

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas - Sétif

Faculté des sciences
de la nature et de la vie



جامعة فرحات عباس - سطيف

كلية علوم الطبيعة و الحياة

N°...../SNV/2012
Département de Biochimie

MEMOIRE

Présenté par : **MANALLAH Ahlem**

Pour obtenir le Diplôme de **Magister**

Option : Biochimie Appliquée

THEME :

Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L.

Soutenu publiquement le.../.../2012

Devant le jury

Président : Pr. BOURICHE Hemama.

Pr. Université de Sétif

Rapporteur : Pr. BELATTAR Nouredine.

Pr. Université de Sétif

Examineur : Pr. BOUZIDI Abdelwahabe.

Pr. Université de Sétif

Pr .AMIRA Smaïn.

Pr. Université de Sétif

Année universitaire 2011-2012

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.

Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur, **Dr. BELATTAR Noureddine**, Professeur à l'université de Sétif 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. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

Je voudrais remercier **Dr. BOURICHE Hemama**, je ne saurais jamais la remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien sans faille et sa sympathie. A cette même occasion je tiens à remercier **Dr. BOUZIDI Abdelwahabe**, **Dr. AMIRA Smaïn**, Professeurs à l'université de Sétif, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à tous mes professeurs de graduation et de post-graduation de l'université de Sétif, un grand merci pour vous mon professeur **Dr. AGGOUN Djamel** que dieu vous bénisse et donne la santé.

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

Merci

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 mes professeurs ♥

♥ A mes amis ♥

♥ A mes élèves ♥

♥ A vous ♥...

Ahlem

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation des activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols obtenus à partir des extraits de pulpe d'olive (*Olea europaea* L.) de deux variétés cultivées à Sétif .

La caractérisation pomologique des deux variétés étudiées a montré une différence inter-variétale en terme de poids, largeur, longueur, taux d'humidité et de la teneur en huile et son contenu en polyphénols.

L'analyse quantitative des extraits a révélée une richesse des olives par les polyphénols et les flavonoïdes mais le contenu en flavonoïdes est faible par rapport a celui des polyphénols pour les deux variétés étudiées.

L'analyse qualitative des deux extraits polyphénoliques par CCM a révélé la présence de nombreux constituants, parmi lesquels l'oleuropéine, le tyrosol, la catéchine, la rutine ,la quercitine, la vanilline et l'acide gallique.

Le pouvoir antioxydant de ces extraits a été évalué *in vitro* par les tests du DPPH^{*}, du blanchissement de β -carotène et du pouvoir réducteur. Des résultats obtenus, il ressort que ces polyphénols ont une grande capacité de piéger le radical DPPH^{*} avec des CI₅₀ de 2,585 et 4,625 μ g/ml pour l'extrait de la variété Bouchouk et l'extrait de la variété Khanfes respectivement. Cette capacité antioxydante est confirmée par les tests du blanchissement de β -carotène et du pouvoir réducteur. En effet, ces polyphénols sont aussi capables d'inhiber la peroxydation lipidique avec des pourcentages appréciables de l'ordre de 97,27% et 94,45 % et elles possèdent un très grand pouvoir réducteur avec des CE₅₀ de 5,055 et 6,110 μ g/ml pour les extraits des variétés Bouchouk et Khanfes respectivement.

L'activité anticoagulante des extraits de polyphénols d'olive a été également évaluée *in vitro* en utilisant les tests du temps de Quick (TQ) et du temps de céphaline-kaolin(TCK). Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence des ces polyphénols indiquent qu'ils exercent une grande activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation mais cette activité est plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène.

Mots clés: *Olea europaea* L, polyphénols, espèces réactives ,thrombose, activité antioxydante ,activité anticoagulante.

Abstract

The objective of this study is the evaluation of antioxidant and anticoagulant activities of polyphenols obtained from extracts of olive pulp (*Olea europaea* L.) of two varieties cultivated in Setif.

The Pomological characterization for the two varieties studied showed a difference between them in terms of weight, width, length, humidity and oil content and its polyphenol content.

Quantitative analysis of extracts revealed a wealth of olives by polyphenols and flavonoids, but the content in flavonoids is low compared to that of polyphenols for both studied varieties.

Qualitative analysis of two polyphenolic extracts by TLC revealed the presence of numerous constituents, including oleuropein, tyrosol, catechin, rutin, quercetin, vanillin and gallic acid.

The antioxidant capacity of this polyphenolic extract was evaluated *in vitro* by three different tests: DPPH[•] free radical scavenging assay, β -carotene bleaching test and reducing power assay. The extract demonstrated a great capacity to scavenge the DPPH[•] radical with an IC₅₀ equal to 2.585 and 4.625 μ g/ml for the variety Bouchouk extract and for the variety Knanfes extract, respectively. This antioxidant capacity is confirmed by the β -carotene bleaching assay and the reducing power test. Indeed, these extracts are also able to inhibit lipid peroxidation with respectable percentages of about 97.27 % for the extract of Bouchouk variety and 94.45% for the extract of Khanfes variety and they have a great reducing power with an EC₅₀ of 5.055 and 6.110 μ g/ml respectively.

The anticoagulant activity of olive polyphenols was also evaluated *in vitro* by using two tests: the test of the cephalin-kaolin time and the test of Quick time. The times of coagulation obtained on normal plasma in the presence of these polyphenols indicate that they carry an anticoagulant activity on the two pathways of coagulation but this activity is highly marked on the endogenous pathway than on the exogenous pathway.

Key words: *Olea europaea* L, polyphenols, reactive species, thrombosis, antioxidant activity, anticoagulant activity.

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاطات المضادة للأكسدة و تخثر الدم لعديدات الفينول المستخلصة من لب الزيتون (*Olea europaea* L.) لصنفين مزروعين بسطيف. أظهرت الدراسة الوصفية أن هناك فرق بين الصنفين المدروسين من حيث الوزن، الطول، العرض، نسبة الرطوبة، محتوى الزيت ونسبة عديدة الفينول في هذا الأخير. التحليل الكمي للمستخلصات كشف عن ثراء الزيتون بعديدات الفينول والفلافونويد، ولكن يعتبر المحتوى في الفلافونويد منخفضا مقارنة بالمحتوى من البوليفينول لكل من الصنفين المدروسين. التحليل النوعي لمستخلصي البوليفينول بكمياتوغرافيا الطبقات الرقيقة أظهر وجود العديد من المركبات منها: oleuropéine، tyrosol، catéchine، rutine، quercitine و acide gallique و vanilline.

النشاطية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات تم تقديرها في الزجاج باستعمال إختبارات DPPH^{*}، إبيضاض البيتا-كاروتان، و القدرة الإرجاعية. من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح بأن هذه المستخلصات تملك قدرة عالية على إلتقاط الجذر الحر DPPH^{*} و ب IC₅₀ تعادل 2,585 و 4,625 ميكروغرام/مل بالنسبة لمستخلص الزيتون من الصنف بوشوك و مستخلص الصنف خنفاس على التوالي. هذه النشاطية المضادة للأكسدة تم تأكيدها بإختبار إبيضاض البيتا-كاروتان و القدرة الإرجاعية، إذ أن هذه المستخلصات قادرة أيضا على تثبيط الأكسدة الليبيدية و بنسب معتبرة تعادل 97,27% بالنسبة لمستخلص الزيتون من الصنف بوشوك و 94,45% بالنسبة لمستخلص الصنف خنفاس، و من جهة أخرى هذه المستخلصات تملك قدرة إرجاعية عالية تظهر من خلال EC₅₀ تعادل 5,055 و 6,110 ميكروغرام/مل على التوالي.

النشاطية المضادة للتخثر لمستخلصات عديدة الفينول للزيتون تم تقديرها أيضا في الزجاج باستعمال إختبارين: إختبار زمن كويك (TQ) و إختبار زمن Céphaline-kaolin (TCK). ازمنة التخثر المتحصل عليها في بلازما عادية بوجود هذه المستخلصات تظهر بأن مواد الأيض هذه تمارس نشاطية مضادة للتخثر على كلا مسريي التخثر الدموي وبأن هذه النشاطية تكون أكثر فاعلية على المسرى الداخلي مقارنة مع المسرى الخارجي.

الكلمات المفتاح: *Olea europaea* L.، عديدة الفينول، الأنواع النشطة، مرض تجلط

الدم، النشاطية المضادة للتأكسد، النشاطية المضادة للتخثر.

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
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'hydrogene

H₂OD : Eau distillée

HBMP :Héparines de bas poids moléculaire

HDL :High density lipoprotein ou lipoprotéine de haute densité

HDL-C:High density lipoprotein cholesterol

HNF :Héparine non fractionnée

HPE : Hydroxyphényléthanol

HPLC : High performance liquid chromatography

HT : Hydroxytyrosol

IL-1 β : Interleukine-1 beta

IPL : Inhibition de la peroxydation lipidique

LDL : Low density lipoprotein ou lipoprotéine de basse densité

LDL-C : Low density lipoprotein cholesterol

LOX : Lipooxygénase

LTB₄ : Leukotriene B₄

MCV : Maladies cardio-vasculaires

MD : Mediterranean diet

MeOH :Méthanol

mg :milligrame

min :minute

ml :millilitre

MTEV :Maladie thromboembolique veineuse

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B

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
s	: Seconde
SOD	: Superoxyde dismutase
t	: Temps
TC	:Total cholesterol
TCA	:Tichloro-acetic acide
TCA	:Temps de céphaline activée
TCK	: Temps de céphaline kaolin
TG	:Triglyceride
TP	:Taux de prothrombine
TQ	:Temps de Quick
TXB2	:Thromboxane B2
v/v	:Rapport volume par volume
VB	: Variété d'olive nommée BOUCHOUK
VK	: Variété d'olive nommée KHANFES
%	: Pourcentage

