



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Mustapha Stambouli de MASCARA

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

Laboratoire de Bioconversion et Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

« Magister »

Spécialité : Substances Naturelles et Innovation thérapeutique

S.N.I.T.

Thème :

**Activité antioxydante et antimicrobienne des fractions
polyphénoliques d'olive local (*Olea europaea* L.)**

Présenté par :

M^{me} MERAH Houria

Membres du Jury

Pr. BELABID L.	Université de MASCARA	Président
Pr. MEDDAH B.	Université de MASCARA	Promoteur
Pr. TIR TOUIL A.	Université de MASCARA	Examinatrice
Dr. CHOUITAH O.	Université de MASCARA	Examinatrice
Dr. HARIRI A.	Université de MASCARA	Examineur

Année universitaire 2015- 2016.

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'exprime mes sincères remerciements à **Pr BELABID L.** pour l'intérêt qu'il porte à ce travail et pour sa disponibilité à présider le jury.

Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur, **Dr. MEDAH B.** Professeur à l'université de Mascara pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, je le remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il a consenti durant la réalisation de ce mémoire.

Je voudrais remercier **Pr. TIRTOUIL A.**, Professeur à l'université de Mascara, je ne saurais jamais la remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien sans faille durant les années de magister.

A cette même occasion je tiens à remercier **Dr. CHOUITAH O.** Professeurs à l'université de Mascara, pour son aide et sa sympathie et d'avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations.

Je voudrais également remercier **Dr HARIRI A.**, Professeur à l'université de Mascara, pour son aide et d'avoir consenti à participer à ce jury de thèse.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à tous mes professeurs de graduation et de post-graduation de l'université de Mascara.

Merci à tout le personnel du département de Biologie de l'Université de MASCARA et du Laboratoire de Microbiologie pour leur gentillesse.

À ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans mon travail, je les remercie du fond du cœur.

Dédicaces

A l'aide de DIEU tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

♥ *A mes chers parents* ♥

♥ *A ma famille* ♥

♥ *A mon mari: KESSIRA Rabii Omar* ♥

♥ *A mes filles: Malek et Ibtihal* ♥

♥ *A mes sœurs: Latifa Souad et Fatiha* ♥

♥ *A mes frères :Khaled et Mohammed* ♥

♥ *A mes professeurs* ♥

♥ *A mes amis* ♥

♥ *A vous* ♥ ...

Houria

SOMMAIRE

Introduction.....1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

II. L'olivier « *Olea europaea* L. »

II -1. Description botanique.....	03
II-2. Systématique.....	05
II-3. Distribution géographique.....	05
II-4. Composition chimique.....	06
II -4- 1. Les acides gras.....	06
II-4- 2. Les composés phénoliques.....	06
II-4- 3. Les tocophérols.....	08
II -4- 4. Les alcools triterpéniques.....	09
II -4- 5. Les acides triterpéniques.....	09
II -4- 6. Le squalène et les stérols.....	09
II -4- 7. Les caroténoïdes.....	10
II -5. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques.....	10
II-6. Mécanismes d'action.....	11

I. Les polyphénols

I-1. 1. Les composés phénoliques.....	14
1.1. Généralités.....	14
1.2. Biosynthèse des composés phénoliques.....	14
1.2.1. La voie de Shikimate.....	14
1.2.2. La voie des phénylpropanoïdes.....	15
1.2.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	15
1.3. Principales classes des polyphénols.....	15
1.3.1. Les acides phénoliques simples.....	15
1.3.1.1. Acides hydroxycinnamiques.....	15
1.3.1.2. Acides hydroxybenzoïques.....	15
1.3.1.3. Coumarines.....	16
1.4. Les flavonoïdes.....	17
1.4.1. Généralités.....	17
1.4.2. Structure chimique et classification.....	18
1.4.3. Localisation et distribution des flavonoïdes.....	18
1.4.4. Biodisponibilité des flavonoïdes.....	19
1.4.5. Quelques propriétés des flavonoïdes.....	20
1.5. Activités biologiques des polyphénols.....	20
1.5.1. Activité antioxydante.....	20
1.5.1.1. Les Radicaux libres.....	20
1.5.1.2 Origine des radicaux libres.....	21
1.5.1.3 Nature des radicaux libres.....	22
1.5.1.3-1 Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).....	22
1.5.1.3-2 Espèces libres non oxygénées.....	23
I.5.2 Antioxydants.....	23
1.5.2.1. Les antioxydants primaires.....	23
1.5.2.2. Les antioxydants secondaires.....	24
1.5.2.3. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant.....	25
1.5.2.4. Mécanismes d'action des antioxydants.....	26
1.5.2.5. Antioxydant d'origine végétale.....	27
1.6.2. Activité antimicrobienne.....	28

1.6..2.1. Les principales substances antimicrobiennes.....	29
1.6.2.1.1. Les antibiotiques.....	29
1.6.2.1.2. Les composés phénoliques.....	29

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériel.....	31
I-1-1. Matériel végétal.....	31
I-1-2. Produits et réactifs chimiques.....	31
I-2. Méthodes.....	31
I-2-1 .Caractérisation pomologique des olives	32
I-2-1-1 .Taux d'humidité ou teneur en eau.....	32
I-2-1-2. Teneur (Rendement) en huile de pulpe d'olive.....	34
I-2-2. Extraction des polyphénols de pulpe d'olive.....	35
I-2-3. Caractérisations quantitative et qualitative	35
I-2-3-1.Caractérisation quantitative des extraits de pulpes d'olive.....	38
I-2-3-1-1.Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie.....	38
I-2-3-2-2.Dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de AlCl ₃	38
I-2-3-2. Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits de pulpe d'olive.....	39
I-2-4. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	40
I-2-4-1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	41
I-3. activité antimicrobienne.....	42
1.3.1. Activité antibactérienne	43
1.3.1.1. Préparation du milieu de culture	43
1.3.1.2. Stérilisation du matériel.....	43
1.3.1.3. Préparation des dilutions d'extraits d'olives	43
1.3.1.4. Préparation de l'inoculum	44
1.3.1.5. Ensemencement et dépôt des disques	44
1.3.1.6. Lecture des antibiogrammes.....	44
I-2-6. Analyse statistique.....	45

II. Résultats et discussion

II-1. Caractérisation pomologiques des olives	46
II-1-1. Caractérisation physique des variétés d'olive.....	46
II-1-2. Taux d'humidité.....	46
II-1-3. Teneur en huile.....	47
II-1-4. Teneur en polyphénols dans l'huile.....	48
II-2. Caractérisation quantitative et qualitatives des extraits d'olive.....	49
II-2-1. Teneurs des olives en polyphénols et en flavonoïdes.....	50
II-2-2. Caractérisation qualitative des extraits.....	54
II-3. Activité antioxydante.....	57
II-3-1. Effet de piégeage du radical le DPPH	57
II-4. Activité antimicrobienne.....	58
Conclusion et perspectives.....	60

Références bibliographiques

Annexe

Liste des abréviations

AAO : Activité antioxydante

ADN : Acide ribonucléique

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras poly-insaturé

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

ANOVA: Analyse de variance

AVC : Accidents vasculaires- cérébraux

BHT : Butyl Hydroxyl Toluène

CCM : Chromatographie sur couche mince

CE50 : Concentration effective à 50%

CG/SM: Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse

CI50 : Concentration inhibitrice à 50%

CI50 : Concentration inhibitrice à 50%

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CL/SM : Chromatographie en phase liquide-Spectrométrie de masse

C O I : Conseil oléicole international

COX : Cyclooxygenase

d : Densité

D.O : Densité optique

DHPE : 3,4-dihydroxyphényléthanol

DMSO : diméthyle sulfoxyde

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

D.S.A : Direction des services agricoles

EAG/g.MS : Equivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche

EC50 : Efficient concentration value

ERN : Espèces réactives du Nitrogène

ER/g.MS:Equivalent de rutine par gramme de matière sèche

ERO : Espèces réactives de l'oxygène ou oxygénées

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Reduced glutathione

GSH-Px: Glutathione peroxidase

GSSG : Glutathionedissulfide

H₂O₂ : Eau Oxygénée ou peroxyde d'hydrogène

HPE : Hydroxyphényléthanol

HPLC : High performance liquid chromatography

HT : Hydroxytyrosol

IPL : Inhibition de la peroxydation lipidique

LOX : Lipooxygénase

MeOH : Méthanol

mg : milligramme

ml : millilitre

nm : nanomètre

NO : Monoxyde d'azote

Ole : Oleuropéine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1

PP : Polyphénol

Rf : Rapport frontal

RLs : Radicaux libres

ROS : Reactive oxygen species

SOD : Superoxyde dismutase

TCA : Trichloro-acetic acide

v/v : Rapport volume par volume

VS : Variété d'olive nommée Sigoise

VC : Variété d'olive nommée Chemlal

% : Pourcentage

Liste des tableaux

Tableau 1:Caractérisation des olives des variétés VS et VC d'origine de Mascara.....**45**

Tableau 2:Rapports frontaux (Rf) des spots des extraits et des témoins dans le système (CHCl₃ / CH₃-COO-CH₂-CH₃ / H-COOH : 50/40/10, v/v/v).....**54**

Tableau 3: Variation de l'activité antibactérienne des deux variétés VS et VV en fonction de différentes concentrations.....**58**

Listes des figures

Listes des figures

Figure 1: arbre fruits et fleurs d'olivier (<i>Olea europaea</i>)	04
Figure 2: Section transversale de l'olive	05
Figure 3: Structures chimiques des trois principaux composés phénoliques d'olive.....	08
Figure 4: Principaux acides hydroxycinnamiques.....	5
Figure 5: Principaux acides hydroxybenzoïques	5
Figure 6: Principaux types de coumarines.....	6
Figure 7: Structure chimique de base des flavonoïdes	10
Figure 8: Fruits d'olives Sigoise à droite et Verdial à gauche	31
Figure 9: schéma de différentes étapes de réalisation de cette étude.....	33
Figure 10: Extraction des huiles de pulpe d'olive par Soxhlet.....	34
Figure 11: évaporation sous vide par rotavapor.....	35
Figure 12: Schéma représentative des étapes pour l'extraction des polyphénols d'olive.....	37
Figure 13: Taux d'humidité et de matière sèche des variétés d'olive VS et VV	46
Figure 14: Teneur en matière grasse MG% des olives.....	47
Figure 15: Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique.....	50
Figure 36 : Teneurs en polyphénols des extraits d'olive.....	50
Figure 15: Droite d'étalonnage de la Quercétin.....	51
Figure 36 : Teneurs en flavonoides des extraits d'olive.....	51
Figure 37 : Profiles Chromatographiques des extraits de polyphénols des olives.....	53
Figure 16 : Concentrations responsables à 50% d' inhibition du radical DPPH• (CI50).....	56



Introduction

Introduction :

L'une des nourritures sur laquelle le Coran attire l'attention est l'olive. Des recherches récentes ont indiqué que l'olive est non seulement un aliment délicieux mais il représente aussi une importante source de bienfait pour une bonne santé. En dehors de l'olive en tant que fruit, l'huile qui en est issue est une importante source de nutrition. C'est en ces termes que le Coran souligne l'importance de l'huile extraite de l'olivier :

« Dieu est la lumière des cieux et de la terre. Sa lumière est semblable à une niche où se trouve une lampe. La lampe est dans un [récipient de] cristal et celui-ci ressemble à un astre de grand éclat ; son combustible vient d'un arbre béni : un olivier ni oriental ni occidental dont l'huile semble éclairer sans même que le feu la touche. Lumière sur lumière. Dieu guide vers Sa lumière qui Il veut. Dieu propose aux hommes des paraboles et Dieu est omniscient ». (Coran, 24 : 35)

L'effet bénéfique de l'huile d'olive sur la santé humaine est attribué, entre autres, à sa teneur en composés phénoliques. Ces derniers ne cessent de prendre une importance croissante à cause de leurs vertus sur la santé. Leur pouvoir antioxydant naturel suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. **Aouidi F. et al**, 1990, Etude de la répartition quantitative des phénols totaux dans l'olivier en fonction des organes et leur degré de maturité, *J. Olivebiotech* 2009, p :376

L'intérêt croissant aux composés phénoliques de l'huile d'olive a été renvoyé au fruit (olives) (Romero et al., 2004) et aussi à ces dérivés (margines, grignons, pâtes d'olive, olives fermentées, poudre d'olive) (De Marco et al., 2007; Winkelhausen et al., 2005).

Le présent travail consiste à donner un intérêt à l'olive algérien et dans ce contexte s'inscrit cette étude qui vise les objectifs suivants :

La caractérisation pomologique des olives des deux variétés choisies permet l'identification et la classification de ces cultivars.

La caractérisation quantitative (contenu en polyphénols et les flavonoïdes) et qualitative (analyse par CCM) des extraits de pulpe d'olive.

L'évaluation in vitro de l'effet antioxydant des extraits par le test DPPH.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de pulpe d'olive.



Revue

bibliographique



Chapitre 1 :

L'olivie

I. L'olivier « *Olea europaea* L. »**I -1. Description botanique**

L'olivier fait partie de la famille des oléacées, il était et il est toujours principalement cultivé pour ses olives bien qu'il a aujourd'hui intègre le statut d'arbre d'ornement. C'est un arbre moyennement trapu (moyenne de 2m) qui peut pour certain sujet atteindre les 15 mètres de hauteur (Wagner,1999).L'olivier peu vivre plus de 1000 ans, son tronc tourmenté et noueux porte à sa base de nombreux rejets dans sa condition mi-sauvage. Le bois d'olivier est brun clair veiné de marbrures sombres, il est apprécié par les ébénistes et les sculpteurs.

Les feuilles de l'olivier ne tombent jamais, (durée de vie, trois ans) leur situation sur le rameau est dite "opposée", le pétiole est court. La face supérieure des feuilles est luisante vert foncé, tandis que la face inférieure présente un aspect argenté dû à la pruine, ses fleurs blanches forment des grappes courtes. (figure5).

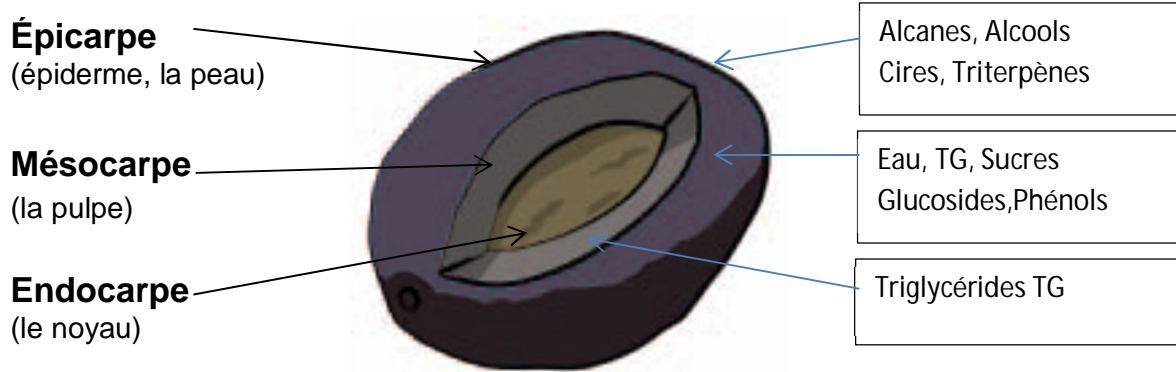
Le fruit, l'olive, est une drupe avec une pulpe charnue riche en matière grasse. D'abord vert, il devient noir à maturité complète, vers octobre novembre. Il est constitué de trois parties :Epicarpe, Mésocarpe (pulpe), Endocarpe (paroi de noyau)dont une section transversale couplée à la composition physique et chimique rapportées dans la figure 6 .

Le noyau (amandon) est très dur, osseux, contient une graine, rarement deux.

