. Extrait méthanolique						
Soxhlet méthanol	2,7	2,52	6,3	19,65	53,60	4,90
Macération méthanol	0,56	0,76	2,3	7,25	9,19	6,64
Extrait éthanolique						
Soxhlet éthanol	0,54	0,57	1,74	4,81	10,18	3,52
Macération éthanol	0,93	1,24	4,87	11,74	15,44	15,97
3. Extrait aqueux						
3.1. Macération	0,93	1,4	2,42	13,88	14,14	4,83

Annexe 3 : Résultats de l'activité antioxydante par la technique de piégeage de H₂O₂.

	t0	Pourcentage d'inhibition	t= 10	Pourcentage d'inhibition	t= 20	Pourcentage d'inhibition	t= 30	Pourcentage d'inhibition	t= 40	Pourcentage d'inhibition
SE	0,079	55,37	0,082	53,67	0,087	50,85	0,093	47,46	0,098	44,63
SM	0,085	51,98	0,089	49,71	0,091	48,59	0,095	46,33	0,102	42,37
ME	0,077	56,50	0,084	52,54	0,092	48,02	0,103	41,81	0,112	36,72
MM	0,093	47,46	0,097	45,20	0,109	38,42	0,117	33,90	0,128	27,68
MA	0,095	46,33	0,106	40,11	0,114	35,59	0,119	32,77	0,125	29,38
BHA	0,074	58,20	0,077	56,50	0,082	53,67	0,092	48,02	0,097	45,20

Annexe 4 : Résultats de l'activité antioxydante par la technique de réduction du fer FRAP.

Tableau 1 : DO de l'extrait méthanolique
Par soxhlet.

	DO à 700nm				Moyenne DO
Concentrations	0,05	0,118	0,12	0,112	0,117
	0,1	0,123	0,127	0,22	0,157
	0,2	0,303	0,301	0,298	0,3007
	0,4	0,739	0,743	0,738	0,74
	0,6	1,15	1,165	1,15	1,155
	0,8	1,6	1,583	1,59	1,591
	1	1,858	1,872	1,877	1,869

Tableau 2 : DO de l'extrait éthanolique
Par macération.

	DO à 700nm				Moyenne DO
Concentrations	0,05	0,113	0,108	0,112	0,111
	0,1	0,12	0,135	0,125	0,127
	0,2	0,327	0,328	0,331	0,3287
	0,4	0,644	0,577	0,642	0,621
	0,6	1,091	0,925	1,218	1,078
	0,8	1,674	1,68	1,681	1,678
	1	1,745	1,842	1,795	1,794

Tableau 3 : DO de l'extrait éthanolique
Par soxhlet.

	DO à 700nm				moyenne DO
Concentrations	0,05	0,119	0,123	0,125	0,1223
	0,1	0,207	0,186	0,162	0,185
	0,2	0,491	0,527	0,492	0,503
	0,4	0,893	0,905	1,096	0,9647
	0,6	1,345	1,351	1,345	1,347
	0,8	1,832	1,835	1,933	1,87
	1	1,945	1,942	1,947	1,9447

Tableau 4 : DO de l'extrait méthanolique
Par macération.

	DO à 700nm				Moyenne DO
Concentrations	0,05	0,051	0,056	0,059	0,055
	0,1	0,091	0,055	0,097	0,081
	0,2	0,391	0,388	0,377	0,385
	0,4	0,843	0,847	0,856	0,8487
	0,6	1,219	1,313	1,212	1,248
	0,8	1,538	1,617	1,613	1,589
	1	1,692	1,691	1,687	1,69

Tableau 5 : DO de l'extrait aqueux
Par soxhlet.

	DO à 700nm				moyenne DO
Concentrations	0,05	0,132	0,125	0,119	0,125
	0,1	0,245	0,254	0,248	0,249
	0,2	0,456	0,451	0,398	0,435
	0,4	0,72	0,713	0,73	0,721
	0,6	0,992	0,987	0,995	0,991
	0,8	1,17	1,165	1,177	1,1707
	1	1,296	1,305	1,337	1,3127

Tableau 6 : DO de l'acide ascorbique.

AA	DO à 700 nm				Moyenne DO
Concentrations	0,05	0,473	0,489	0,452	0,47
	0,1	0,765	0,78	0,697	0,747
	0,2	1,137	1,094	1,051	1,094
	0,4	1,764	1,702	1,753	1,7397
	0,6	2,046	2,07	2,047	2,054
	0,8	2,14	2,222	2,118	2,16
	1	2,319	2,323	2,34	2,327

Annexe 5 : Résultats des Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits de *Olea europea var. Sylvestris*.