Listes des figures

Figure 1: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	6
Figure 2: Balance radicaux libres /antioxydants.....	6
Figure 3: Structures der la vitamine E ou alpha –tocophérol et des caroténoïdes.....	9
Figure 4: Structure de la paroi artérielle.....	10
Figure 5: Plaque d'athérome ou athéromateuse.....	13
Figure 6: Formation d'une plaque d'athérosclérose.....	14
Figure7: Rôles des plaquettes dans les thromboses artérielles.....	15
Figure 8: (a)Formation initiale d'une phlébite au niveau d'une valvule des veines de jambe. (b)L'embolie pulmonaire et la phlébite profonde.....	16
Figure 9: Schéma simplifié de la cascade de coagulation.....	18
Figure 10: Pyramide alimentaire de la diète méditerranéenne.....	19
Figure 11: Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe.....	23
Figure 12: Structures chimiques de principaux polypénols.....	23
Figure 13: Effets des polyphénols dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium Vasculaire.....	25
Figure 14: Effets biologiques des polyphénols.....	26
Figure 15: Structure de base des flavonoïdes.....	27
Figure 16: Structures chimiques de quelques flavonoïdes.....	27
Figure 17: Aspect morphologique de la plante <i>Olea europaea</i> L.et leurs parties.....	33
Figure 18: Section transversale et compositions physique et chimique de l'olive.....	33
Figure 19: Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin Méditerranéen.....	34
Figure 20: Structures chimiques des trois principaux composés phénoliques d'olive.....	36
Figure 21: Effet préventif de l'oleuropéine contre l'ostéoporose.....	39
Figure 22: Modèle proposé pour les mécanismes d'action de l'acide oléique et des composés mineurs de l'huile d'olive.....	39
Figure 23: Fruits et feuilles des variétés d'olive BOUCHOUK _(a) et KHANFES _(b)	41
Figure 24 : Représentation schématique des étapes réalisées dans cette étude.....	43
Figure 25 : Schéma de caractérisation des fruits d'olive des différentes variétés VB,VK.	43
Figure 26 : Extraction des huiles de pulpe d'olive par Soxhlet et Evaporation sous vide..	45

Figure 27: Schéma qui représente la procédure suivie pour la préparation de l'échantillon d'olive destiné à l'extraction.....	46
Figure 28 : Schéma qui représente la procédure suivie pour l'extraction des polyphénols d'olive.....	47
Figure29 : Instrument pour la production manuel des plaque de silice de CCM.....	50
Figure30 : Principe du test de DPPH.....	51
Figure 31: Taux d'humidité et de matière sèche des variété d'olive VB et VK.....	57
Figure 32 : Huile de pulpe d'olive VB, VK.....	58
Figure 33 : Teneur en matière grasse MG% des olives.....	58
Figure 34 : Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique.....	61
Figure 35 : Droite d'étalonnage de la Rutine.....	61
Figure 36 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits d'olive.....	62
Figure 37 : Profiles Chromatographiques des extraits de polyphénols des olives.....	64
Figure 38 : Activité anti-radicalaire en pourcentage (AAR%) des extraits de polyphénols des variétés d'olive VB et VK, et des standards BHT et Rutine.....	68
Figure 39 : Concentrations responsables à 50%d' inhibition du radical DPPH [*] (CI ₅₀).....	69
Figure 40 : Cinétique de blanchissement du bêta carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de pulpe d'olive VB et VK, du BHT et de la rutine en fonction du temps.....	72
Figure 41 : Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique (%IPL) par les extraits d'olive VB et VK, les standards BHT et Rutine.....	73
Figure 42 : Pouvoir réducteur des extraits de pulpe des variétés d'olive VB,VK, du BHT et de la rutine.....	75
Figure 43 : Concentrations effectrices (CE ₅₀) responsables du pouvoir réducteur des d'olive VB et VK, les standards BHT et Rutine.....	76
Figure 44 : Effet du temps d'incubation des extraits avec le plasma sur le TQ.....	78
Figure 45: Effet du volumes des extraits polyphénolique avec le plasma sur le TQ.....	80
Figure 46: Temps de Quick (TQ) en fonction des concentrations des extraits de polyphénols de variétés d'olive VB et VK.....	81
Figure 47 : Temps de céphaline kaolin (TCK) des extraits VB ,VK et des standards Oleuropéine, Tyrosol et l'Héparine.....	83
Figure 48 : Temps de céphaline kaolin (TCK) en fonction des concentrations des extraits d'olive des variétés VB et VK.....	84

Listes des tableaux

Tableau 1: Principaux radicaux libres et comparaison de leur structure chimique.....	4
Tableau 2: Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées..	10
Tableau 3: Caractérisation des olives des variétés VB et VK d'origine de Sétif.....	56
Tableau 4: Rapports frontaux (Rf) des spots des extraits et des témoins dans le système (CHCl ₃ / CH ₃ -COO-CH ₂ -CH ₃ / H-COOH : 50/40/10, v/v/v).....	65

SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'oxydation dans le corps humain : Aspects physiologique et physiopathologique

I-1. Aspect physiologique.....	3
I-2. Aspect physiopathologique.....	3
I-2-1. Radicaux libres et stress oxydant.....	3
I-2-1-1. Radicaux libres.....	4
I-2-1-2. Stress oxydatif.....	5
I-2-1-3. Conséquences du stress oxydant.....	6
I-2-1-4. Implications pathologiques du stress oxydatif.....	7
I-3. Antioxydants.....	8
I-3-1. Antioxydants endogènes.....	8
I-3-2. Antioxydants naturels.....	10

II. Les thromboses

II-1. Thromboses artérielles.....	11
II-1-1. Mécanisme physiologiques.....	12
II-2. Thromboses veineuses.....	15
II-2-1. Mécanisme physiologiques.....	16
II-3. Prévention des thromboses.....	18
II-3-1. Rôle de l'alimentation et de l'activité physique.....	19
II-4. Traitement des thromboses.....	19
II-4-1. Antiagrégants plaquettaires.....	19
II-4-2. Anticoagulants.....	20
II-4-3. Traitement fibrinolytiques.....	20

III. Les polyphénols

III-1. Les polyphénols.....	22
III-1-1. Structures chimiques et classification.....	22
III-1-2. Biosynthèse.....	24
III-1-3. Effets biologiques des polyphénols.....	25
III-2. Les flavonoïdes.....	26
III-2-1. Structures chimiques et classification.....	27
III-2-2. Biosynthèse.....	28
III-2-3. Effets biologiques des flavonoïdes.....	28
III-2-3-1. Effets antioxydant et pro-oxydant.....	29
III-2-3-2. Effets cardiovasculaires.....	29
III-2-3-3. Autres effets biologiques.....	30

IV. L'olivier « *Olea europaea* L. »

IV -1. Description botanique.....	32
IV-2. Systématique.....	34
IV-3. Distribution géographique.....	34
IV-4. Composition chimique.....	35
IV -4- 1. Les acides gras.....	35
IV-4- 2. Les composés phénoliques.....	35
IV-4- 3. Les tocophérols.....	37
IV -4- 4. Les alcools triterpéniques.....	37
IV -4- 5. Les acides triterpéniques.....	37
IV -4- 6. Le squalène et les stérols.....	37
IV -4- 7. Les caroténoïdes.....	38
IV -5. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques.....	38
IV-6. Mécanismes d'action.....	40

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériel.....	41
I-1-1. Matériel végétal.....	41
I-1-2. Produits et réactifs chimiques.....	41
I-2. Méthodes.....	41
I-2-1 .Caractérisation pomologique des olives	42
I-2-1-1 .Taux d'humidité ou teneur en eau.....	42
I-2-1-2. Teneur (Rendement) en huile de pulpe d'olive.....	44
I-2-1-3 .Teneur en polyphénols (PP) d'huile de pulpe d'olive.....	44
I-2-2. Extraction des polyphénols de pulpe d'olive.....	45
I-2-3. Caractérisations quantitative et qualitative	45
I-2-3-1.Caractérisation quantitative des extraits de pulpes d'olive.....	48
I-2-3-1-1.Dosage des polyphénols totaux par colorimétrie.....	48
I-2-3-2-2.Dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de $AlCl_3$	48
I-2-3-2. Caractérisation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits de pulpe d'olive.....	49
I-2-4. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante.....	50
I-2-4-1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	51
I-2-4-2. Le test de blanchissement ou de décoloration du bêta-carotène.....	51
I-2-4-3. Le test du pouvoir réducteur ou (potentiel réducteur)	52
I-2-5. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité anticoagulante	52
I-2-5-1. Temps de Quick(TQ)ou taux de prothrombine (TP)	53
I-2-5-2. Temps de céphaline caolin (TCK)	54
I-2-6. Analyse statistique.....	55

II. Résultats et discussion

II-1. Caractérisation pomologique des olives	56
II-1-1. Caractérisation physique des variétés d'olive.....	56
II-1-2. Taux d'humidité.....	56
II-1-3. Teneur en huile.....	57
II-1-4. Teneur en polyphénols dans l'huile.....	58
II-2. Caractérisation quantitative et qualitatives des extraits d'olive.....	59
II-2-1. Teneurs des olives en polyphénols et en flavonoïdes.....	60
II-2-2. Caractérisation qualitative des extraits.....	64
II-3. Activité antioxydante.....	67
II-3-1. Effet de piégeage du radical le DPPH	67
II-3-2. Test de blanchissement du β-carotène	71
II-3-3. Test du potentiel réducteur.....	74
II-4. Activité anticoagulante.....	77
II-4-1. Test de temps de Quick (TQ).....	77
II-4-2. Test de céphaline Kaolin (TCK).....	82
 Conclusion et perspectives.....	 86

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Durant ces dernières années une recrudescence d'intérêt est à remarquer concernant les effets biologiques des antioxydants naturels inclus dans la lutte contre le stress oxydatif impliqué dans le vieillissement et dans le déclenchement et la progression de plusieurs maladies telles que le cancer, l'athérosclérose, les accidents cardiovasculaires (AVC), l'ostéoporose, les maladies inflammatoires, et les maladies neurodégénératives...etc. De nombreuses recherches scientifiques faites sur les composés bioactifs notamment sur les polyphénols qui agissent contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (molécules pro-oxydantes très réactifs causent des endommagements cellulaires graves), ces métabolites sont très utilisés dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

La mortalité cardiovasculaire la première cause de décès dans le monde (représentant 35% des causes de mortalité chez l'homme et 40% chez la femme) selon des projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de l'année 2011. Principalement, elle constitue la conséquence de l'évolution et de la complication pathologique des maladies thrombotiques artérielles ou veineuses c'est la raison pour laquelle plusieurs études sont focalisées sur la recherche des anticoagulants naturels pour traiter ces pathologies vasculaires.