Les fleurs blanches (figure 5), à corolle en tube portant quatre lobes ovales, sont groupés en grappes dressées et apparaissent à l'aisselle des feuilles vers mai-juin.



Figure 5 : arbre fruits et fleurs d'olivier (Amouretti M.C. *et al.* , 1992)



Composition physique

composition chimique

Figure 6 : Section transversale de l'olive (Bianchi, 1999).

I-2. Systématique

L'espèce *Olea europaea* L. a été nommée par Linné en raison de son aire géographique. C'est l'unique espèce du bassin méditerranéen représentative du genre *Olea*.

On distingue deux sous-espèces, l'olivier cultivé ou olivier commun (*Olea europaea sativa*.) et l'olivier sauvage ou oléastre (*Olea europaea sylvestris*.).

-Noms communs de l'olive : en : olive, es : olivo, it : olivo, ar : Zaitoune

I-3. Distribution géographique

Pour les botanistes, l'aire de répartition de l'olivier est synonyme de "région méditerranéenne". L'olivier (*Olea europaea* L.) est cultivé depuis très longtemps autour de la méditerranée et de la mer noire surtout en : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, France, Tunisie, Algérie et Croatie. Aujourd'hui si l'on trouve des plantations en Californie, Australie, Afrique du Sud. Cette répartition géographique est influencée par des facteurs climatiques et pédologiques. (Gaussorgues, 2009 ; Carrion, et al., 2010).

I-4. Composition chimique

I -4- 1. Les acides gras

Les acides gras appartiennent à la famille des lipides. Ces lipides contiennent une fraction principale dite saponifiable (phospholipides, triglycérides) et une fraction mineure insaponifiable (stéroïdes, vitamines liposolubles, caroténoïdes). Les lipides sont caractérisés par leur insolubilité dans l'eau et la solubilité dans les solvants organiques. Dans le cas de l'huile d'olive les triacylglycérides représentent entre 98% et 99% de la masse totale.

La composition en acide gras est très variable et dépend de la variété d'olives (Lee, et al., 2007). La région de production et de l'année de la récolte (influence des conditions environnementales).

Selon les résultats de Tripoli et ses collaborateurs (2005), la composition en acides gras d'une huile d'olive est la suivante : Acide palmitique (C16:0) 7,5-20%, Acide palmitoléique (C16:1n-7) 0,3-3,5, Acide stéarique (C18:0) 0,5-5%, Acide oléique ou (ω 9) (C18:1n-9) 55-83%, c'est l'acide gras majoritaire qui donne à l'huile d'olive ses bienfaits sur la santé humaine (Pontes-Arruda, 2009), Acide linoléique ou (ω 6) (C18:2n-6) 3,5-21%, Acide α -linoléique (ω 3) (C18:3n-3) <1,5%, Acide arachidonique (C20:0) <0,8 (Tripoli, 2005).

I-4- 2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques dans les olives ont une grande importance, car de leur contribution à la couleur, le goût et la texture des olives, ainsi que leurs propriétés (Marsilio, et al., 2001). Les polyphénols (PP) représentent 1 à 3 % du poids frais de l'olive-drupe à maturité (Boskou et al., 2006), présents en quantité variable (entre 1 et 10 g/kg d'olives) dans la pulpe de l'olive. Ceci dépend essentiellement de la variété et du degré de maturité à la récolte (Léger,

1999). De plus, les procédés technologiques utilisés pour séparer les margines de la phase huileuse donnent également des teneurs différentes en polyphénols de l'huile d'olive (Gimeno, et al., 2002). Cette proportion varie de 2 à 50 mg/100 g pour l'huile d'olive. Parmi eux se trouvent des formes spécifiques des Oléacées, les sécoiridoïdes phénoliques, principalement constitués de l'oleuropéine (2 % dans le fruit vert frais) et du ligstroside, ainsi que de leurs dérivés aglycones, décarboxyméthylés et aldéhydiques. L'oleuropéine et le ligstroside sont des esters formés à partir de deux alcools, respectivement l'hydroxytyrosol ou 3,4-dihydroxyphényléthanol (3,4-DHPE) et le tyrosol ou para-hydroxyphényléthanol (respectivement DHPE et HPE), et de l'acide élénolique. Dans l'olive-drupe se trouvent également des formes de PP non spécifiques : des acides phénols, des flavones, des flavonols, des anthocyanes, présents dans de nombreux fruits, et des lignanes présents dans certaines graines. De façon détaillée, les composés phénoliques (Besançon et al., 2000; Tripoli et al., 2005) sont:

- des alcools phénoliques : hydroxytyrosol, tyrosol et son dérivé estérifié l'oléocanthal
- des acides phénols libres de la série benzoïque : acides protocatéchique, gallique, vanillique et homovanillique, syringique ;
- des acides phénols libres de la série cinnamique : acides p-coumarique, caféique, sinapique ;
- des dérivés estérifiés de l'acide caféique (le verbascoside) et de l'acide élénolique (oleuropéine glycosylée ou non, en grande partie responsable de l'amertume), ces deux acides étant estérifiés par l'hydroxytyrosol ;
- des flavonoïdes : des flavones (lutéoline, apigénine) et des flavonols (quercétine, kaempférol) (Servili, 2004) ; - des lignanes (Owen, et al., 2000d).

Les composés phénoliques majoritaires de l'huile d'olive sont l'oleuropéine, le tyrosol l'hydroxytyrosol, l'acide homovanillique et le verbascoside. Ce sont des éléments essentiels à la stabilité oxydative des huiles, ils participent à leurs caractéristiques organoleptiques, et ils possèdent des propriétés nutritionnelles et biologiques avérées.

Les structures chimiques des Polyphénols identifiés dans les fruits, les feuilles et les huiles d'olive sont classées par ordre alphabétique représentées dans la figure 7.

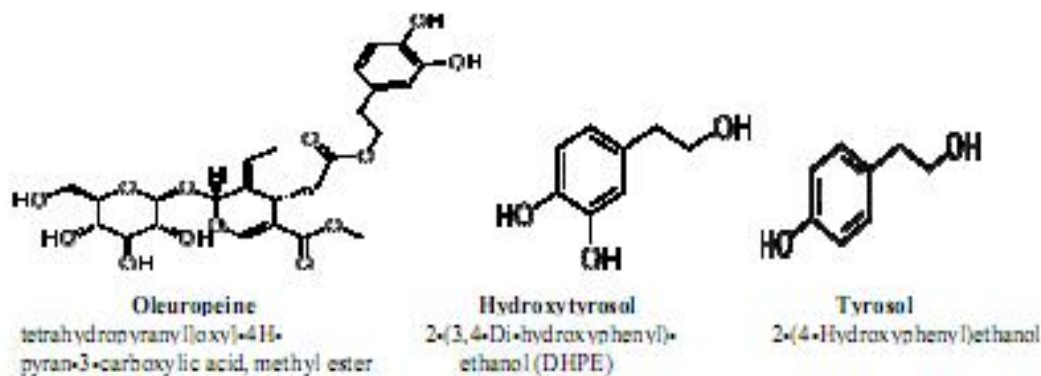


Figure 7 : Structures chimiques des trois principaux composés phénoliques d'olive (Tripoli, et a.l,2005).

I-4- 3. Les tocophérols

Les tocophérols sont reconnus pour leur double action bénéfique. En effet ils ont tout d'abord l'atout d'être une vitamine (vitamine E) et ils ont également une forte activité antioxygène (Burton, 1986). La teneur totale en tocophérols dans les huiles d'olive est très variable puisqu'elle a été reportée dans une gamme allant de quelques mg à 450 mg/kg d'huile (Gutierrez, 1999; Boskou, 2006). L'alpha-tocophérol représente à lui seul 90% de la totalité des tocophérols (Sherwin,1976), mais on trouve également un peu de beta et gamma tocophérols, alors que le delta tocophérol n'est présent qu'à l'état de traces

(Psomiadou,2000).Le contenu en tocophérols est fortement influencé par la variété d'olive, le stade de maturation et le processus de fabrication des olives de table (Sakouhi et al.,2008).

I-4- 4. Les alcools triterpéniques

Les alcools triterpéniques sont présents à la concentration de 100 à 300 mg pour 100 g, à l'état libre ou estérifié avec des acides gras (Soler-Rivas et al.,2007). Parmi ces composants, le cycloarténol est intéressant de par son action favorisant l'excrétion fécale du cholestérol, grâce à une augmentation de l'élimination des acides biliaires. Sont également présents l' α -amirine, le β -amyrine, et l'érythrodiol et l'uvaol, deux triterpènes rarement rencontrés ailleurs (Jacotot, 1993; Somova, et al.,2003).

I -4- 5. Les acides triterpéniques

Les acides oléanolique, maslinique,ursolique et butilinique sont présents en petite quantités dans l'olive et son huile(Perez et Cert,1999) , leur contenu dans l'huile d'olive extra vierge est compris entre 40 -185 mg /Kg (Gul,2006).

I -4- 6. Le squalène et les stérols

Les phytostérols sont des dérivés de squalène, qui est un terpène insaturé, il est présent en petite quantité dans l'huile d'olive de 200-7500mg/kg, environ 50%de la partie insaponifiable de celui-ci (Soler-Rivas et al., 2000 ; Boskou et al., 2006), et de 300-700mg/100g d'olive (Perez-Camino et Cert, 1999).Une teneur en stérols dans l'huile d'olive est de l'ordre de70-90mg/100g (Owen, et al.,2000) principalement , les sétostérols et les avenastérols (Tsimidou, 2006).

I -4-7. Les caroténoïdes

La bêta-carotène et la lutéine sont les principaux caroténoïdes dans l'huile d'olive vierge (Perez, et al, 1999), leurs teneur totale est comprise selon les travaux de Léon et ses collaborateurs en 2004 entre 1 à 20 mg/Kg (Léon, et al.,2004).

I -5. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques

L'olivier possède des facultés thérapeutiques exceptionnelles. Depuis les siècles que l'homme cultive l'olivier, il a découvert de multiples pouvoirs de guérison et de préventions contre certaines maladies. Toutes les parties de l'arbre servent à guérir : le fruit, la feuille, la fleur, l'écorce et l'huile d'olive.

L'huile d'olive présente essentiellement des propriétés antioxydantes, antihypertensives, antiagrégants plaquettaires responsables d'effets préventifs des maladies cardiovasculaires.

La consommation régulière de cette huile a des effets bénéfiques dans certains troubles de l'appareil digestif et hépatobiliaire, dans l'ostéoporose, dans la prévention du vieillissement et dans le renforcement du système immunitaire. Il exerce un effet protecteur vis-à-vis de certaines tumeurs malignes et diminue l'incidence de certains types de cancer (Ghedira, 2008). Les feuilles d'olivier ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels dans les pays européens et méditerranéens. Ils ont été utilisés dans l'alimentation humaine sous forme d'extrait, de poudre et de tisane (Karakaya, 2009). Elles exercent des activités antioxydantes, hypotensives, spasmolytiques, hypoglycémiantes, anti-inflammatoires, hypocholestérolémiantes et antiseptiques, outre les propriétés diurétiques pour lesquelles elle est utilisée sous forme de spécialité phytothérapeutique (Ghedira K, 2008). Des études cliniques ont en effet montré qu'ils étaient capables de diminuer la fonction plaquettaire chez des diabétiques et d'accroître le cholestérol-HDL plasmatique chez des sujets sains, ce qui est

clairement en faveur d'une diminution du risque athéro-thrombotique. Des modèles cellulaires ont permis de mettre en évidence des propriétés anti-prolifératives et pro-apoptotiques, ce qui pourrait suggérer un rôle préventif dans certains cancers comme le colorectal et le cancer du sein (Fki, et al.,2005) Une activité signalée Anti-HIV des extraits préparés a base de feuille d'olive et modulation de l' expression des gène par l'infection par le virus du Sida (Lee-Huang, et al.,2003). Une activité antifongique, anti-élastase des aldéhydes aliphatiques (Hexanal, nonanal, heptanal) contre les infection cutanées (les dermatomycoses) (Battinelli, et al.,2006).Les chercheurs ont également démontré chez l'animal des propriétés ostéoprotectrices de l'oleuropéine, polyphénol majeur des produits de l'olivier, en condition d'ostéoporose sénile, via ses propriétés anti-inflammatoires. En effet, la consommation d'oleuropéine à la dose de 0,015% dans le régime permet de protéger le squelette du processus de vieillissement mimé par une castration couplée à un processus inflammatoire.Ces polyphénols aux propriétés spécifiques ouvrent des perspectives très intéressantes pour la prévention de l'ostéoporose, tant postménopausique (Saleh, N.K. et Saleh, H.A.,2011).

I-6. Mécanisme d'action

Malgré le nombre d'études qui contribuent au modèle représenté a la figure (Perona, et al., 2006), plusieurs lacunes qui doivent être remplis avec d'autres enquêtes sont toujours présents.

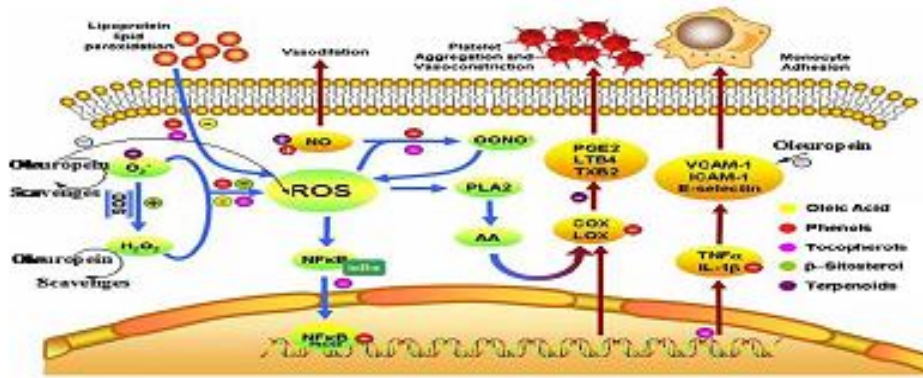


Figure 8 : Modèle proposé pour les mécanismes d'action de l'acide oléique et des composés mineurs de l'huile d'olive (Perona, et al., 2006).

Le principal mécanisme par lequel les composants de d'huile d'olive influencent l'activation endothéliales implique l'inhibition et/ou l'élimination des espèces réactives oxygénées (ROS).

L'acide oléique, l'oleuropéine et b-sitostérol peut réduire la production des ROS intracellulaire. le b-sitostérol peut également améliorer l'activité de l'enzyme, le superoxyde dismutase (SOD). Cette réduction a également été observé pour l'acide oléanolique terpénoïdes, bien que le mécanisme n'est pas connue actuellement.

Les tocophérols et les composés phénoliques sont des antioxydants puissants qui peuvent aider à réduire la peroxydation des lipides et la production des (ROS) intracellulaires, aussi à réduire la formation du peroxydant (OONO•).

Les polyphénols peuvent activer le facteur de transcription, nuclear factor-kappa B (NF- κ B), qui est ensuite transporté dans le noyau, où il se lie aux séquences de l'ADN pour induire l'expression des gènes. Cette mobilisation des NF- κ B est bloqué par un tocophérol succinate-mais pas par l' α -tocophérol. Les composés phénoliques ont été proposées pour agir en bloquant la formation de complexes ADN/ NF- κ B. Le NF- κ B module l'expression de cytokines, la

lipooxygénase (LOX) et cyclooxygénase (COX) ce qui affecte les niveaux de molécules d'adhésion et d'eicosanoïdes.

Ces enzymes lipoxygénase et cyclo-oxygénase et les cytokines sont inhibées par les phénols et triterpénoïdes à des points différents, alors que l'expression du cytokine l'Interleukin-1 beta (IL-1 β) est inhibée par les composés phénoliques et les tocophérols.