Concentrations (ug)/ml	% d'inhibition de DPPH			
	macération éthanol	macération méthanol	Soxklet méthanol	Soxklet éthanol
5	22,86	19,86	17,86	15,86
10	39,38	38,361	36,271	30,132
15	59,62	58,896	51,796	44,796
25	89,83	85,796	67,425	57,326
50	94,76	93,789	70,789	67,289
100	95,47	93,001	80,112	70,322
200	96,07	95,071	90,071	80,061
400	96,98	96,978	94,978	84,868
600	97,58	95,43	93,43	87,334
800	97,89	95,312	92,312	90,722

Annexe 6: Les courbes des régressions linéaires des % d'inhibition du DPPH

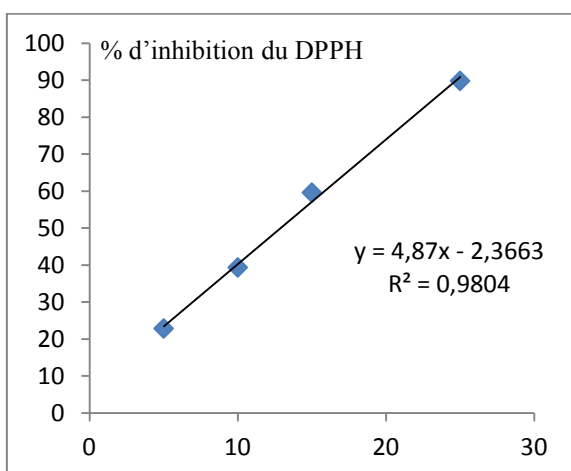


Figure 40: Représentation des régressions linéaires des % d'inhibition du DPPH pour l'extrait éthanolique par macération.

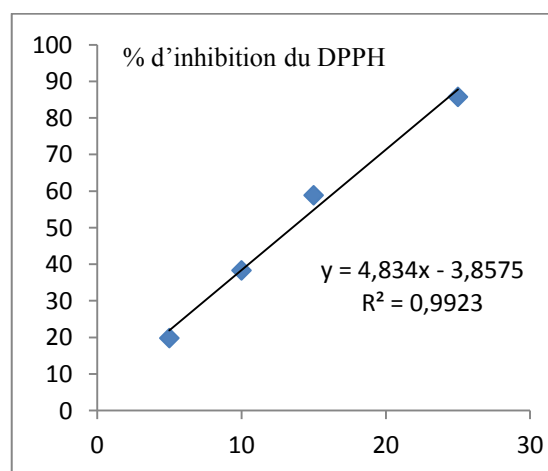


Figure 42: Représentation des régressions linéaires des % d'inhibition du DPPH pour l'extrait méthanolique par macération.

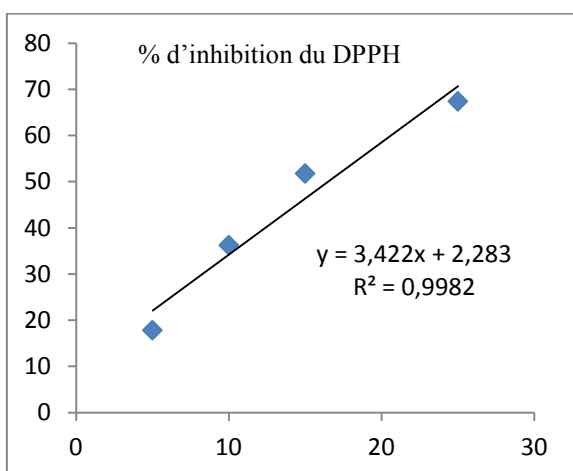


Figure 44: Représentation des régressions linéaires des % d'inhibition du DPPH pour l'extrait méthanolique par Soxhlet

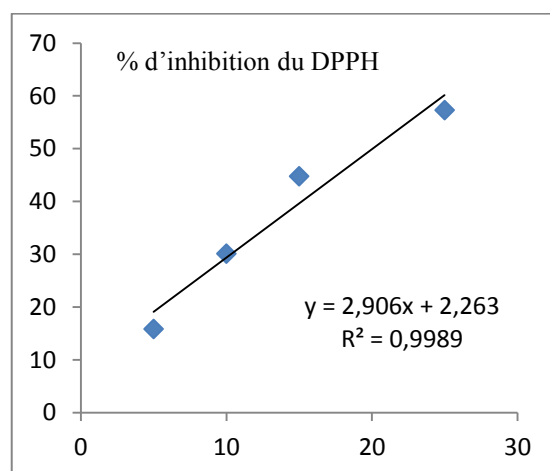


Figure 46: Représentation des régressions linéaires des % d'inhibition du DPPH pour l'extrait éthanol par Soxhlet.

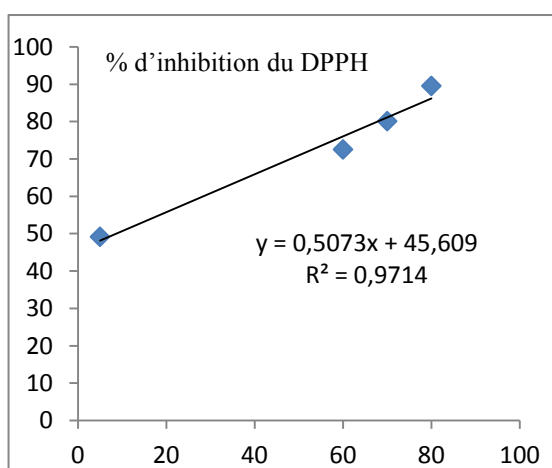


Figure 48: Représentation des régressions linéaires des % d'inhibition du radical libre DPPH pour BHT.