Plusieurs études épidémiologiques et travaux expérimentaux ont établi que l'alimentation méditerranéenne traditionnelle est la meilleure alternative pour une meilleure santé (Keys, 1970 ; 1995), le bénéfice santé de cette alimentation est lié à sa composition principalement d'olive et d'huile d'olive, comme source d'au moins de 30 composés phénoliques, dont un bon nombre ont des propriétés antioxydantes et considérés comme des éléments clés cardioprotecteurs. Ainsi, ils permettent une baisse de la cholestérolémie et protègent contre la lipoxydation et contre d'autres facteurs de risque de maladies chroniques dégénératives (El-Boustani, *et al.*, 2004).

Par conséquent, l'incidence des maladies coronariennes, notamment des thromboses, et de certains cancers en particulier de la prostate, du sein et du côlon (Visioli *et al.*, 2005; Acquaviva, *et al.*, 2012) est plus faible dans la région méditerranéenne.

L'olivier(*Olea europae* L.,Oléacées) arbre dont la culture millénaire est traditionnelle dans le bassin méditerranéen,il est symbolique de paix et de fécondité.Son fruit ,son huile et ses feuilles fournissent de innombrables bienfaits dans la prévention de plusieurs maladies telles que l'athérombose, le cancer, l'hypertension artérielle . Ses utilisations sont nombreuses et reconnues :nourriture pour la préparation culinaires des plats délicieux, antigrippale contre la toux et le rhume, combustible pour l'éclairage, en cosmétologie et en parfumerie pour le soin de la peau,les cheveux et les dents et aussi pour la décoration (arbre ornementale , fabrication des produits artisanales) etc.

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

Le présent travail consiste à donner un intérêt à l' olive algérien et dans ce contexte s'inscrit cet 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 trois tests généraux (DPPH, le système Béta- carotène /acide linoléique et le potentiel réducteur).
- L'évaluation *in vitro* de l'activité anticoagulante de ces mêmes extraits vis-à-vis de la voie exogène et de la voie endogène de la coagulation par deux tests généraux (Temps de Quick (TQ) et temps de céphaline kaolin (TCK) respectivement).

Revue Bibliographique

I.L'oxydation dans le corps humain: physiologie et physiopathologie

I-1. Physiologie de l'oxydation

En condition physiologique, l'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR) (ou ROS, pour reactive oxygen species) et les espèces réactives de l'azote (ERN) (Halliwell, 1994). Aux doses faibles, les EOR sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la transduction du signal, l'entretien et le fonctionnement de l'organisme ainsi que dans le processus de la fécondation, de la maturation et du mouvement cellulaires (Favier, 2003). Ils jouent aussi un rôle majeur dans la production de médiateurs cellulaires, l'élimination des produits toxiques et la défense contre l'invasion des microbes et des virus, de même que contre les cellules tumorales (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Ces espèces réactives participent dans de nombreuses fonctions biologiques. À titre d'exemple le NO[•] joue un rôle dans plusieurs processus physiologiques tel que la protection cardiaque, la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission et les mécanismes de défense (Penna, *et al.*, 2009). Les espèces réactives (O₂^{-•}, H₂O₂, NO[•]) interviennent aussi dans la maturation, l'hyperactivation des spermatozoïdes et la fusion de spermatozoïde avec l'ovocyte. Les espèces réactives oxygénées et azotées participent aussi dans la différenciation cellulaire l'apoptose, l'immunité et la défense contre les micro-organismes (Roberts et Sindhu, 2009).

I-2. Physiopathologie de l'oxydation

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

I-2-1. Radicaux libres et Stress oxydatif

I-2-1. Radicaux libres

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif. L'ensemble des radicaux libres et de leurs

précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (EAO) (Favier, 2003).

Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc. (Tableau 1).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement. Leur structure comprend un électron célibataire qu'ils cherchent à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines. L'appellation " dérivés réactifs de l'oxygène " n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$) (Haton, 2005).

-l'anion superoxyde : $O_2^{\cdot-}$. La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.

-le radical hydroxyle : $OH^{\cdot}$. Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.

-le radical peroxyde : $ROO^{\cdot}$.

-l'oxygène singulet : forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité.

Tableau 1: Principaux radicaux libres et leur structure chimique (Haton., 2005).

Radicaux libres (nomenclature)	Structure chimique
Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Radical hydroperoxyde	$HOO^{\cdot}$
Radical peroxyde	$ROO^{\cdot}$
Radical alkoxyde	$RO^{\cdot}$
Peroxyde d'hydrogène*	H_2O_2
Peroxyde d'azote	$ONOO^{\cdot}$
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$

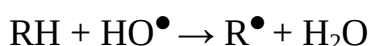
* Espèce active de l'oxygène, non radicalaire.

I-2-2.Stress oxydatif

Le stress oxydatif apparaît donc quand un déséquilibre se forme dans la balance anti/pro-oxydants. C'est seulement à ce moment que les ERO vont exercer leur action délétère sur l'organisme. Les radicaux libres sont responsables de dommages sur toutes les molécules biologiques comme les lipides, les protéines, les acides nucléiques, ou les hydrates de carbone (Favier, 2003):

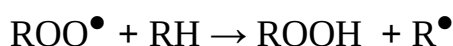
Les mécanismes d'oxydation des composés insaturés biologiques (acides gras, caroténoïdes, polyphénols...) sont souvent des réactions radicalaires avec l'oxygène moléculaire et présentent trois phases principales (Huang *et al.*, 2005).

Une phase **d'initiation** qui peut être due à l'intervention d'un radical hydroxyle HO• qui arrache un atome d'hydrogène en position

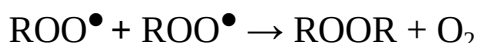


L'arrachement du proton est facilité tant par la chaleur (agitation moléculaire) que par les rayonnements ou les catalyseurs (métaux tels que Cu, Fe, Co, Mn, Ni...).

Une phase de **propagation** : en présence d'oxygène, il se forme un radical peroxyde (ROO•) qui déstabilise une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturés AGPI et conduit à un hydroperoxyde lipidique (ROOH) et à un nouveau radical, assurant ainsi la propagation du processus :



Une phase de **terminaison**, où se recombinent différents radicaux formés pour aboutir à des composés stables :



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 P450. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres (Favier, 2003).

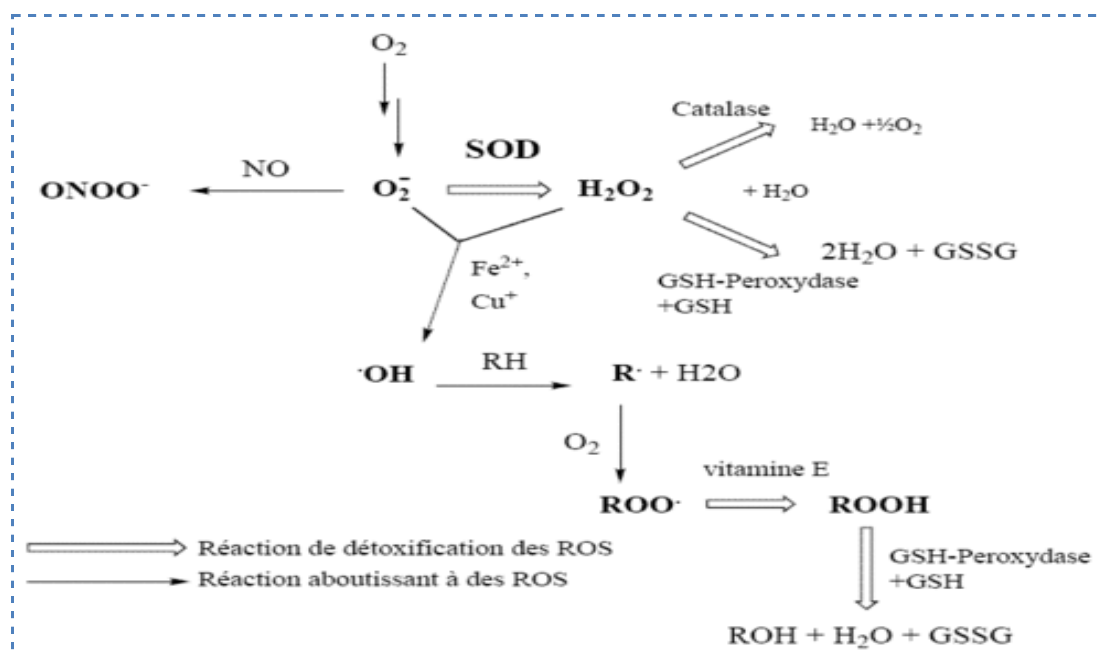


Figure 1: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003) .