L'oleuropéine et l'acide oléanolique provoquent une augmentation de la production de monoxyde d'azote (NO) contribuant à protéger l'endothélium contre la vasoconstriction,

Par conséquent, le renforcement de la vasodilatation, l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des monocytes(Perona, et al., 2006).

A decorative orange frame with a wavy, hand-drawn style border. It has a central rectangular area with rounded corners and a small notch at the top and bottom center.

CHAPITRE 2:
LES POLYPHÉNOLS

II. Les composés phénoliques

II.1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel, D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix et *al.*, 2005).

II.2. Biosynthèse des composés phénoliques

II.2.1. La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Yao et *al.*, 1995).

II.2.2. La voie des phénylpropanoïdes

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose.

II.2.3. La voie de biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité phényle propanoïde avec trois unités malonyl-CoA. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes (Bruneton, 1999).

II.3. Principales classes des polyphénols

II.3.1. Les acides phénoliques simples

II.3.1.1. Acides hydroxycinnamiques

Dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules (Fig. 1).

II.3.1.2. Acides hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans la figure (2).

II.3.1.3. Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (Fig. 6).

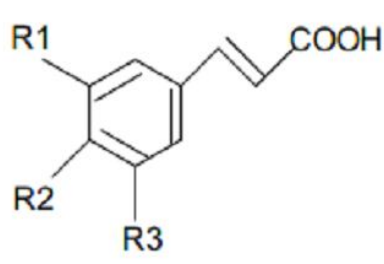
	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

Figure 1 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

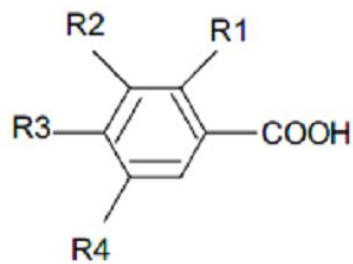
	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
OH	H	H	OH	Acide gentisique	

Figure 2 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

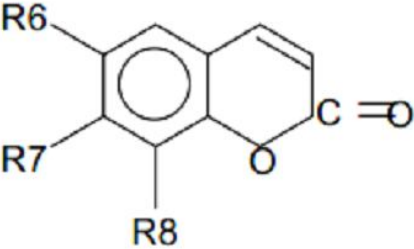
	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnétole

Figure 3 : Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005).

II.4. Les flavonoïdes

II.4.1. Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus = jaune) (Male_Éev et Kunti_ç, 2007).

Les flavonoïdes ont été désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt et al., 2001).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées, Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Ghedira, 2005).

II.4.2. Structure chimique et classification

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- γ -pyrane) mais de point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié.

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane. (Fig. 4) Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (Krishna et al., 2001).

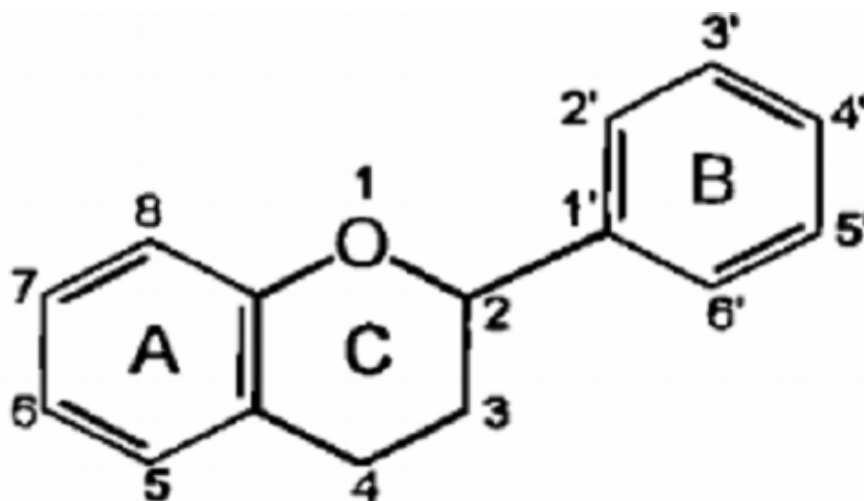


Figure 4 : Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna et al., 2001).

II.4.3. Localisation et distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels (Remsy et al., 1996).

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (Bruneton, 1993).

En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Ils sont largement abondants dans les légumes feuillés (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri (Bronner et Beecher, 1995).

II.4.4. Biodisponibilité des flavonoïdes

Les effets des flavonoïdes sur la santé ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être absorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes absorbés, Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des flavonoïdes est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé (Walle, 2004).

II.4.5. Quelques propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, elles sont également impliquées dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales. Agissent comme des pigments ou des co-pigments. Peuvent moduler la distribution d'auxine, comme elles fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Agis sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits. Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Subramanian et al., 2007).

II.5. Activités biologiques des polyphénols

Activité antioxydante

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert et al., 2005).

II.5.1. Les Radicaux libres

II.5.1.1. Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxy $\text{ROO}\bullet$, radical alkoxy $\text{RO}\bullet$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde $\text{O}_2\bullet^-$, radical hydroxyl $\text{OH}\bullet$, monoxyde d'azote $\text{NO}\bullet$, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxyde d'azote ONOO^- (Favier, 2003).

II.5.1.2 Origine des radicaux libres

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques (Figure II-1) afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome

Les rayonnements UV sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, également des antibiotiques, des anticancéreux L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme. (Borg J., 2004)

II.5.1.3 Nature des radicaux libres

II.5.1.3-1 Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon Fonctionnement de l'organisme. (Borg J., 2004).

a- Ion superoxyde : -O₂.

L'ion super oxyde -O₂.est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives. (Borg J., 2004).

b- Radical libre hydroxyle : (OH.)

Le radical libre hydroxyle (OH.) est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion super oxyde. (Borg J., 2004).

c- Oxygène singulet: 1O₂

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande

réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :

.O-O. 1O₂ (sous l'action de la lumière). (Borg J., 2004).

II.5.1-3-2 Espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène.

Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par exemple :

Les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.

Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives. (Borg J., 2004)

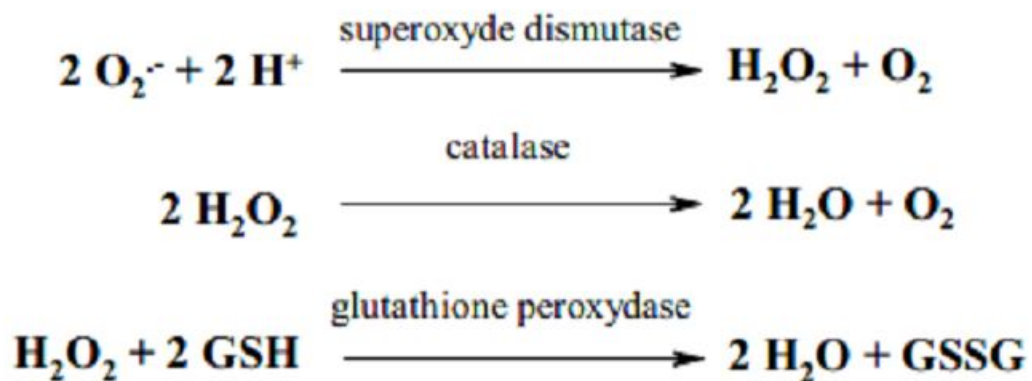
II.5.2 Antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

II.5.2.1. Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (Favier,

2006). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

II.5.2.2. Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Fig. 8) (Dacosta, 2003).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,...etc. (Kohen et Nyska, 2002)

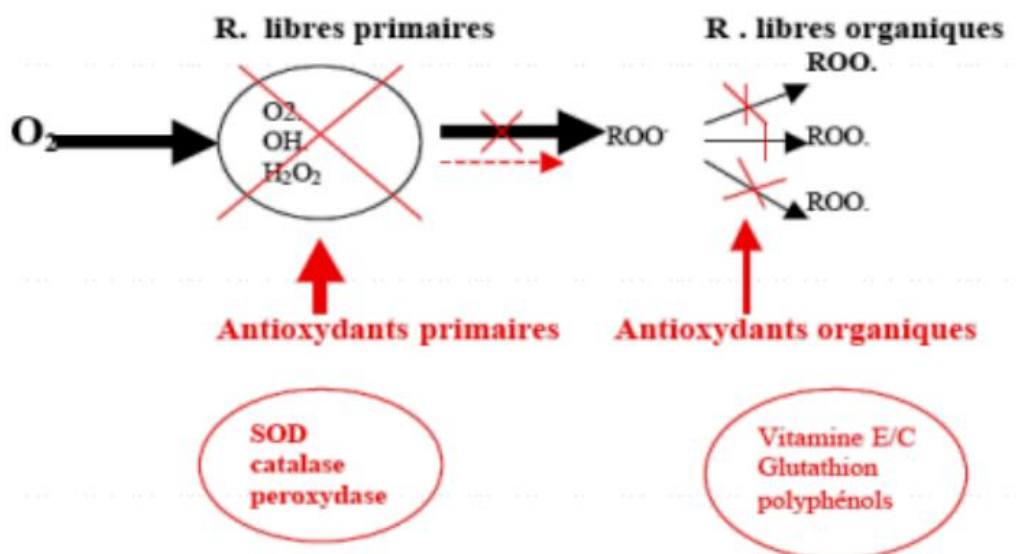


Figure 5 : les systèmes de défense contre les radicaux libres (Kohen et Nyska, 2002).

II.5.2.3. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Les ROS ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (Favier, 2003).

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution, ...) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (Sohal et al., 2002).

Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) (Kohen et Nyska, 2002).

II.5.2.4. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol (Favier, 2006).

En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire (Favier, 2006).

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (Favier, 2006).

II.5.2.5. Antioxydant d'origine végétale

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols (Lopez G.V. et *al*, 2005).

a- Tocophérols :

La grande stabilité des huiles végétales, dans les conditions d'oxydation, est due à la présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels dont les plus importants sont les tocophérols qui se présentent sous quatre formes isométriques : α , β , δ et γ . Les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI). Ont signalé qu'une molécule de tocophérol peut protéger 103 à 106 molécules d'AGPI. (Lopez G.V. et *al*, 2005).

Exemple de tocophérol :

La vitamine E :

La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central).

Il existe dans la nature plusieurs dérivés de la vitamine E à activités différentes (α -, β -, γ -, δ - tocophérol, tocotriénols, ...). Ils sont différenciés par les substituants du noyau chromanol (noyau benzyle associé à un hétérocycle à six carbones substitués par un hydroxyle et par une chaîne latérale ramifiée saturée s'il s'agit de tocophérol ou insaturée s'il s'agit de tocotriénols) (Lopez G.V. et *al*, 2005).

b- Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont, avec la chlorophylle et les anthocyanes, les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seule une quarantaine est retrouvée régulièrement dans l'alimentation humaine. Une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée dans le plasma et les tissus humains, mais 6 caroténoïdes sont majoritaires : le β -carotène, le lycopène, la lutéine, la β -cryptoxanthine, l' α -Carotène, et la zéaxanthine (Lopez G.V. et al, 2005).

Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertis en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A.

Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes:

Ils sont capables de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes :



Produits inactifs BC : β carotène (Lopez G.V. et al, 2005).

II.2.2. Activité antimicrobienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les

mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

II.2.2.1. Les principales substances antimicrobiennes

II.2.2.1.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des microorganismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

II.2.2.1.2. Les composés phénoliques

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du

pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (Ulanowska et al., 2007).

Des flavonoïdes, une flavone et une flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montrés comme possédant l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Wächter et al., 1999). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont été rapportés exhiber une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus* une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs (Valsaraj et al., 1997).

A decorative orange frame with a wavy, hand-drawn appearance, enclosing the text. The frame has a scalloped top edge and a similar scalloped bottom edge, with straight vertical sides.

Partie
expérimentale

A decorative orange border with a wavy, hand-drawn appearance, framing the text. It has a central opening at the top and bottom, creating a shape similar to a stylized book or a scroll.

*Matériels et
méthodes*

A decorative orange border with a wavy, hand-drawn appearance, framing the text. It has a central opening at the top and bottom, creating a shape similar to a scroll or a banner.

*Matériels et
méthodes*

I. Matériels et méthodes

I.1 Matériel

I.1.1. Matériel végétal :

Les échantillons d'olives ont été collectés fin novembre 2015, selon les données de la direction des services agricoles (D.S.A) de Mascara, notre choix est orienté vers deux variétés d'olives : une est plus dominante à Mascara (90%) concernant la variété Sigoise (VS) et l'autre Chemlal (VC).



Figure 8 : Fruits d'olives Sigoise gauche à et Chemlal à droite.

I-2. Méthodes

I-2-1 .Caractérisation physique :

Les paramètres physiques des olives déterminés sont :

- Moyenne du poids.
- Moyenne de largeur.
- Moyenne de longueur.
- Taux d'humidité
- Taux de matière grasse.

Pour déterminer les trois premiers paramètres cités au-dessus, on prend des échantillons aléatoires de 30 fruits qui seront pesés pour déterminer le poids moyen du fruit, la largeur et la longueur moyennes ont été réalisées à l'aide d'un pied -coulisse.

Ces fruits seront ensuite congelés jusqu'au moment où ils pourront être dénoyautés.

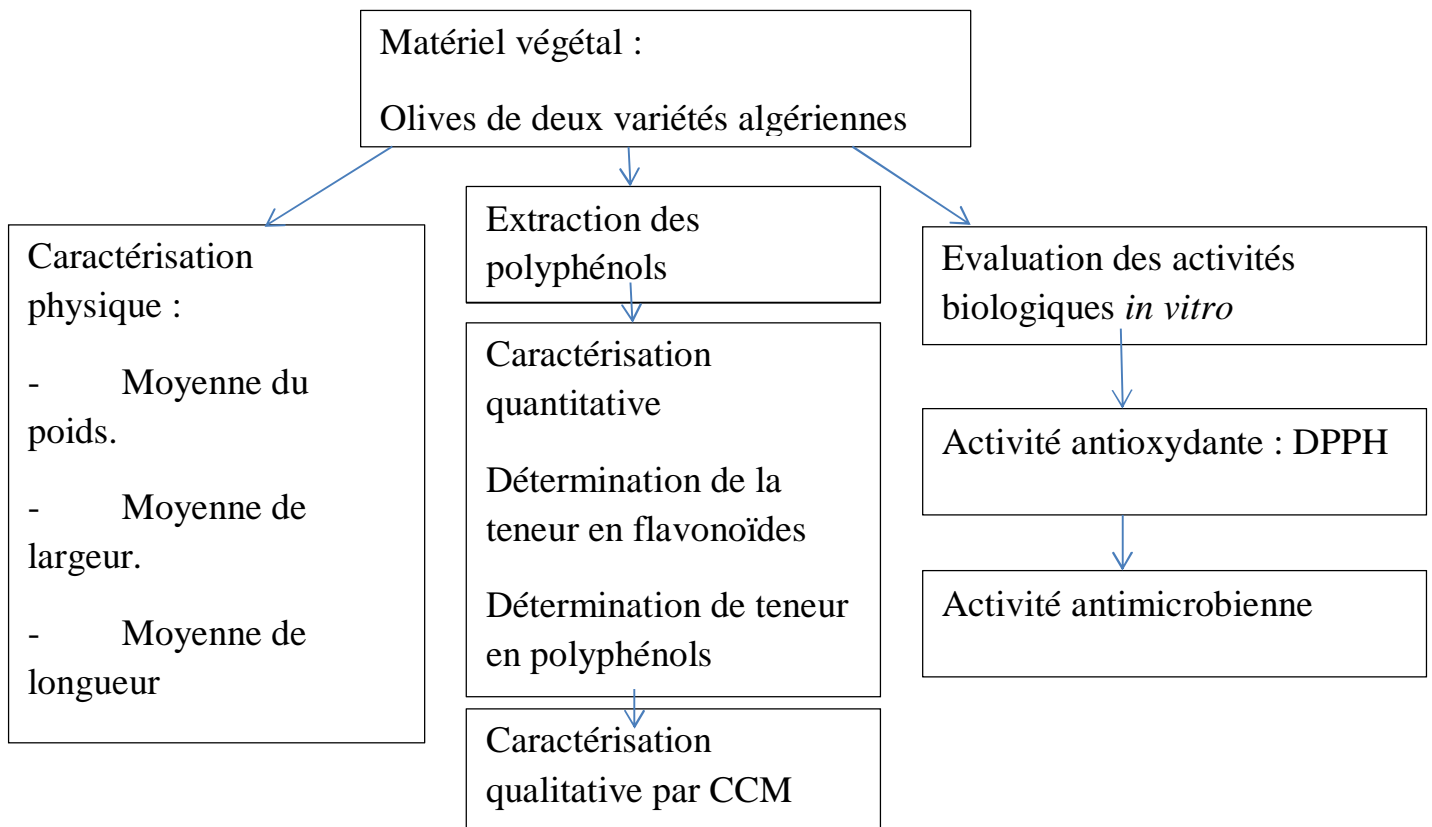


Figure 9 : schéma de différentes étapes de réalisation de cette étude.