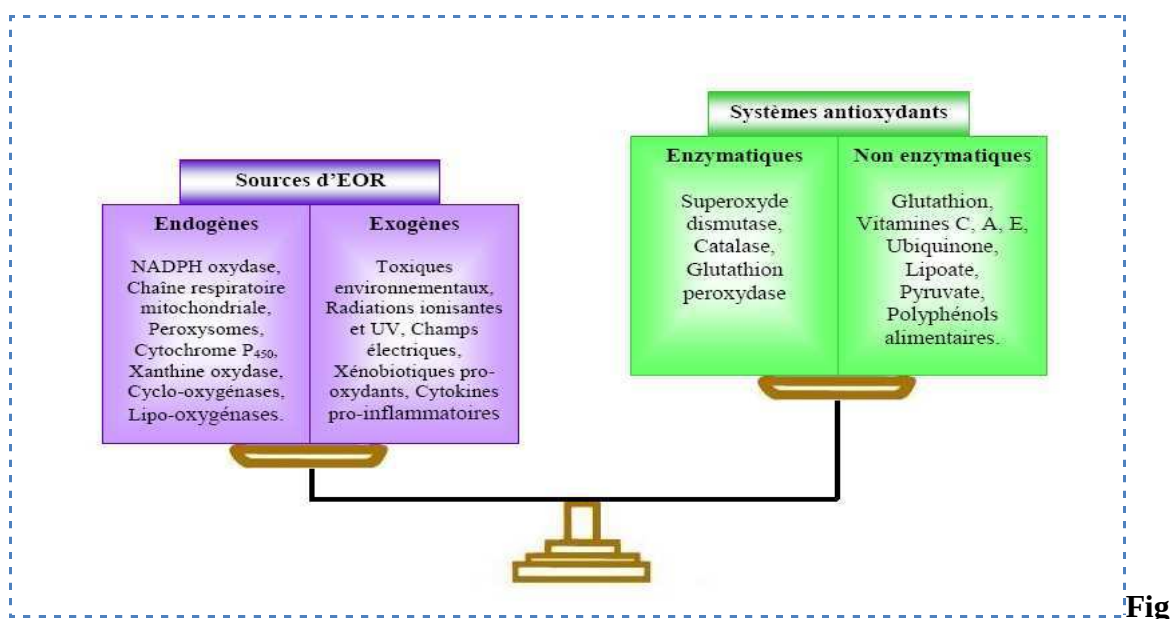


Figure 2: Balance radicaux libres /antioxydants (Shimizu H.,2004).

I-2-3.Conséquences du stress oxydant

Les radicaux libres sont responsables de dommages sur toutes les molécules biologiques comme les lipides, les protéines, les acides nucléiques, ou les hydrates de carbone (Favier, 2003):

- Au niveau de l'ADN, les radicaux libres peuvent induire des effets oxydatifs et mutagènes ou un arrêt des réplifications. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins(Shimizu H.,2004).
- Les lipides sont une cible privilégiée des radicaux libres. Ceux-ci provoquent en effet l'oxydation des acides gras poly-insaturés (AGPI) des phospholipides membranaires (principaux constituants des membranes des cellules), mais aussi des organites cellulaires et des noyaux. Ce phénomène est appelé peroxydation lipidique ou lipopéroxydation aboutissant à la formation de LDL oxydées qui sont captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Favier, 2003).
- Les radicaux libres peuvent aussi agir sur les macromolécules en provoquant des inactivations enzymatiques, des fragmentations de ces molécules(collagène, protéoglycannes, acide hyaluronique) et la formation de dimères ou d'agrégats protéïniques dans les membranes cytoplasmiques(Shimizu H.,2004).

I-2-4.Implications pathologiques du stress oxydatif

En raison de leur réactivité élevée, les espèces réactives interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré. En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète(phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine) . cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires, maladie de Parkinson,

les inflammations gastro-intestinale, ulcères, les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Roberts et Sindhu, 2009).

I.3 Antioxydants

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Shimizu H., 2004). Ils agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur. En même temps, les anti oxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Haton, 2005) .

I-3-1. Antioxydants endogènes

Les défenses antioxydantes de l'organisme peuvent se diviser en systèmes antioxydants enzymatiques (figure 2) :

- Un système de défense primaire: composé d'enzymes et de substances anti oxydantes
- la superoxyde dismutase (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$
 - La catalase : transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau
 - La glutathion peroxydase (GPx) : détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques
 - Les molécules piègeurs : le glutathion (GSH), l'acide urique, les protéines à groupement thiols, ubiquinone, ...etc.

Un système de défense secondaire : composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonuclease et ligase, des macroxyprotéinases

I-3-2. Antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposé. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc. (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur

perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres.

La vitamine E est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement et la diminution de l'athérosclérose. La vitamine E joue un rôle important dans l'agrégation de la β -amyloïde ($A\beta$), d'ailleurs, les données cliniques ont prouvé que les patients d'Alzheimer obtiennent des avantages remarquables au traitement par la vitamine E. Il a été déterminé que la vitamine E naturelle, semble être deux fois plus biodisponible que la vitamine E synthétique (Burton et Ingold, 1986).

Les Caroténoïdes sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, également dans le lait, empêchent les dommages génétiques, protègent contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêchent l'expression des oncogènes, augmentent l'activité de communication des gap jonctions. Les exemples de caroténoïdes, incluent l'alpha carotène, bêta carotène, lycopène, phytofluène, phytoène, lutéine, neoxanthine, viloxanthine, anthéroxanthine, alpha cryptoxanthine et bêta cryptoxanthine. Leur structure polyène leur permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singulet. Les caroténoïdes sont impliqués dans la prévention de nombreux types de cancer ; cancer de prostate ; cancer du poumon (Perez *et al*, 1999).

La vitamine C est largement répandue dans les fruits, L'influence sur les dégâts protéiques a été examinée dans des études d'apports de suppléments, principalement sur des modèles de rats et il y a eu quelques essais chez l'homme.

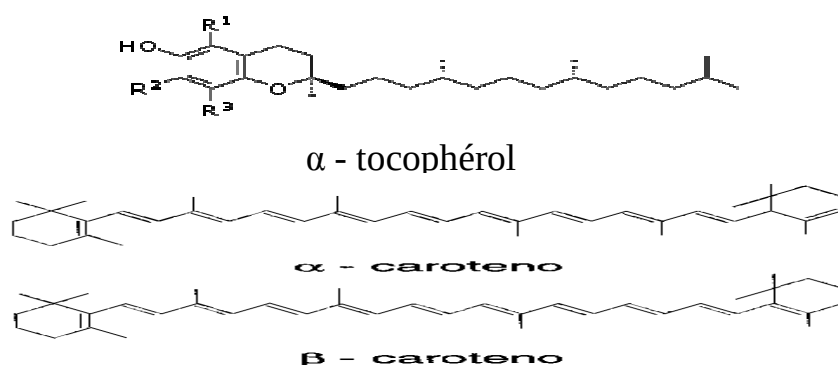


Figure3 : Structures der la vitamine E (alpha –tocophérol) et des caroténoïdes alpha et béta.

l'acide alphas-lipoïque fut identifié comme vitamine. Il a depuis été reclassé comme antioxydant et peut piéger les radicaux libres aux niveaux intracellulaire et extracellulaire. Du fait qu'il est aussi bien liposoluble qu'hydrosoluble, il peut accéder à toutes les parties de nos cellules. L'acide lipoïque réduit la glycation et favorise le transfert du glucose sanguin aux cellules en stimulant l'activité insulinaire.

Les composés phénoliques leur prise a été largement rapportée pour protéger contre le développement de maladies coronariennes. De nombreuses preuves existent montrant que les composés phénoliques peuvent prévenir l'oxydation des LDL.

Les sources alimentaires de ces antioxydants naturels sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Principaux nutriments Antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix
β-carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou, Œufs, poissons, viandes

II. Les thromboses

Une thrombose est un caillot de sang (ou thrombus) qui se forme dans une artère ou une veine, de ce fait, on distingue deux types des thromboses : thromboses artérielles et thromboses veineuses, deux entités distinctes différentes entre elles dans les facteurs de risque, les mécanismes physiopathologiques et les manifestations cliniques (Bautres ,2002 ; Corti R, *et al.*,2004). Les conséquences des thromboses sont multiples comme l'embolie pulmonaire, au niveau du cerveau les accidents vasculaires cérébraux (AVC), il peut également conduire à un infarctus du myocarde.

II-1.Thromboses artérielles

La thrombose artérielle est un caillot ou thrombus blanc constitué d'amas plaquettaire consolidé par un réseau fibrineux et elle se forme habituellement après l'érosion ou la rupture de la plaque athéromateuse liée à l'évolution de l'athérosclérose, cette thrombose est connue sous le nom d'athérothrombose (Lacut, *et al.*,2008). L'athérothrombose est considérée actuellement comme la cause principale de la mortalité dans le monde (Beaudeau,2006) elle est responsable des complications cliniques très dangereuses regroupées en trois catégories : les syndromes coronariens aigus, l'accident vasculaire cérébral et l'ischémie aigue des membres inférieurs(Bauters,2002). Avant la description du mécanisme physiologique qui contribue à la survenue des thromboses artérielles, l'anatomie de la paroi artérielle est déterminée (figure 4). La paroi artérielle est composée de trois tuniques sont de l'intérieur à l'extérieur :

- L'intima est faite d'une couche continue monocellulaire de cellules endothéliales séparée du sous endothélium par la membrane basale faite de collagène et joue le rôle de "tamis" moléculaire,.les cellules endothéliales sont anti-thrombotiques . L'intima est séparée de la média par la limitante élastique interne

- La média est plus ou moins développée suivant le type de vaisseaux elle est riche en fibres musculaires qui permettent la vasoconstriction et en fibroblastes. Elle est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe.

- L'adventice fera le lien avec les autres structures tissulaires péri-vasculaires et contient les terminaisons neuronales .

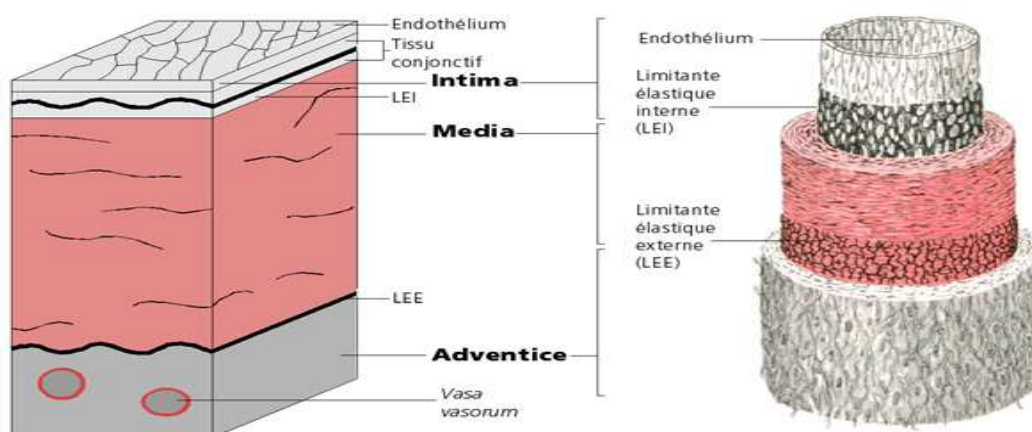


Figure 4: Structure de la paroi artérielle (Kahle, *et al.*, 1990 ; Léoni, 2001).

II-1-1. Mécanisme physiologique

L'organisation mondiale de la santé (OMS) décrivait l'athérosclérose en 1958 comme une association variable de remaniement de la couche interne des artères de gros et moyen calibre. Elle consiste en une accumulation focale de graisses (les lipides), de glucides complexes (les sucres), de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires. Le tout est accompagné de modification de la structure interne de l'artère. Elle est considérée comme le principal générateur de la thrombose artérielle, c'est une atteinte inflammatoire chronique qui affecte les artères de gros et de moyen calibre qui sont particulièrement les artères coronaires, périphériques, cérébrales, les carotides, et l'aorte (Davies et Woolf, 1993). L'artériosclérose a globalement la même signification mais concerne uniquement les artères de petit calibre et ne contient pas de graisse (Luc, *et al.*, 1991). Elle est principalement due au vieillissement (Igor, *et al.*, 2006). L'athérosclérose est donc responsable de la formation de plaques qui se développent à l'intérieur de l'artère, ces plaques peuvent boucher l'artère (figure 5). Des phénomènes inflammatoires et sanguins précipitent les événements car la plaque d'athérome peut rapidement générer la formation de caillots de sang qui vont obturer l'artère (Léoni, 2001).

Les facteurs de risque de l'athérosclérose sont soit prédéterminés génétiquement donc non modifiables (âge, sexe, antécédents familiaux cardiovasculaires, maladies métaboliques familiales comme les dyslipidémies ou autres anomalies génétiques favorisant la thrombose) soit acquis au cours de la vie (tabagisme, hypertension artérielle, obésité, diabète de type II, sédentarité, stress, hypercholestérolémie favorisée par l'alimentation) (Russel, *et al.*, 1999).

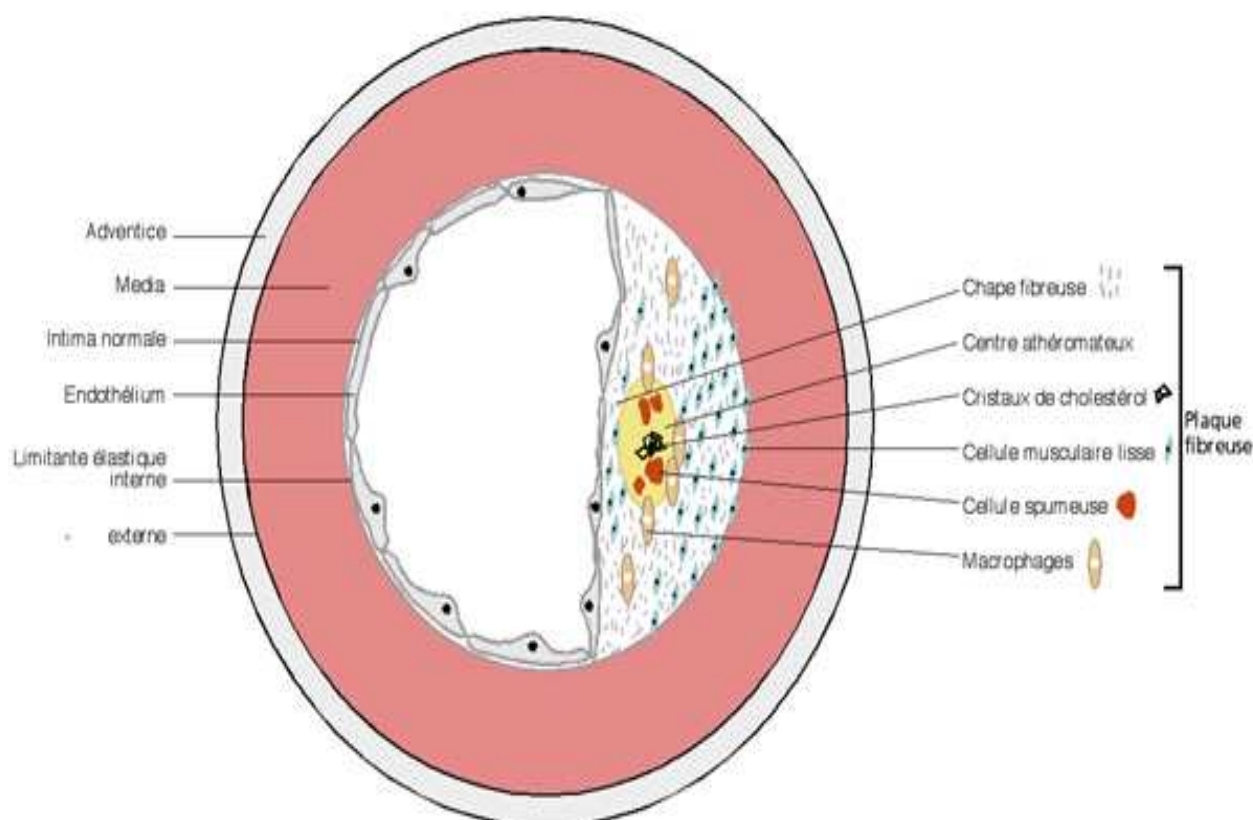


Figure 5 : Plaque d'athérome ou athéromateuse (Léoni, 2001).

Lors de l'athérogénèse, on assiste à une lésion anatomique touchant les artères. A l'origine, les lipoprotéines, en particulier les LDL, peuvent demeurer prisonnières de protéoglycanes sécrétés par les cellules endothéliales au niveau de l'intima des artères (figure 6).

Les cellules endothéliales produisent des radicaux libres qui peuvent venir attaquer l'apo B des lipoprotéines prisonnières de l'intima ou les lipoprotéines qui ne font que traverser la paroi artérielle. La molécule d'apo B ainsi modifiée sera reconnue par le système immunitaire comme étant une substance étrangère et les macrophages recrutés au niveau de la lésion pourront alors les internaliser *via* les récepteurs spécifiques ou le récepteur des LDL oxydées.

Les macrophages accumulent alors massivement du cholestérol et sont ainsi convertis en cellules spumeuses riches en cholestérol. Cette oxydation crée une inflammation au niveau de l'endothélium, déclenchant ainsi le recrutement et l'infiltration de monocyte circulant dans l'intima et conduisant à la constitution de stries graisseuses, dites stries lipidiques, à la surface luminale. Les stries lipidiques apparaissent au cours de cette étape. Les macrophages présents sur le site de la lésion, avec le concours des cellules endothéliales,

produisent des cytokines et des molécules qui entretiennent l'état inflammatoire au niveau de la lésion. Une fois que la réaction inflammatoire est amorcée, elle a tendance à s'amplifier d'elle-même. Une plaque mature d'athérosclérose est composée de deux éléments : un cœur lipidique et une matrice. Le cœur lipidique est composé de cellules spumeuses, de résidus de cellules spumeuses et de lipides. La matrice est formée de cellules musculaires lisses qui migrent de la média vers l'intima; elles prolifèrent et modifient leur phénotype afin de former une capsule fibreuse sur le cœur lipidique (figures 5 et 6).

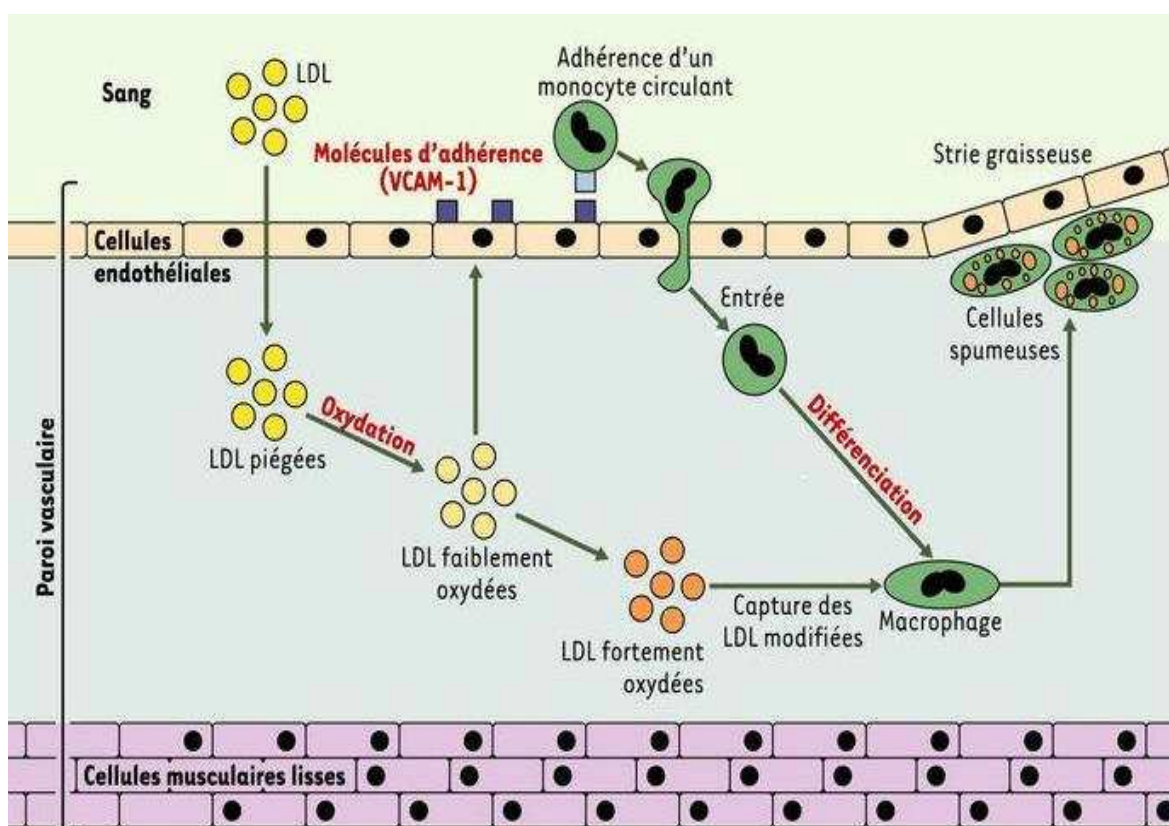


Figure 6: Formation d'une plaque d'athérosclérose (Belkheiri, 2010).