I-2-1-1 .Taux d'humidité :

La méthode utilisée est connue sous le nom de *dessiccation par évaporation* ou méthode gravimétrique ou pondérale. On procède à la dessiccation du matériel végétal à la température de $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans une étuve ventilée jusqu'à poids constant. La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation (Audigié *et al.*, 1978). À partir du même échantillon de pulpe d'olive, on séparera également deux sous échantillons que l'on déposera sur des boîtes Pétri préalablement pesées et recouvertes d'un film de papier d'aluminium résistant à des températures élevées. Les fruits seront séchés dans une étuve à 105°C pendant 42 heures (Manallah A., 2012).

Une fois que l'olive sera sèche, on pèsera de nouveau les deux plateaux pour déterminer le poids sec de l'olive et donc, son humidité. La teneur en eau est calculée par la formule suivante :

$$H\% = \frac{M1-M2}{Pe} \times 100$$

H% : Teneur en eau.

M1 : Poids de la capsule + échantillon avant dessiccation.

M2 : Poids de la capsule + échantillon après dessiccation.

PE : La prise d'essai.

Nous avons déterminé la moyenne des pourcentages d'eau de 3 essais dans les mêmes conditions. La matière sèche (MS) est obtenue comme suit :

$$MS \% = 100 - H\%$$

I-2-1-2 .Taux de matière grasse ou teneur en huile

L'extraction d'huile de pulpe d'olive se fait par un système Soxhlet (figure 10)



Figure 10 : Extraction des huiles de pulpe d'olive par Soxhlet.

Pour 20g de pulpes d'olive broyées introduite dans une cartouche de cellulose, on a besoin de 200 ml de n-hexane. Après 4 heures, on récupère le solvant organique par une évaporation sous vide (figure), porté à une température voisine de celle de l'ébullition du solvant, soit 60 °C environ. (Virot et *al.*, 2002) La masse d'huile de pulpe pour les deux variétés étudiées est déterminée par double pesée, et les rendements en matière grasse (MG%) sont ainsi calculés.



Figure 11 : évaporation sous vide par rotavapor.

I-2-2. Extraction des polyphénols de pulpe d'olive

Les procédures de préparation des échantillons pour l'analyse des composés phénoliques varient beaucoup en fonction de la nature des composés à analyser. La préparation de l'échantillon de cette étude les fruits d'olive des deux variétés sont soumis à un dénoyautage et à un séchage à l'étuve à 40° C, puis une étape de Broyage à l'aide d'un Moulinex (un moulin à café) pour obtenir un échantillon grossièrement moulu.

Le matériel végétal a été conservé dans des flacons ombrés, dans le congélateur pour les analyses ultérieures (Manallah A., 2012)

Extraction hydro-méthanolique :

Dans une première extraction on ajoute à 25g de l'échantillon préparée 175ml du mélange MeOH-Eau : 80% (v/v), le mélange a été soumis à une macération avec agitation à l'aide d'un Osill, pendant 12 heures, après une filtration sous vide a été effectuée à travers un entonnoir, le filtrat1 a été évaporé sous pression à l'aide d'un rotavapor pour une élimination totale du méthanol, et l'obtention d'un extrait aqueux 1 puis le premier résidus a été récupéré pour une deuxième extraction hydrométhanolique (MeOH-Eau : 50% (v/v), puis le mélange a été agité pour une durée de 6 heures, le mélange obtenu a été centrifugé à une vitesse de 3000g ,pour 10 minutes .le surnageant a été évaporé sous pression tout comme pour le filtrat1. A la fin les deux extraits combinés ont été soumis a une délipidation par l'hexane.

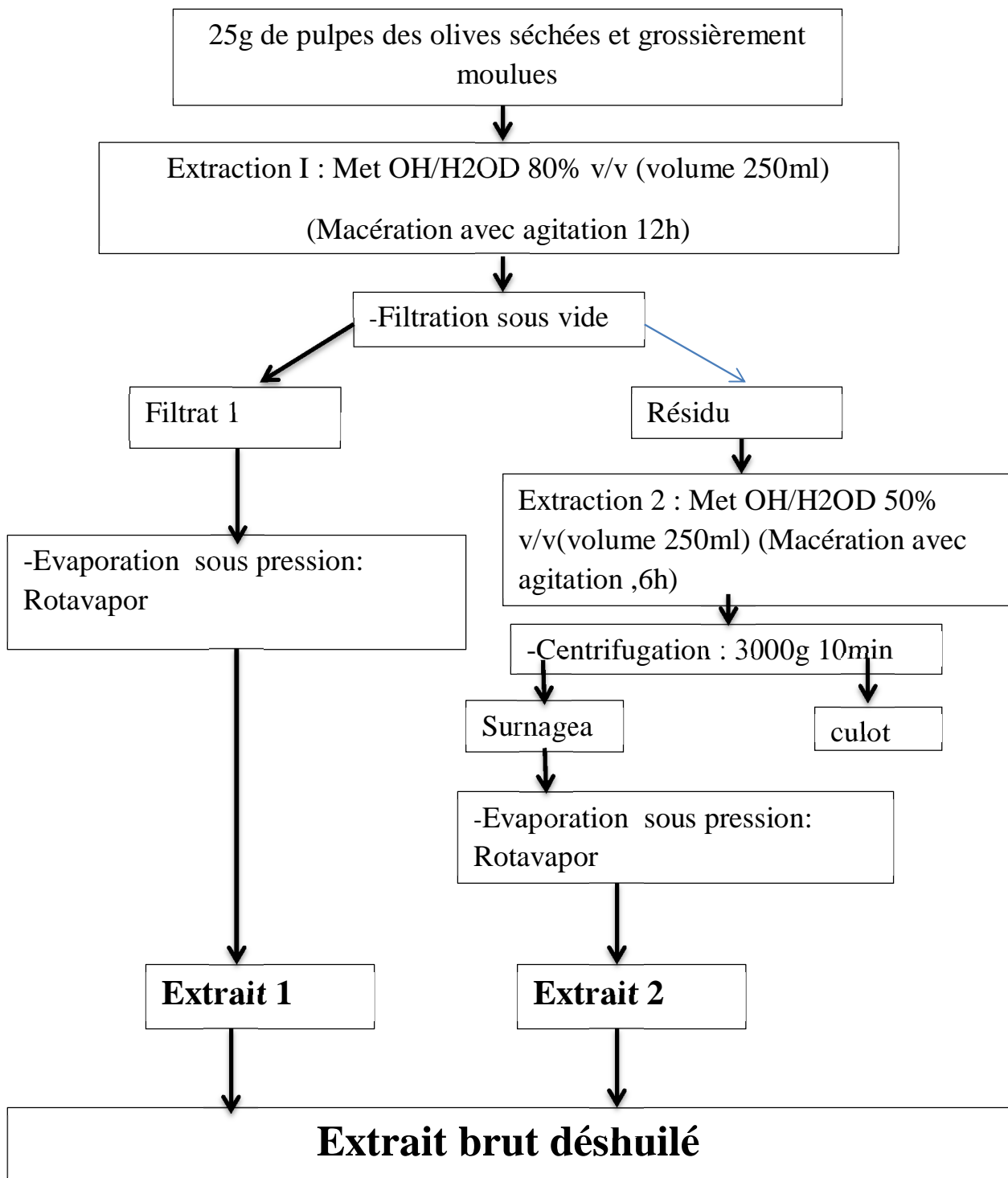


Figure 12: Schéma représentative des étapes pour l'extraction des polyphénols d'olive.

I-2-3. Caractérisations quantitative et qualitative des polyphénols

I-2-3-1. Caractérisation quantitative des extraits

I-2-3-1-1. Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie (méthode de Folin-Ciocalteu)

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999).

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), (Ribéreau-Gayon et al., 1972). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

Une quantité de 200ml de l'extrait est mélangée avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8ml de carbonate de sodium à 7,5% (Na_2CO_3). L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par g de matière végétale sèche. (Bougandoura N., Bendimerad N., 2013).

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0-250 μ g/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 100 g poids sec de la pulpe (mg EAG/100g). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

I-2-3-1-2. Dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de trichlorure d'Aluminium

La méthode repose sur le principe du dosage direct par le chlorure de l'aluminium. En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{3+} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (Ribereau-Gayon P., 1968).

Brièvement, un millilitre d'extrait dilué dans le méthanol, ainsi que le flavonoïde standard la rutine aussi préparé dans du méthanol est ajouté à 1 ml de $AlCl_3$ (Solution méthanolique de 2%). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée par la rutine à différentes concentrations (0-10 μ g/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent de rutine par 100 g poids sec de la pulpe (mg ER/100g). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

I-2-3-2. Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la

phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile. (Manallah A., 2012)

Pour caractériser les deux extraits VS et VC de pulpe d'olive, une CCM a été utilisée.

Après activation des couches durant 10 minutes du front de migration (15cm), les témoins ou standards (Quercitine, Vanilline, Acide gallique) de concentration de 5mg/ml, les échantillons concentrés de sont déposés sous un faible volume (2- 5 µl). La chromatographie est alors développée dans une cuve de migration préalablement saturée par une phase mobile

constituée de trois solvants (Chloroforme :Acétate d'éthyl :Acide formique,50 :40 :10) (Riov, J., Gottlieb, H.E. 2006) puis les plaques sont séchées sous hotte et visualiser par deux révélateurs, Le bleu de Pruss spécifiques aux polyphénols a été préparé selon la méthode de (Merghem *et al.*,1996),deux solutions aqueuses fraîches de 0,02M de FeCl₃, et 0,016M de K₃Fe(CN)₆, Le mélange de ces solutions se fait à part égale au moment de l'utilisation 1 :1 (v/v). Et le deuxième révélateur, la Vanilline- acide sulfurique (H₂SO₄) préparée de la manière la suivante : 1g vanilline dans 100ml d'une solution l'éthanol. Après pulvérisation de la solution préparée sur les plaques CCM il est nécessaire de les chauffées à l'étuve à une température de 100° pendant 10 à 15min.

La nature des composés constituants des extraits polyphénolique est déterminée par la comparaison des rapports frontaux (RF) des témoins avec les rapports frontaux des spots des échantillons.

$$RF = \frac{\text{La distances parcourue par le composé(mesuré au centre de la tache)}}{\text{La distance parcourue par le front du solvant}}$$

I-2-4. Activité antioxydante :

I-2-4-1. Le test de piégeage du radical DPPH :

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH.) est réalisé par la méthode décrite par (Ammar et al., 2009) qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la CI50 des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H⁺.



Où AH est un composé capable de céder un H⁺ au radical DPPH.

On prend 50µl de chaque extrait (VS, VC) et de différents dilutions de ce dernier :1/2 ,1/4, 1/8 1/16, 1/32, 1/64 et 1/128,ainsi que les standards le BHT et la rutine (10mg/ml),et le contrôle sont ajoutées à1950µl d'une solution méthanolique du DPPH(6,086x10⁻⁵ mole/l). Ce mélange a été incubé 30 minutes, puis on a mesuré l'absorbance à 517nm. Les résultats sont exprimés comme étant le pourcentage de L'activité anti radicalaire. (Kartal *et al.*,2007)

L'activité anti radicalaire est estimée en pourcentage grâce à la formule suivante

$$\% \text{AAR} = \frac{\text{D.O contrôle} - \text{D.O échantillon}}{\text{D.O contrôle}} \times 100$$

La réalisation de la cinétique de cette activité a permis de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC50); la valeur d'IC50 la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur d'IC50 est exprimée en µg. ml⁻¹ (3 répétitions pour chaque concentration).

1.3. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 10 µl de chaque extrait.

1.3.1. Activité antibactérienne

1.3.1.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit :

Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

1.3.1.2. Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

1.3.1.3. Préparation des dilutions d'extraits d'olives

Les extraits d'olives VS VC ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 200 mg/ml.

Les extraits sont stérilisés par microfiltration.

1.3.1.4. Préparation de l'inoculum

– *Bacillus subtilis* : bactéries Gram+ ;

– *Echerichia coli*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosas*, : bactéries Gram–.

Ils ont tous été fournis par le laboratoire de bactériologie Bioconversion et Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (Faculté des Sciences de la Nature et de Vie)

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

1.3.1.5. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif).

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

1.3.1.6. Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques.

I-2-6. Analyse statistique

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2010, et les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel SPSS (version 11). Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écart-type SD. Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)]. La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

A decorative orange frame with a wavy, irregular shape, resembling a scroll or a banner, surrounding the text.

Résultats & discussion

II. Résultats et discussion

II-1. Caractérisation physique des variétés d'olive

La caractérisation physique de l'olive est d'une grande importance pour l'identification des différentes variétés et leur classification selon l'usage en agroalimentaire (Variété d'olive pour l'extraction d'huile, variété d'olive de table ou variété à double fin). Les résultats de la caractérisation des deux variétés d'olive étudiées sont mentionnés dans le tableau 3

Variété d'olive	Sigoise	Chemlal
Couleur	noir	Vert
Forme	Arrondie	Ovoïde
Poids (g)	4.22 ±1,36	3.96 ±0,7
Longueur (cm)	2,64±0,05	2,47±0,08
Largeur (cm)	2,07±0,31	1,82±0,85

Tableau 3: Caractérisation des olives des deux variétés (Sigoise et Chemlal) de Mascara.

Les deux variétés (Sigoise et Chemlal) sont à maturité de couleurs et morphologie différentes : la variété Sigoise est noire de forme arrondie et l'autre Chemlal est verte avec forme ovoïde.

Concernant le poids la variété Sigoise se caractérise par un poids de 4,22g supérieur à celui de la variété Chemlal (3,86g).

Pour la longueur, la VS avec une longueur de 2,64 cm supérieur à celle d'olive de VC (2,47cm), et même pour la largeur la VS est plus large (2,07 cm) par rapport à la VC (1,82 cm).

Les deux variétés d'olive (Sigoise et Chelal) sont classées dans la catégorie d'olive avec un poids de fruit moyen de 4 à 6g selon la classification effectué par Del Rio et Caballero (1998)

Les caractères pomologiques des fruits d'olive sont influencés par le patrimoine génétique et par le site géographique (Cimato, 1990).

II-1-2. Taux d'humidité

les histogrammes ci-dessous (figure 13) montrent les résultats des calculs de taux d'humidité (H%) et de matière sèche (MS) des deux variétés

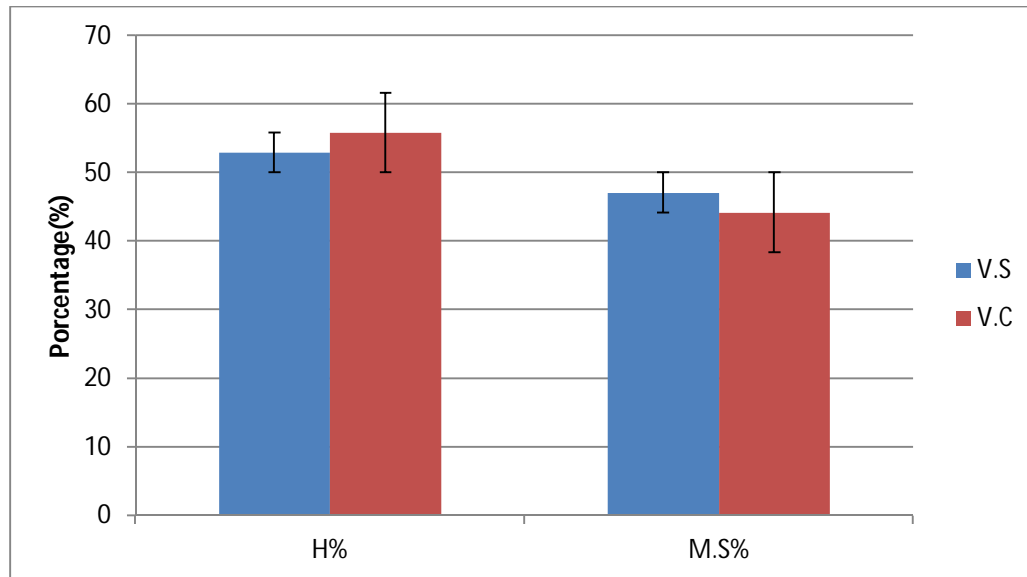


Figure 13 : Taux d'humidité et de matière sèche des variétés d'olive sigoise et Chemlal

D'après les résultats obtenus, on remarque que le taux d'humidité l'olive des deux variétés VS et VC (52.91%-55.83%) est supérieure au pourcentage de matière sèche(47.09%-44.17%) la comparaison de ces résultats avec le travail de Sousa, et al.,2011 ; Malheiro et al.,2012 montre que les olives de table du Portugal« alcaparras » sont caractérisées par une teneur très élevée en eau entre 70-72% par rapport les variétés VS et VC mais a d'autre part Boskou et al.,2006 montrent que les olives de la Grèce présentent un taux d'humidité de 48% inférieur à celui de la VS et VC.

Le taux d'humidité élevé constitue un problème majeur au sein du secteur oléicole lors de l'extraction d'huile car les eaux résiduelles de végétation de l'olive (marges ou déchets liquide de l'huilerie d'olive) considérés comme polluants pour l'environnement et leur évacuation est coûteuse. Ainsi, ces

margines sont aussi une source d'agents antioxydants très recherchés pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé et cela fait appellation à la valorisation de ses eaux riches en polyphénols et en produits organiques fertilisants, combustibles de l'énergie et utilisés dans l'alimentation des animaux (Nefzaoui,1991 ; Sayadi, *et al.*,2008).

II-1-3. Teneur en huile

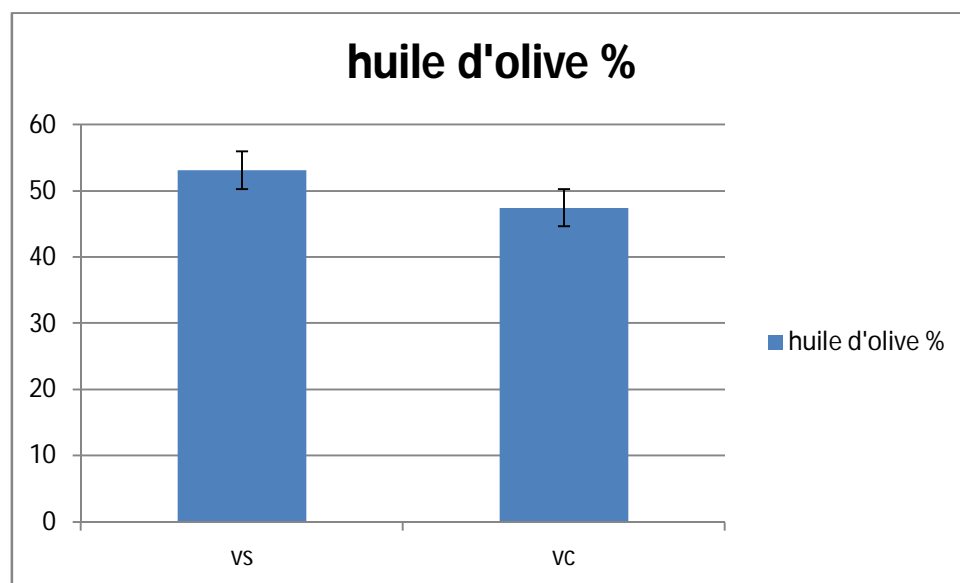


Figure 14 : Teneur en matière grasse MG% des olives VS et VC.

L'extraction des huiles des olives des deux variétés a permis d'obtenir de l'huile de couleur jaunâtre clair pour la VC et peu turbide pour la VS avec odeur piquante.

La variété Sigoise est plus riche en huile par rapport à la variété Chemlal avec un rendement de 53.12% pour VS et de 47.50% pour VC.

Romero et ses collaborateurs en 2002 ont classé les variétés d'olives selon le contenu en matière grasse à une variété avec un rendement élevé (rendement supérieur à 46%), donc cette variété est recherchée pour la production d'huile d'olive et non pas pour la préparation d'olive de table, et l'autre variété c'est la variété qui possède un rendement moyen (le rendement est compris entre 38 et 46%) ou faible (inférieur à 46%)

Donc les deux variétés étudiées VS et VC sont classées dans la première catégorie caractérisée par un rendement élevé de matière grasse (supérieur à 46%).

Si on compare ces résultats avec d'autres travaux on trouve que les rendements pour les variétés italiennes varient dans une large gamme de 58% selon (Ryan, 1998), et entre 19% à 71% pour des variétés d'olive grecque (Boskou et al., 2006). Ces grandes bascules dans les rendements d'huile entre les variétés et même au sein de la même variété peuvent être expliquées par l'influence des facteurs climatique, pédologique et le site géographique.

Ainsi les caractères pomologiques des fruits d'olive sont influencés par le patrimoine génétique et par le site géographique (Cimato, 1990 ; Ben Temmine, et al., 2006). Chaque individu, dans son milieu, exprime différemment ses potentialités génétiques ce qui se traduit par une importante variabilité intra-variétale (Hannachi et al., 2008).

Ces rendements peuvent varier selon la méthode d'extraction qui a une influence sur ce caractère. Les rendements seront plus élevés dans le cas de l'extraction physique par pression que ceux dans le cas de l'extraction chimique à l'aide de solvants (Bogani, *et al.*, 2007; Vassiliki, *et al.*, 2009).

II-2. Caractérisation quantitative et qualitatives des extraits d'olive

II-2-1. Teneurs des olives en polyphénols et en flavonoïdes

Les extraits obtenus à partir de pulpe d'olive sont de couleur marron foncé.

Les résultats obtenus de dosage des polyphénols dans les extraits de VS et VC réalisé par la méthode du Folin-Ciocalteu (Li et al., 2007) à l'aide d'une gamme d'étalonnage établie avec différentes concentrations d'acide gallique sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100g de matière sèche (mg EAG/100g MS).

Le contenu en flavonoïdes est également estimé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (Bahorum T., 1997; Djeridane *et al.*, 2006) En utilisant la quercitine pour établir la gamme d'étalonnage (figure 37). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercitine par 100g de matière sèche (mg ER /100g MS).

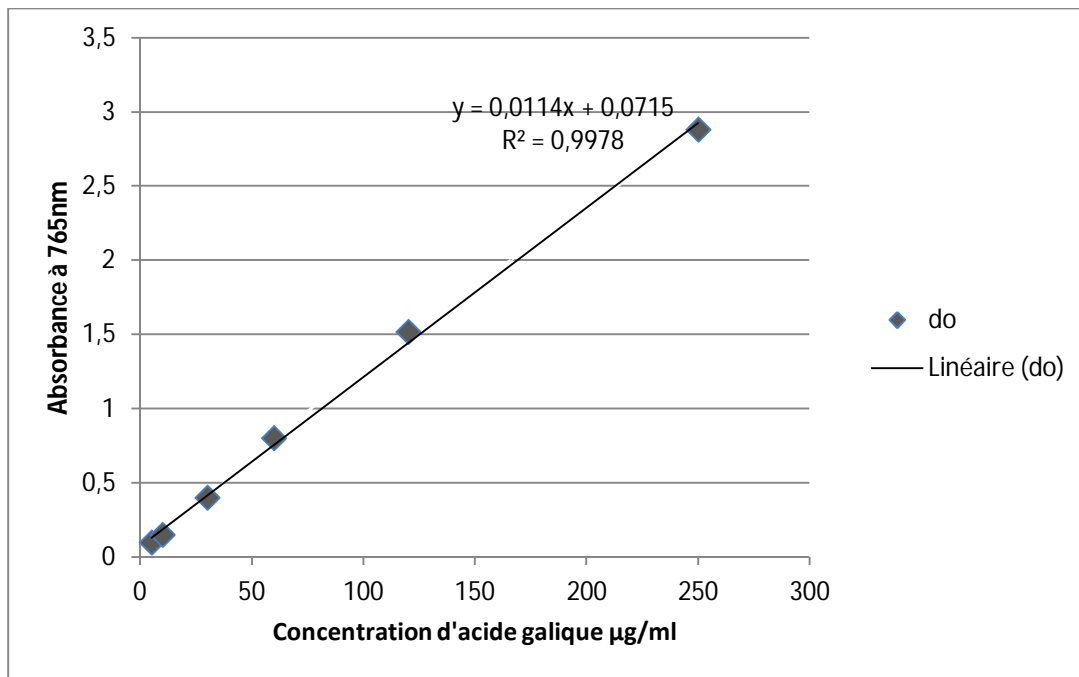


Figure 15: Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique (Moyenne \pm SD de trois essais).

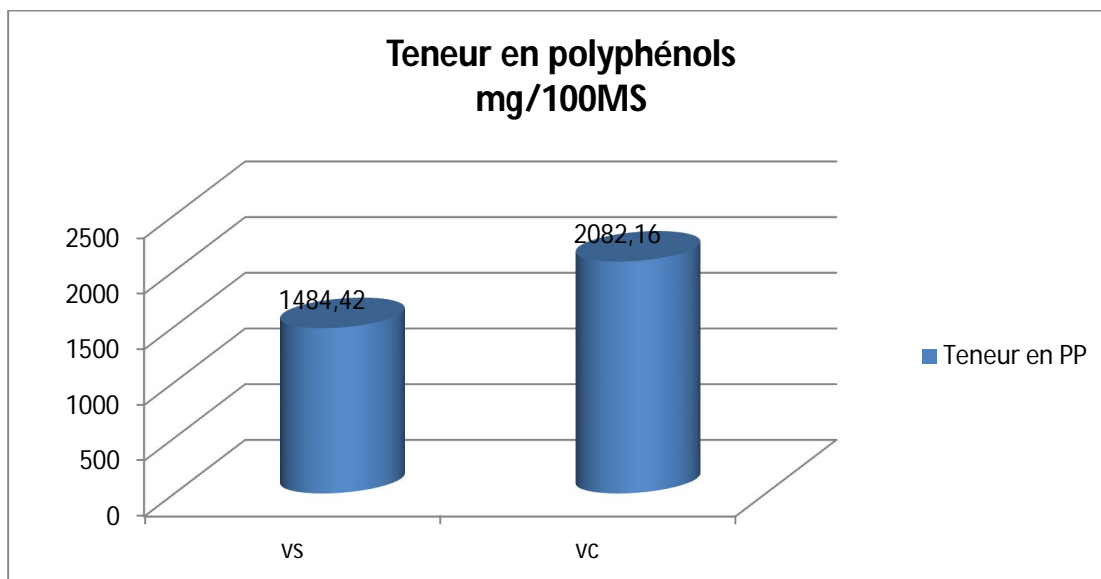


Figure 16 : Teneurs en polyphénols des extraits d'olive.

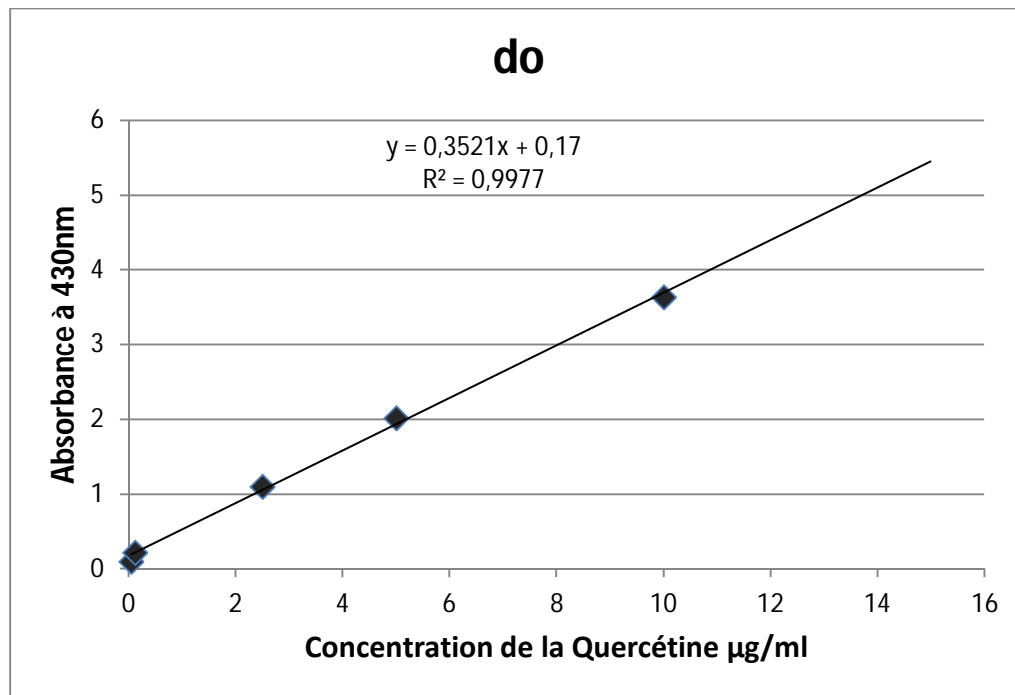


Figure 17: Droite d'étalonnage de la Quercétine (Moyenne \pm SD de trois essais)

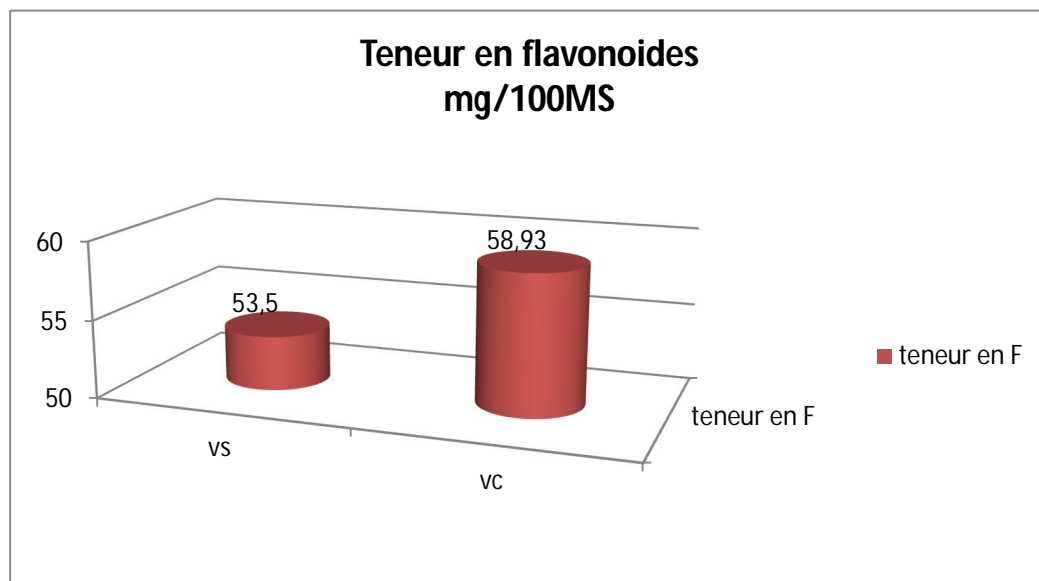


Figure 18: Teneurs en flavonoïdes des extraits d'olive.