La stabilité de la plaque est dictée par le volume et la consistance du cœur lipidique, par l'épaisseur de la matrice fibreuse et par le degré de la réponse inflammatoire. Une rupture de la plaque entraîne la formation d'un thrombus dont le but premier est de colmater la blessure, mais qui est susceptible d'obstruer par le fait même la lumière de l'artère et de provoquer un syndrome ischémique. De plus cette plaque d'athérome est longtemps fragile en surface, des fragments peuvent s'en détacher et, ainsi libérés, aller obstruer des artères

plus petites dans le cerveau (hémiplegie), le cœur (infarctus) ou les poumons (embolie pulmonaire). Sous l'effet d'une lésion endothéliale, les plaquettes circulantes adhèrent au sous-endothélium, sécrètent leur contenu et s'agrègent les unes aux autres. La surface de ces plaquettes devient procoagulante et sert de support à la génération de thrombine initiée par le facteur tissulaire. La thrombine générée active d'autres plaquettes et polymérise le fibrinogène en réseaux de fibrine qui consolident le thrombus (Aleil, *et al.*,2004).

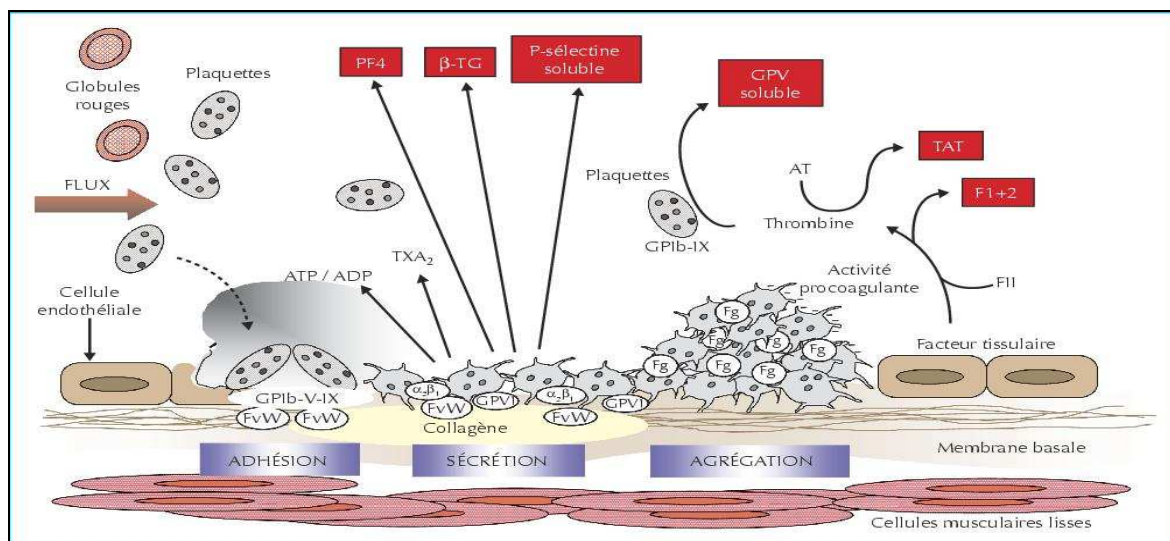


Figure 7 : Rôles des plaquettes dans les thromboses artérielles (Aleil, *et al.*,2004).

AT : antithrombine ; ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; β -TG : β -thromboglobuline ; F1+2 : fragment 1+2 de la prothrombine ; FII : prothrombine ; Fg : fibrinogène ; FvW : facteur de Willebrand ; GP : glycoprotéine ; PF4 : facteur plaquettaire 4 ; TAT : complexe thrombine-antithrombine ; TXA_2 : thromboxane A_2 . (liste non exhaustive). Les principaux marqueurs couramment utilisés pour l'activation plaquettaire (PF4, β -TG, P-sélectine) et pour la génération de thrombine (TAT, F1+2) sont encadrés en rouge.

II-2. Thromboses veineuses

La phlébite ou thrombose veineuse profonde est liée à la formation d'un caillot de sang (ou thrombus) qui bouche une veine. Elle survient le plus souvent dans une veine des jambes, mais elle peut survenir sur presque toutes les veines de l'organisme (bras, cerveau, tube digestif, reins, etc.). Les veines superficielles, sous la peau, peuvent aussi être touchées par une phlébite, on parle alors de phlébite superficielle (Léoni, 2001).

II-2-1. Mécanisme physiologique

Les phlébites commencent souvent dans les veines du mollet au niveau de petites valves ou valvules qui évitent au sang de faire marche arrière. Une fois formé, le caillot peut devenir important, allant jusqu'à boucher toute la longueur des veines d'une jambe (figure 8a). La phlébite porte également le nom de thrombose veineuse. Le caillot sanguin ou thrombus, va boucher la veine, entièrement ou partiellement et va empêcher le sang de circuler normalement à l'intérieur de la veine. Il faut savoir, qu'il y a deux types de phlébites, la phlébite superficielle, le caillot sanguin se forme dans une veine de surface, c'est souvent le cas des personnes qui ont déjà des varices, la phlébite profonde, Le caillot dans la veine de la jambe peut se détacher, remonter dans les veines jusqu'au cœur, le traverser et atteindre les artères au niveau du poumon : c'est l'embolie pulmonaire ou la maladie thromboembolique veineuse (MTEV). L'embolie pulmonaire fait toute la gravité des phlébites, car si les caillots ayant migré dans les artères du poumon sont nombreux et/ou volumineux, et peut entraîner une asphyxie du patient (Belkheiri, 2010) (figure 8b).

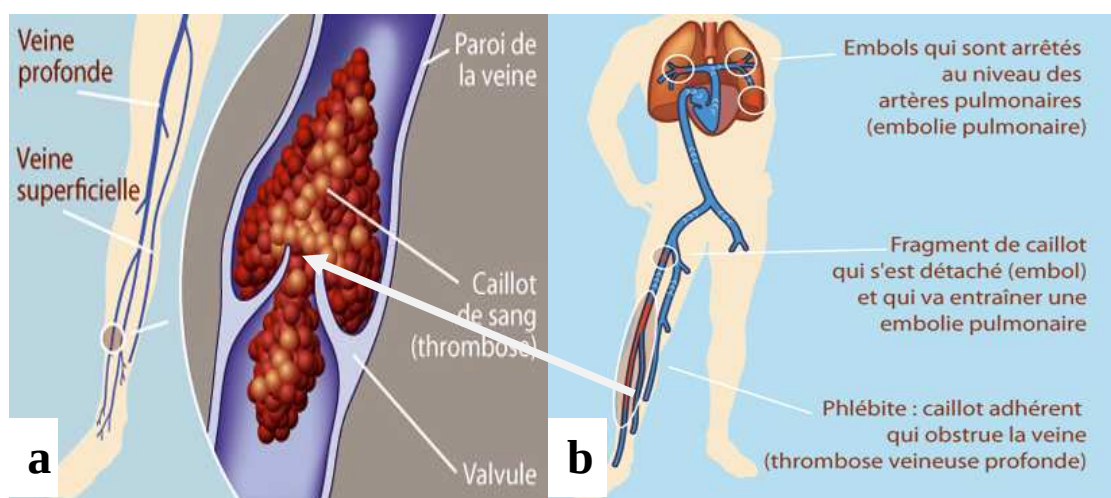


Figure 8 : (a) Formation initiale d'une phlébite au niveau d'une valvule des veines de jambe.

(b) L'embolie pulmonaire et la phlébite profonde.

L'hémostase est un phénomène physiologique permettant de limiter les pertes sanguines provoquées par une lésion vasculaire. La lésion de l'endothélium vasculaire va en effet provoquer la formation d'un thrombus plaquettaire (hémostase primaire) et la formation d'un réseau de fibrine insoluble qui va consolider ce thrombus (coagulation plasmatique).

La coagulation est l'aboutissement d'une cascade de réactions protéolytiques entraînant l'activation en chaîne de facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes) (Ajjan, et Grant, 2006). C'est un phénomène localisé au site de la brèche vasculaire car cette cascade de réactions, malgré son auto-amplification est limitée et régulée par différents systèmes d'inhibiteurs physiologiques. L'équilibre entre la coagulation et les mécanismes qui vont la limiter est fondamental, une rupture ayant pour conséquence un risque hémorragique (déficit en facteurs) ou thrombotique (excès de facteurs activés ou déficit en inhibiteurs).

Voie endogène : Dans cette voie de coagulation tous les éléments nécessaires de la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie est déclenchée par l'activation du facteur XII (Hageman) lors de ce contact aux structures électro-négatives de la matrice sous-endothéliale (collagène, sulfatides, glycosaminoglycanes) (Vogler, *et al.*, 2009), une activation qui conduit par la suite à l'activation de pré-kallikréine en kalikriéne qui à son tour peut activer le F XII. Le F XII activé catalyse la transformation de la forme zymogène du facteur XI à la forme protéolytique activée qui active par la suite le facteur IX (Vogler, *et al.*, 2009). Ce dernier se lie à la surface de phospholipides anioniques des plaquettes (F3P) par l'intermédiaire des ions calcium et forme, en présence de son co-facteur, le facteur VIII le complexe tenase qui est responsable de l'activation du facteur X (le facteur Stuart). Ce dernier forme avec son cofacteur, le facteur V (pro-accélérine), les phospholipides plaquettaires et par l'intermédiaire aussi des ions de calcium le complexe prothrombinase qui catalyse la transformation de prothrombine (facteur II) en thrombine (figure 9).