D'après les résultats des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes il ressort que les deux variétés d'olives sont riches en polyphénols et en flavonoïdes. En effet, les teneurs en polyphénol sont : 2082.16mg et 1484.42mg pour 100g de matière sèches d'olive des variétés VC et VS respectivement.

Concernant les teneurs en flavonoïdes il apparaît que la VC possède un taux supérieur (58.93 mg ER /100g MS) par rapport à celui de la VS dont le taux est de 53.5 mg ER /100g MS. Le rapport flavonoïdes / polyphénols est de l'ordre de 2,83 % et 3,6% pour les variétés VC et la VS respectivement.

Parmi les études qui s'intéressent à la quantification des polyphénols on trouve l'étude de Bisset en 2011 qui a étudié trois variétés d'olive de l'Est Algérien, Batna (Chemlali, Farhi, et Beskri) possèdent un contenu en polyphénols de 1919,29 ; 2664,88 et 2931,86 mg/100g, et en flavonoïdes de 29,62 ; 30,62 et 35,47 respectivement.

D'autre étude similaire sur les extraits d'olive du nord -ouest (olives Sigoise) montre que le contenu des polyphénols varie entre 431,6 et 2288 mg/100g de matière sèche (Benlarbi, 2004)

Au vue de ces données les extraits d'olive des variétés VC et VS sont considérées comme des variétés très riches en polyphénols et en flavonoïdes.

Le profil polyphénolique des olives peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété, le climat, le degré de maturation (l'olive vert possède plus de polyphénols que l'olive noire) (Ryan *et al.*, 1999 ; Benlarbi, 2004), la température et le solvant d'extraction (la température élevée et le solvant constitué de 80% méthanol : eau permet d'obtenir un grand rendement en polyphénols) (Sousa *et al.*, 2008 ; Conde, *et al.*, 2009).

A l'issue de ces résultats de la caractérisation quantitative, l'olive à travers ces constituants en polyphénols et en flavonoïdes constitue une source prometteuse en composés bioactives bénéfiques à la santé humaine (Manallah A., 2012)

II-2-2. Caractérisation qualitative des extraits

L'analyse qualitative des extraits polyphénoliques d'olive par la chromatographie sur couche mince a révélé que les deux extraits ont presque la même composition qualitative et contiennent un nombre considérable de constituants visibles sur les profils chromatographiques (figure 37).

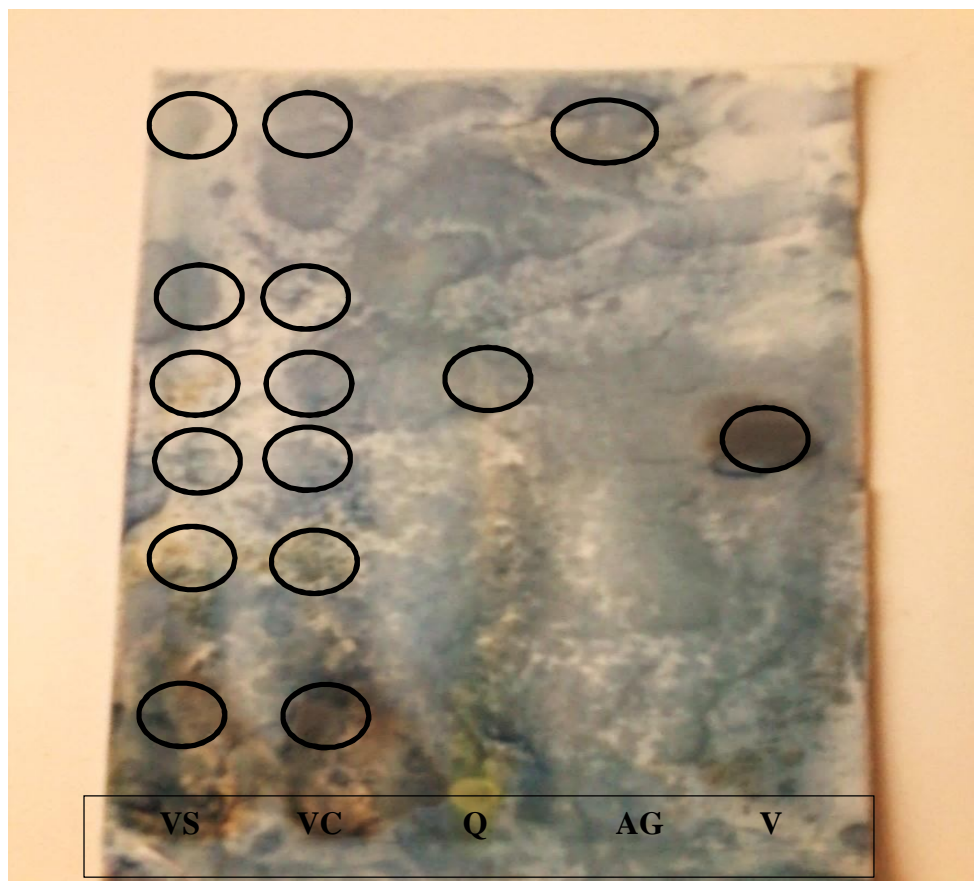


Figure 15: Chromatographie sur couche mince des extraits polyphénoliques des variétés d'olive (VS) et (VC) La révélation chimique a été réalisée par le bleu de Pruss.

VS : extrait d'olive variété sigoise

VC : extrait d'olive variété Chemlal.

A : Acide gallique

Q : Quercétine.

V : Vanilline.

Les rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits ainsi que ceux des témoins rapportés dans le tableau 6 montrent que les extraits polyphénoliques des deux variétés d'olive ont donné lieu à des spots communs de points de vue coloration, position et même dans le nombre, donc on suppose que les deux extraits possèdent une composition presque identique.

Tableau 4 : Rapports frontaux (Rf) des spots des extraits et des témoins dans le système (CHCl₃ / CH₃-COO-CH₂-CH₃ / H-COOH : 50/40/10, v/v/v).

Extraits ou standards	Spots	Rfs
VS	6spots	1 :0.18 2 :0.44 3 :0.58 4 :0.71 5 :0.78 6 :0.90
VV	6spots	1 :0.19 2 :0.44 3 :0.58 4 :0.71 5 :0.78 6 :0.90
Acide gallique	1spot	0.90
Quercétine	1spot	0.71
Vanilline	1spot	0.58

Au visible et après développement dans le système constitué du chloroforme, acétate d'éthyle et de l'acide formique (CEF), avec la révélation chimique par le bleu de Pruss a permis de visualiser les composés phénoliques issus de la séparation des constituants des extraits sous forme de taches. Cette coloration est

due à la complexion du FeCl₃ avec les ions ferreux résultants de l'oxydation du ferricyanide de potassium par les composés phénoliques (Price et Butler, 1977)

Le chromatogramme obtenu montre que les deux extraits (VC et VS) sont riches en composés phénoliques et possèdent une composition variée en polyphénols constitué des flavonoïdes tels que la quercétine et la vanilline, et d'un acide phénolique, l'acide gallique.

Ces composés phénoliques confèrent aux olives plusieurs activités biologiques, principalement l'activité antioxydante pour la prévention des maladies provoquées par le stress oxydant telles que l'athérosclérose (Omar, 2010).

II-3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de polyphénols d'olive a été évaluée par le DPPH•

II-3-1. Effet de piégeage du radical DPPH•

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité antiradicalaire des extraits de plantes (Laguerre *et al.*, 2007) .

Les résultats de l'activité antioxydante a révélé que les deux extraits d'olive possèdent une activité anti-radicalaire (AAR) (figure 38), quand la concentration des polyphénols augmentent dans le milieu réactionnel, le pourcentage d'inhibition augmente proportionnellement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'inhibition presque totale du DPPH• présent dans ce milieu.

L'effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical DPPH• est exprimé par la concentration inhibitrice à 50 % (CI50) qui correspond à la concentration des polyphénols nécessaire pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH•. Une CI50 faible représente l'activité anti-radicalaire la plus élevée (Molyneux, 2004 ; Manallah A., 2012). Tous les CI50 sont calculés à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents composés à tester avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,95 ($R^2 > 0,95$).

La figure 41 représente les valeurs des concentrations responsables de 50% de l'activité de piégeage du radical le DPPH• (CI50) des extraits polyphénoliques des variétés VS et VC et de la Quercétine (standard).

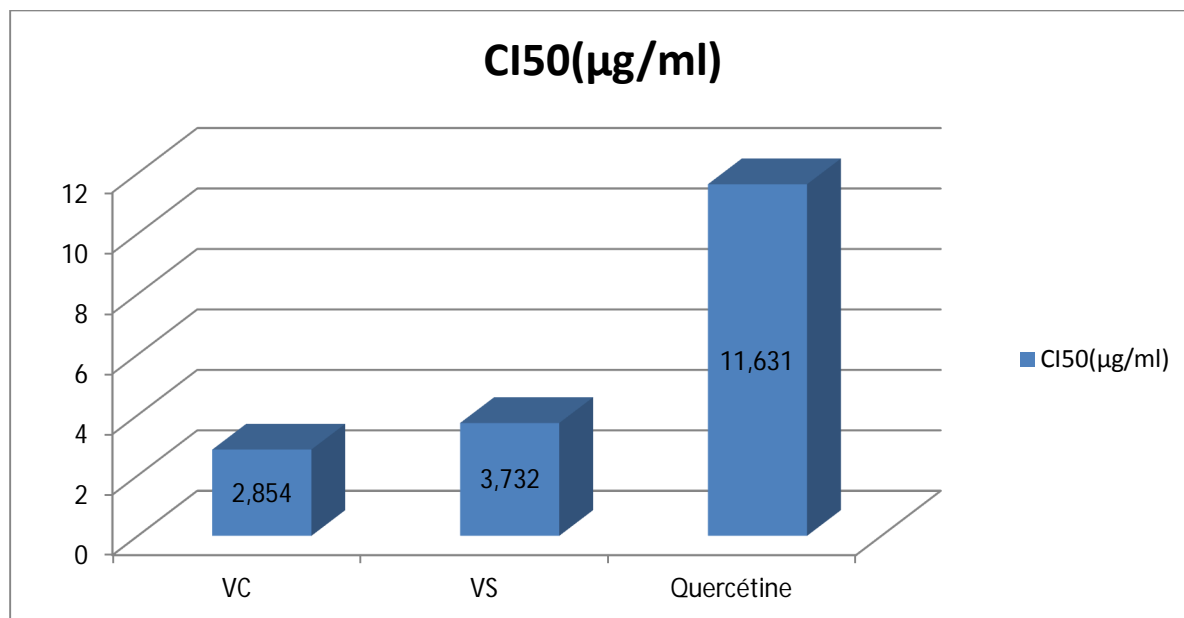


Figure 16 : Concentrations responsables à 50% d'inhibition du radical DPPH• (CI50).

Les résultats obtenus (figure 16) montrent que les deux variétés présentent des CI50 de l'ordre de $2,854 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ et $3,732 \pm 0,095 \mu\text{g/ml}$ pour les variétés VC et VS et celle de l'antioxydant naturel (la Quercétine) ($\text{CI50} = 12,513 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$).

Il apparaît ainsi que les deux variétés présentent l'activité antioxydante la plus élevée, six fois supérieure à celle de la Quercétine pour l'extrait de la VC et pour l'extrait de la VS cette activité est supérieure quatre fois à celle de la Quercétine. Ces résultats permettent de classer les extraits par rapport au standard selon leur pouvoir antioxydant par ordre décroissant ($\text{VC} > \text{VS} > \text{Quercétine}$).

Ces variations dans la capacité antioxydante des extraits polyphénoliques de ces deux variétés d'olive pourraient être dues à la présence de certains composés potentiellement actifs (les polyphénols) tel que l'oleuropéine dont la CI50 est très appréciable de l'ordre de $7,59 \pm 1,29$ $\mu\text{g/ml}$ deux fois plus active qu'au BHT. Le tyrosol un autre polyphénol d'olive (produit de l'hydrolyse de l'oleuropéine) semble faiblement actif avec CI50 très élevée de l'ordre de $1201,8 \pm 64,31$ $\mu\text{g/ml}$ (Bisset, 2011; Manallah A., 2012).

Pérez-Bonilla *et al* (2006) montré dans leur travaille que les trois polyphénols prépondérants dans l'olive sont :l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine, et le tyrosol, possèdent une activité antioxydante vis-à-vis du DPPH• de l'ordre de 76,7 %, 20,4 %, et 3,7 %, respectivement.

En 2006 Boskou et ses collaborateurs ont conclu que des variétés d'olives de tables de Grèce présentent des CI50 de l'ordre de 30 - 587 $\mu\text{g/ml}$ alors des capacités anti-radicalaire moindres que celles des variétés d'olive de l'Algérie avant saumurage, cette différence est due principalement à la perte importante et à la dégradation de certains polyphénols notamment le tyrosol et l'hydroxytyrosol lors de la fermentation des olives.

Une perte importante en composés phénoliques sous l'influence de la fermentation avec un taux de réduction de 32-58 % entraînant une diminution de l'activité antioxydante de 50-72 %, due essentiellement à la diffusion de ces composés dans la saumure particulièrement l'hydroxytyrosol (produit issu de l'hydrolyse du principe amer l'oleuropeine). De ce fait, il devient plus que nécessaire d'utiliser un processus contrôlé pour minimiser la perte en composés phénoliques pour préserver la qualité et l'effet antioxydant des olives de table, (Ben Othman *et al.*, 2009).

Test d'activité antimicrobienne

1.4.1. Résultats du test préliminaire

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation, ou l'isomérisation de ces composés (Yrjöen, 2004).

Pour cela le DMSO a été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes.

Les résultats obtenus de l'activité biologique (diamètre d'inhibition (mm)) sont regroupés dans le Tableau. Les valeurs 1, 1/2, 1/4 et 1/8 correspondent aux différentes dilutions de la concentration initiale du résidu sec de l'extrait dans le DMSO qui est de 250 mg/ml.

Tableau 3 : Variation de l'activité antibactérienne des deux variétés VS et VC en fonction de différentes concentrations

Souche bactérienne		<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>
		Diamètre d'inhibition			
Concentration VS µg/ml	250	17.32	13.93	17.10	14.57
	125	15.63	12.87	13.13	14.09
	62.5	14.60	12.36	12.68	13.11
	31.25	11.94	11.72	10.87	12.34
Concentration VV µg/ml	250	16.43	13.86	15.28	15.94
	125	14.79	12.76	12.19	12.86
	62.5	12.92	9.76	10.69	11.93
	31.25	9.51	–	10.25	11.17

Les effets inhibiteurs de la croissance des germes sont manifestés par deux extraits VS et VC à partir d'une concentration mère de 250 µg/ml, sur 4 bactéries *E.coli*, *Salmonella sp*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosas*. Les diamètres d'inhibition sont en fonction de la dose déposée sur le disque.

E. coli est la souche la plus sensible aux effets des deux extraits, pour une concentration de 250 µg/ml le diamètre d'inhibition atteindre à 17.32 mm et 16.43mm pour les extraits VS et VC respectivement, suivie de *Bacillus subtilis* avec des diamètres de 17.10mm et 15.28mm puis *Pseudomonas aeruginosas* avec un diamètre de 14.57mm et 15.94 mm, et dernièrement la *Salmonella sp* avec un diamètre de 13.93 mm et 13.86mm.

L'activité antibactérienne des substances actives d'origine végétale dépend surtout de la nature des bactéries Gram+ ou Gram- et aussi de la méthode d'extraction réalisée (Basli A., 2012)

Cowan (1999) explique que la toxicité des extraits envers les microorganismes est due aux différentes classes de poly phénols essentiellement les tanins et les flavonoïdes. Cette toxicité est en fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles présents sur le composé phénolique. En outre, il est évident que l'augmentation de l'hydroxylation conduit à une augmentation de la toxicité. L'effet antimicrobien de ces phénols peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne suite à leur adsorption sur les membranes cellulaires, l'interaction avec les enzymes et les effecteurs ou la privation en substrats et ions métalliques (Dhaouadi et al., 2010).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (Essawi et Srour, 2000).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la

séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Jungkind, 1995 ; Harrar A.2012).

Il a été rapporté que l'activité antimicrobienne chez d'autres plantes est dû à la présence d'anthraquinones (Comini et al., 2011; Doughari et al., 2012).

Par ailleurs, la paroi des bactéries Gram+ est riche en protéines tandis que chez les souches Gram-, elle est surtout assemblée en lipopolysaccharides (LPS), la membrane extérieure de ces dernières constitue une barrière de perméabilité efficace. Le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes, et les protéines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevé. Alors que les bactéries Gram+ sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à plus de 50 000 D (Hogan D, Kolter R., 2002)



Conclusion

Conclusion et perspectives

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des caractères pomologiques, le contenu ou la teneur en polyphénols, et en flavonoïdes, ainsi que l'estimation *in vitro* des activités antioxydante et antimicrobienne des polyphénols extraites de pulpe d'olive.

Les caractéristiques pomologiques des fruits d'olive montrent des différences entre les deux variétés étudiées de point de vue morphologique, pondéral, ainsi qu'en taux d'humidité et en rendement d'huile, ces différences sont la conséquence du patrimoine génétique. Généralement, les deux variétés VS et VC ont des fruits relativement possèdent des poids moyens entre 4 et 5g, et un taux d'huile élevé.

La caractérisation quantitative des extraits phénoliques d'olive montre que le contenu des olives est riche par les polyphénols et les flavonoïdes, on a trouvé que les variétés Sigoise et Chemlal sont caractérisées par des teneurs élevés en polyphénols et flavonoïdes.

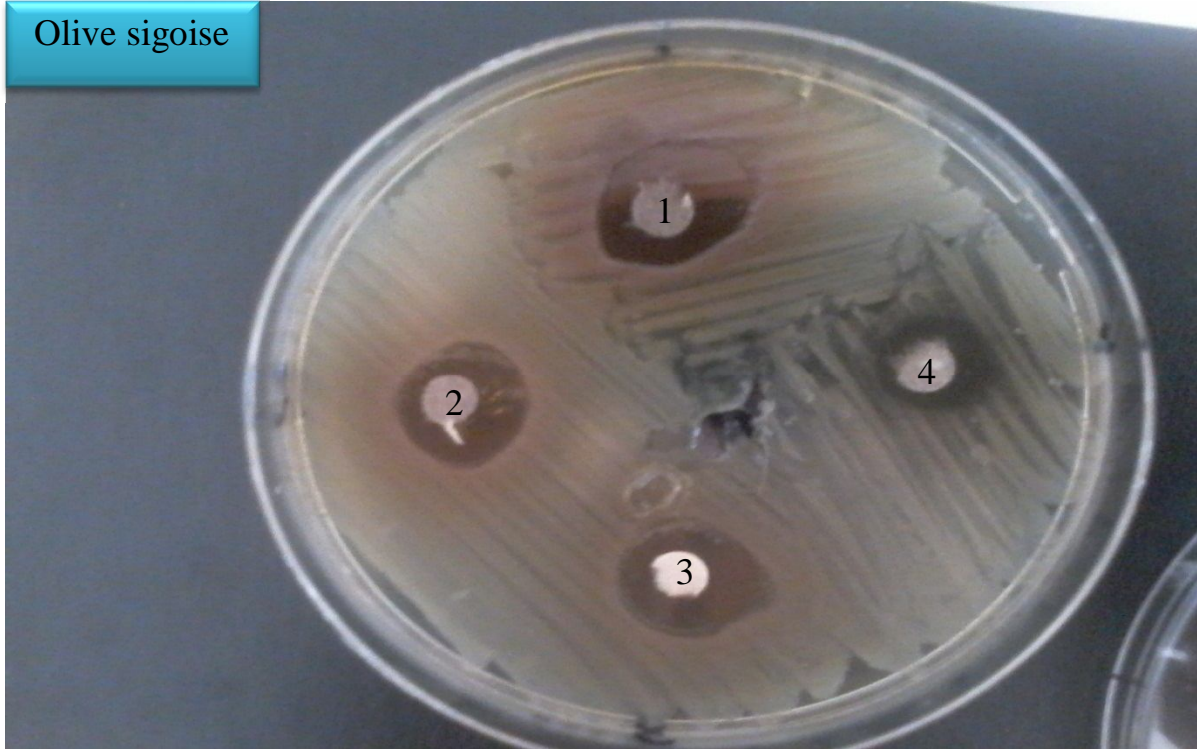
Ces résultats indiquent que le fruit d'olive apparait comme un réservoir d'antioxydants susceptibles d'être utilisés dans la lutte contre les radicaux libres. Une caractérisation qualitative des deux extraits polyphénoliques d'olive par une chromatographie sur couche mince (CCM) a révélé la présence de nombreux constituants, parmi lesquels la vanilline et l'acide gallique.

L'activité antioxydante de ces extraits a été évaluée *in vitro* par le test du DPPH•, qui affirme que ces polyphénols ont une grande capacité de piéger le radical DPPH• avec des concentrations inhibitrices responsables de 50% de l'activité antiradicalaire (CI50) de 2,854 et 3,732 µg/ml pour l'extrait de la VC et l'extrait de la VS respectivement, la comparaison des IC50 nous a permis de conclure que les deux extraits présentent une meilleure activité antiradicalaire que l'antioxydant utilisé comme standard, la quercétine.

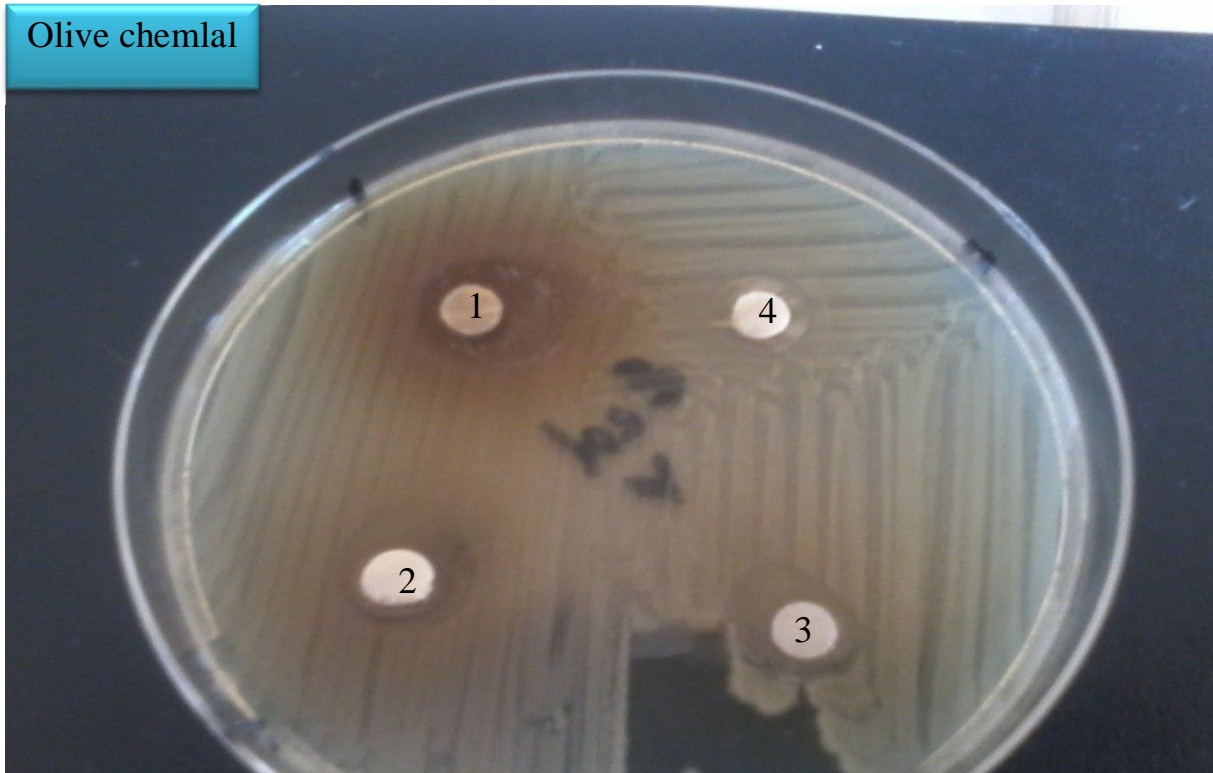
En ce qui concerne l'activité antibactérienne, les deux extraits d'olives semblent avoir une activité anti-*Salmonella sp*, anti-*Bacillus subtilis*, anti- *Escherichia coli* et anti- *Pseudomonas*.

Les résultats obtenus dans ce travail ne constituent qu'une première étape dans la valorisation d'olive algérienne, des essais complémentaires seront nécessaires.

Olive sigoise



Olive chemlal



Concentration des extraits :

1 :250 $\mu\text{g/ml}$, 2 :125 $\mu\text{g/ml}$, 3 :62.5 $\mu\text{g/ml}$, 4 :31.25 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 2. Les zones d'inhibition de la croissance obtenues vis-à-vis des *Echerichia coli*

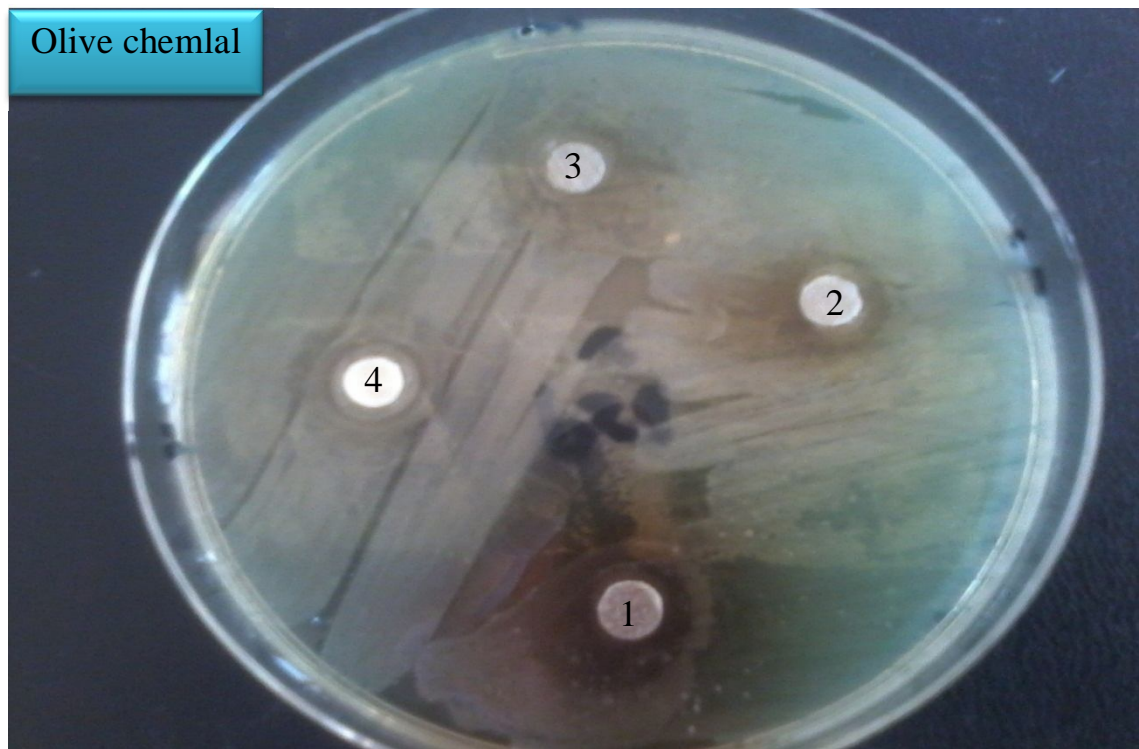
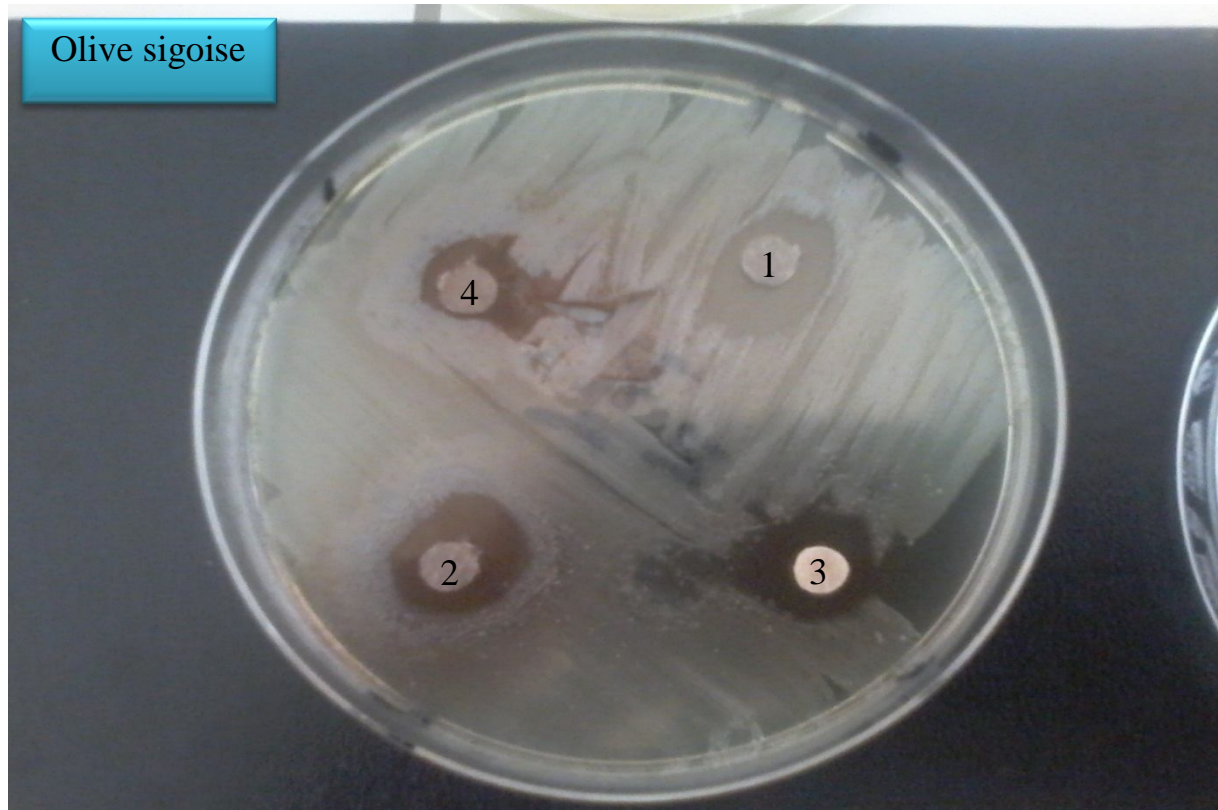