Voie exogène : La voie exogène est la voie la plus simple et la plus rapide que la voie endogène, elle fait intervenir un nombre limité de facteurs (Caen, *et al.*, 1975). Cette voie est activée par un facteur non plasmatique qui est le facteur tissulaire, une glycoprotéine membranaire exprimée sur la surface des cellules endothéliales et les cellules de la matrice sous-endothéliale. Lors d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire devient en contact avec le plasma ce qui permet l'interaction avec le facteur VII (pro-convertine) pour former un complexe enzymatique réactif (Facteur tissulaire-FVII). Ce complexe est responsable de l'activation de facteur X et aussi de facteur IX et par conséquent de prothrombine en thrombine (Colvin, 2004). La thrombine formée par les deux voies catalyse la conversion

de fibrinogène en monomères de fibrine qui s'associent les uns aux autres grâce à des liaisons hydrogène pour former un réseau fibrineux instable, où le facteur XIIIa (le facteur stabilisateur de fibrine) préalablement activé par la thrombine intervient pour la solidification du caillot fibrineux par l'établissement de liaisons covalentes entre les différentes molécules de fibrine (Ajjan, et Grant, 2006). Les différents étapes de coagulation sont présentées dans la figure 9.

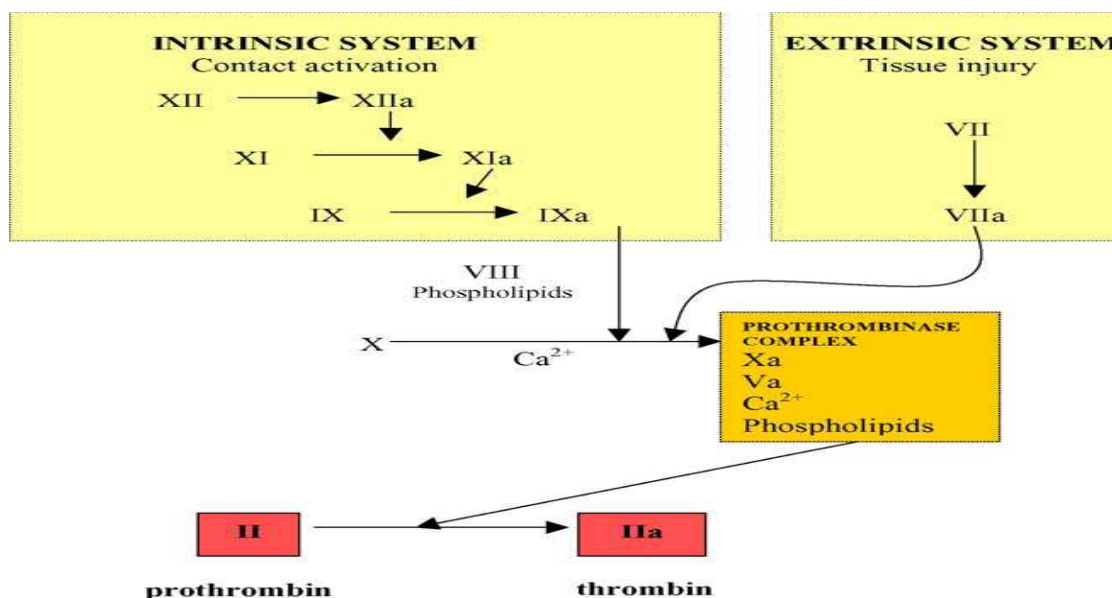


Figure 9: Schéma simplifié de la cascade de coagulation (Ajjan, et Grant, 2006).

II-3. Prévention des thromboses

II-3-1. Rôle de l'alimentation et de l'activité physique

Le régime méditerranéen, également appelé régime crétois ou diète méditerranéenne (mediteranean diet en anglais) est une pratique alimentaire traditionnelle dans plusieurs pays autour de la mer Méditerranée caractérisée par la consommation en abondance de fruits, légumes, céréales et huile d'olive et une consommation faible de viande et produits laitiers (OMS, 2003) (figure 10). Le régime crétois s'est fait remarquer par le grand public depuis que des scientifiques ont conclu, dans les années 50, que les Crétois avaient une espérance de vie supérieure et moins de maladies cardio-vasculaires que le reste de l'Europe (Keys, 1970 ; 1995). Les mesures diététiques permettent de ralentir la progression de l'athérosclérose et de limiter les risques de complications comme l'infarctus du myocarde, en agissant sur les facteurs favorisants ou aggravants (diabète, obésité, tabagisme, ...) en fluidifiant le sang, en réduisant la cholestérolémie totale et la fraction

LDL, et en apportant à travers l'alimentation des micronutriments protecteurs (antioxydants):vitamines. Ce régime est caractérisé essentiellement par la consommation d'huile d'olive associés à des préparations culinaires simples faisant un large usage d'épices et d'aromates, exerce non seulement des effets favorables sur les lipides sanguins mais protège également contre le stress oxydatif, car leurs effets protecteurs contre le stress oxydatif agissent en synergie. De plus, le régime méditerranéen mettant l'accent sur une consommation élevée d'aliments crus, la quantité de radicaux libres créés lors de la cuisson est forcément moindre, tandis que les substances antioxydantes que la cuisson aurait pu détruire sont préservées(Bernard, 2006).

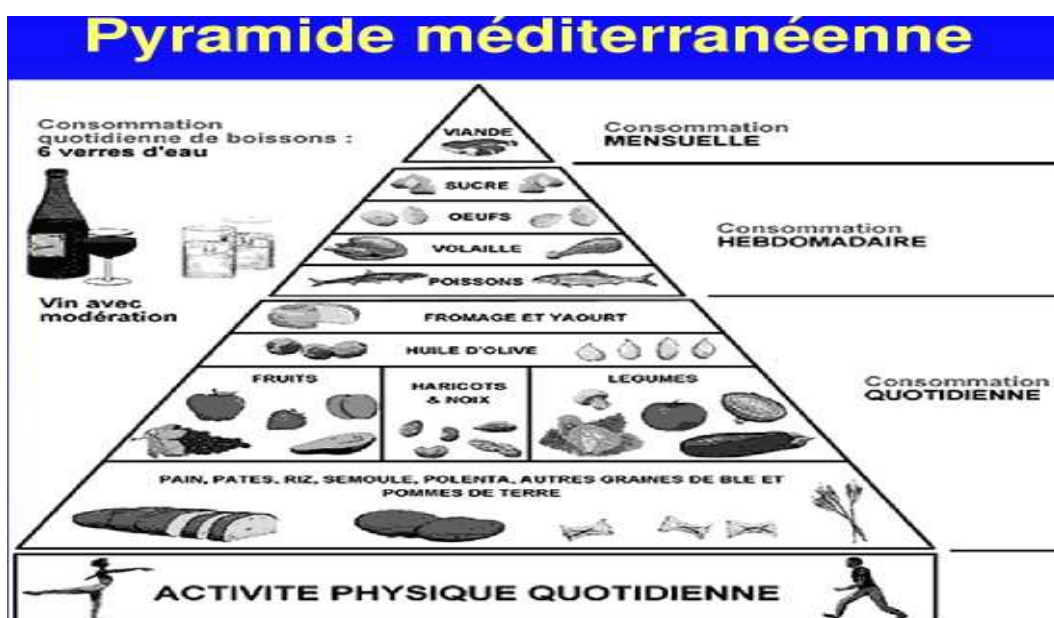


Figure 10 : Pyramide alimentaire de la diète méditerranéenne (Bernard.,2006).

II-4. Traitement des thromboses

Il existe trois classes d'agents pharmacologiques antithrombotiques utilisables, les antiagrégants, les anticoagulants, et les fibrinolytiques (Aubry, *et al.*,2010).

II-4-1. Antiagrégants

Les antiagrégants (aspirine, ticagrelor ,clopidogrel...) représentent à l'heure actuelle le traitement de référence des thromboses artérielles (Aubry, *et al.*,2010),mais les anticoagulants sont aussi recommandés en association avec les antiagrégants et les fibrinolytiques pour traiter les syndromes coronaires aigus et l'infarctus cérébral (Helft , et Leger., 2009).

II-4-2. Anticoagulants

Les anticoagulants représentent le traitement principal de la maladie veineuse thrombo-embolique. De nombreux anticoagulants agissant à différents niveaux de la cascade de la coagulation sont utilisés et ils sont regroupés en trois classes, deux classes des anticoagulants classiques (les héparines et les anti vitamines K) et la classe des nouveaux anticoagulants (Batty et Smith.,2010).

-Les héparines

Il existe deux types des héparines utilisables et administrées par voie intraveineuse ou sous cutanée, l'héparine non fractionnée (HNF) et les héparines de bas poids moléculaire (HBMP) (Batty et Smith.,2010). L'héparine non fractionnée est composée d'un mélange hétérogène de chaînes polysaccharidiques sulfatées de taille et de structures différentes extraites de la muqueuse intestinale de porc. Le poids moléculaire varie de 5000 à 35000 daltons alors que les héparines de bas poids moléculaire sont issues de la dépolymérisation des chaînes polysaccharidiques de l'HNF par des procédés chimiques ou enzymatiques, leurs poids moléculaire varient de 3000 à 5000 daltons. L'HNF et les HBPM forment un complexe avec l'anticoagulant physiologique l'antithrombine III potentialisant son effet sur l'inactivation de divers facteurs de coagulation. Le complexe HNF-antithrombine III inactive le plus notamment les facteurs Xa et la thrombine (facteur IIa), mais à un moindre degré les facteurs IXa, XIa et XIIa, alors que le complexe HBPM-antithrombine III inhibe particulièrement le facteur Xa et à moindre degré la thrombine (Batty et Smith.,2010).

-Les anti vitamines K

La vitamine K est un élément nécessaire dans la synthèse au niveau du foie de quatre facteurs de la coagulation, la prothrombine II, la proconvertine VII, le facteur stuart X, et le facteur antihémophilique B (le facteur IX). Elle intervient dans la carboxylation des molécules d'acide glutamique de l'extrémité –N- terminale de la chaîne glycoprotéinique de chacun de ces facteurs. Cette carboxylation est nécessaire pour l'activité biologique et la fixation de ces facteurs sur les surfaces phospholipidiques plaquettaires.