Fig. 2. Les zones d'inhibition de la croissance obtenues vis-à-vis des *Pseudomonas aeroruginosas*

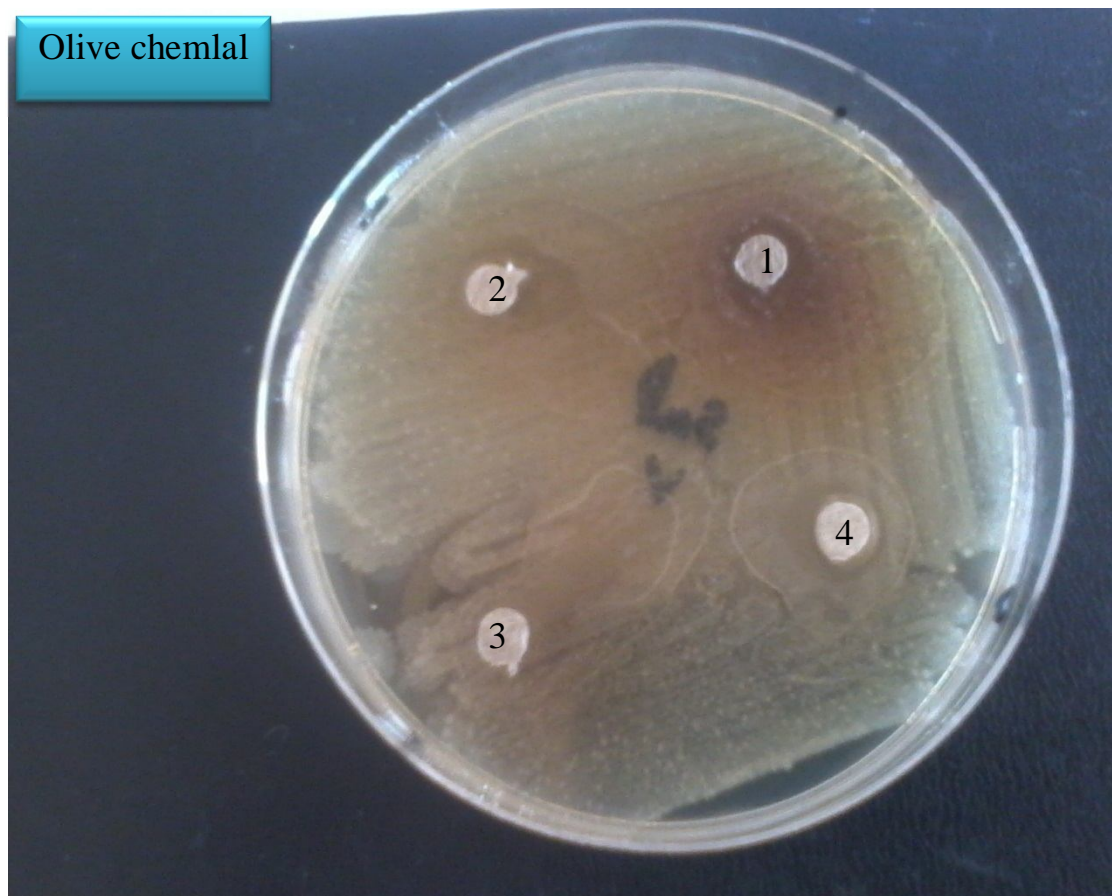
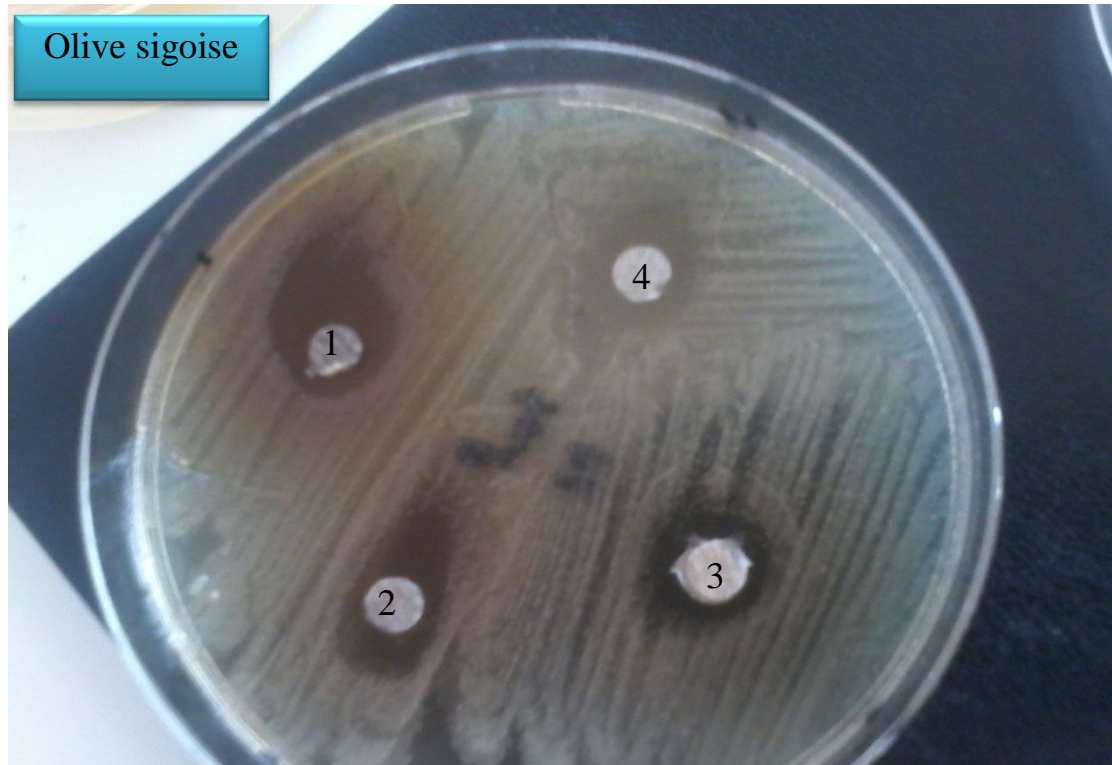


Fig. 2. Les zones d'inhibition de la croissance obtenues vis-à-vis des *Salmonella* sp

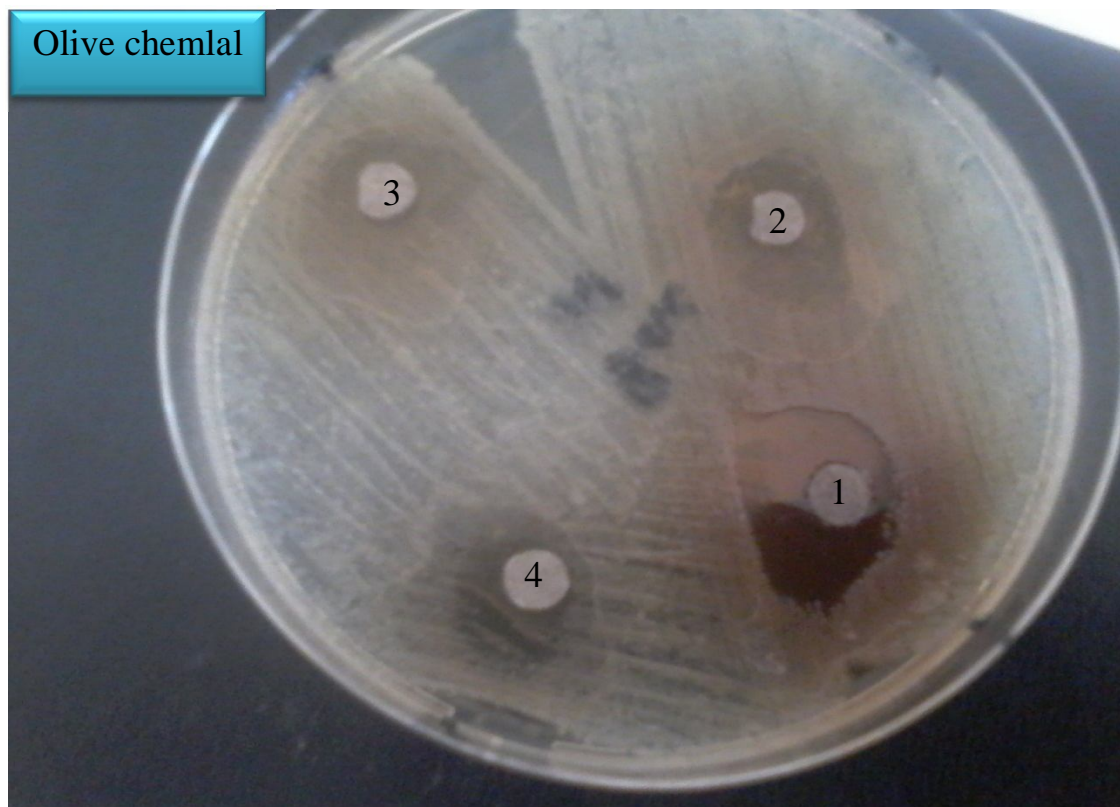
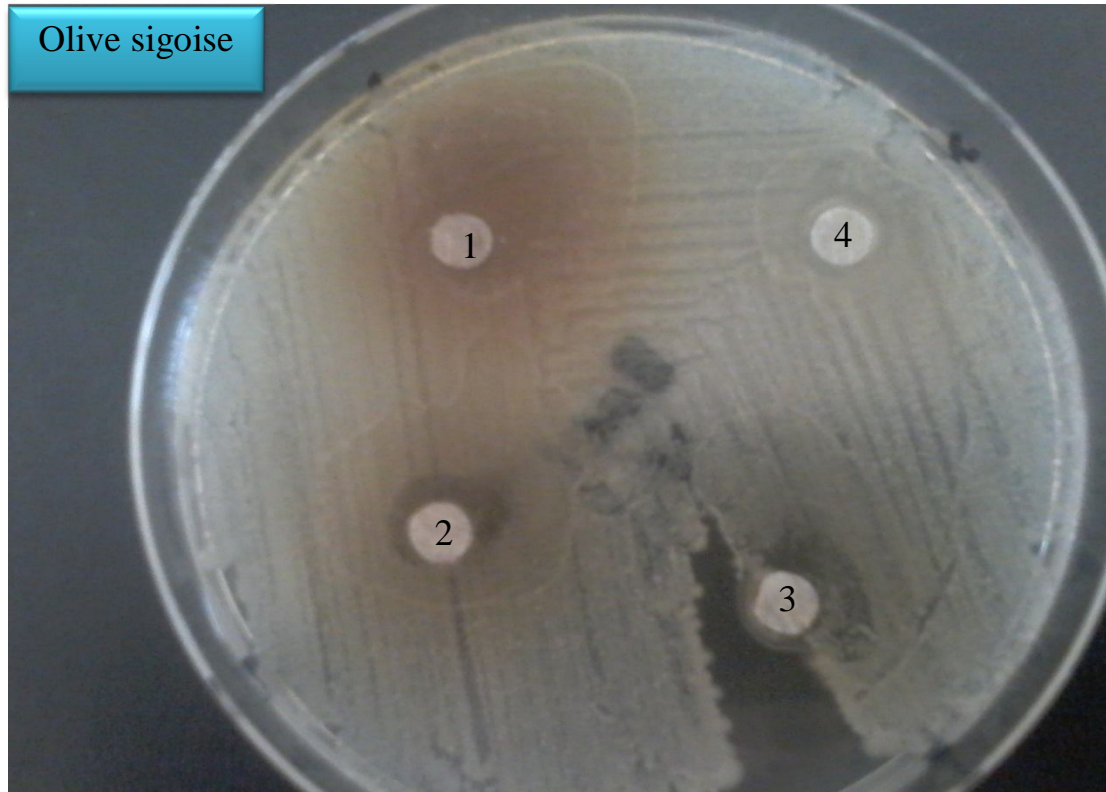


Fig. 2. Les zones d'inhibition de la croissance obtenues vis-à-vis des *Bacillus subtilis*

Annexe 01

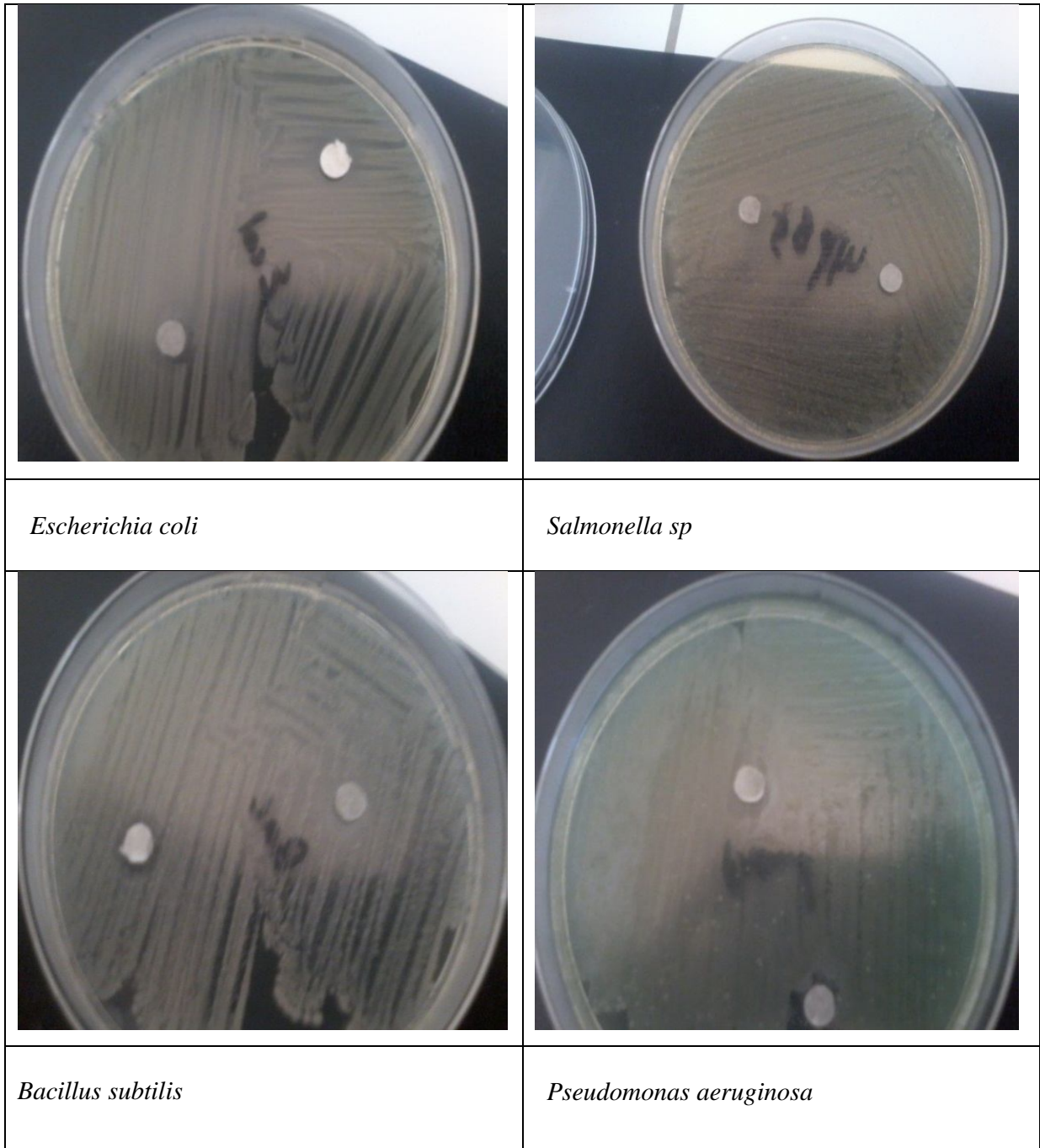


Figure 17: test préliminaire de DMSO