-Les nouveaux anticoagulants

Des nouveaux anticoagulants sont actuellement utilisés à côté des anticoagulants classiques. Ces anticoagulants sont subdivisés selon leur mode d'action en deux catégories, les inhibiteurs indirects qui agissent en potentialisant l'activité de l'antithrombine III, et parmi les quelles, la fondaparinux et l'idraparinux qui sont des inhibiteurs synthétiques

indirects et sélectifs du facteur Xa et ils sont constitués de 5 unités saccharides capables de modifier la conformation en augmentant l'activité inhibitrice naturelle de l'antithrombine I III sur le facteur Xa (Girardel, et Samama., 2006). Les inhibiteurs directs agissent directement sur le facteur Xa ou la thrombine, et parmi les quelles, le DX-9065a, l'hirudin, L'argatroban...etc. Le DX-9065a est un dérivé synthétique de l'acide propanoïque qui inhibe directement le facteur Xa libre et le facteur Xa lié dans le complexe prothrombinase (Girardel, et Samama., 2006) alors que l'hirudin est un peptide de 65 acides aminés extrait de la glande salivaire d'une espèce de ver (*Hirudo medicinalis*) et il inhibe directement et de façon irréversible la thrombine. L'argatroban est un dérivé synthétique d'acide carboxylique qui inhibe directement la thrombine (Samama, *et al.*, 2002).

II-3-3. Traitement fibrinolytiques

Le but traitement fibrinolytique (streptokinase, urokinase, activateur tissulaire de plasminogène...) est de lyser le thrombus artériel ou veineux, ce traitement associé le plus souvent à un traitement antiagrégant et anticoagulant (Crozier et Woimant., 2007).

III. Les polyphénols

III-1. Les polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols(PP) sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures connues différentes (Bahorun, 1997), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Akowauh *et al.*,2004). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina,2002). Ces corps jouent un rôle fondamental car sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. que consomme l'homme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (Scalbert, *et al.*,2005). L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives.

III-1-1. Structures chimiques et classification

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient.

On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes (Boros,2010). En plus de cette diversité, les phénols sont présents naturellement sous forme conjuguée : avec des sucres, des acides organiques, entre eux.

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes (figures 11 et 12)

- Les phénols simples (C6): un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C6–C1).
- Les flavonoïdes (C6-C3–C6): 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.
- Les tanins hydrolysable et non-hydrolysable.
- Les stilbènes (C6–C2–C6).
- Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane.

- Autres phytoestrogènes
- Les saponines (triterpénoïdes)
- Les phytostérols et les phytostanols (Paraskevi, Moutsatsou, 2007). Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates, qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates (Dacosta, 2003).

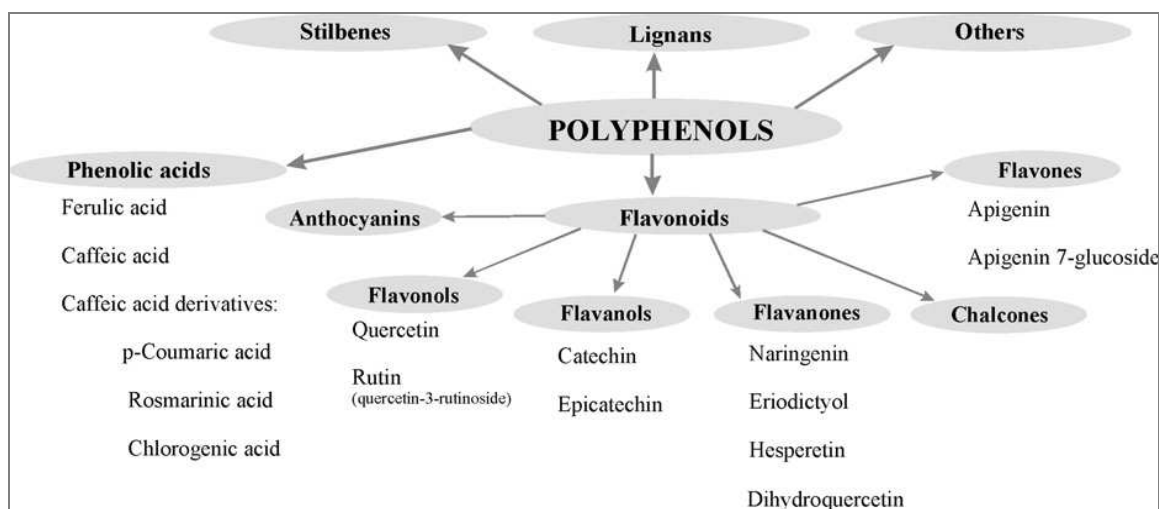
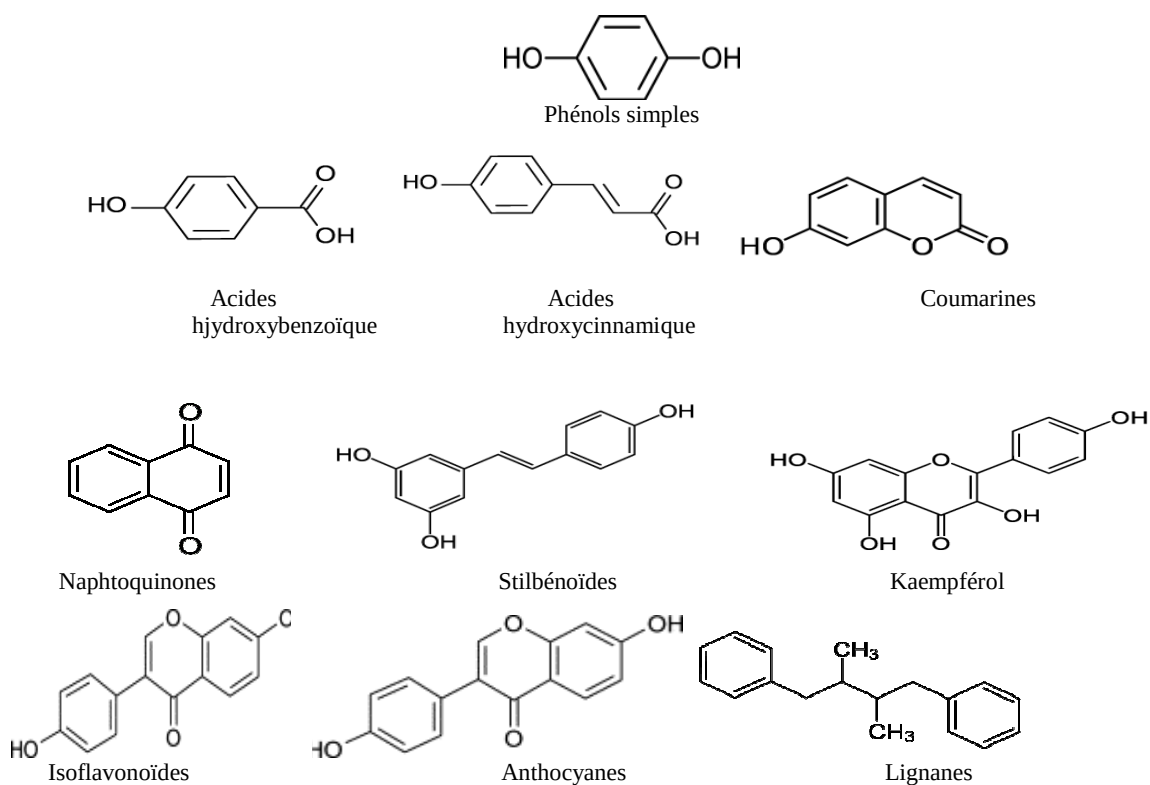


Figure 11 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe.

(Boros *et al.*, 2010)



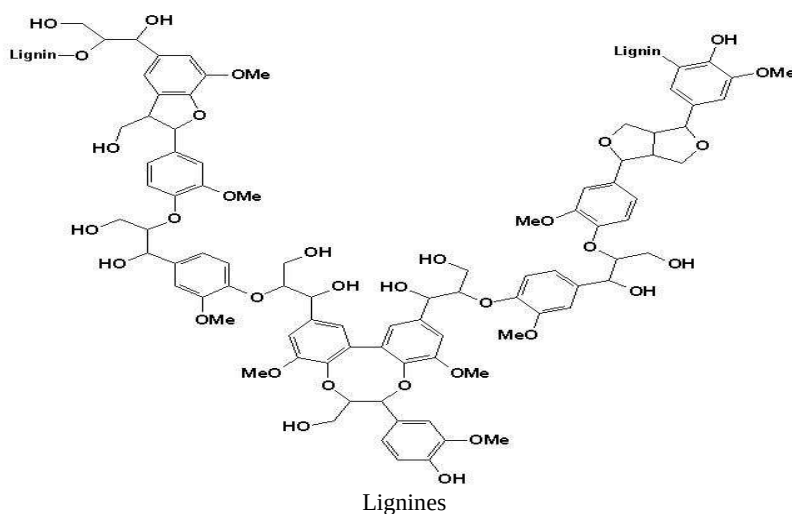


Figure12 : Structures chimiques de principaux polyphénols(Scalbert et Williamson, 2000).

III-1-2. Biosynthèse

Les polyphénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques :

- celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (Knaggs, 2003).
- celle issue de l'acétate, qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones (Bruneton,1999 ;Naczki, et Shahidi,2004).

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes(Martin et Andrian-tsohaina, 2002).

III-1-3. Effets biologiques des polyphénols

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique (Crozier, *et al.*,2010). De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires (Manach, *et al.*,2005). Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL), qui est

l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose(figure 13). En inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribuent à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus. Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères (Manach, *et al.*,2005). Ils sont regroupés dans la catégorie de veinotoniques et des vasculo-protecteurs (Ghosh, *et al.*, 2009). Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des antiagrégant plaquettaire ou hypotenseur sans résultats probants (Martin et Andriantsitohaina,2002).

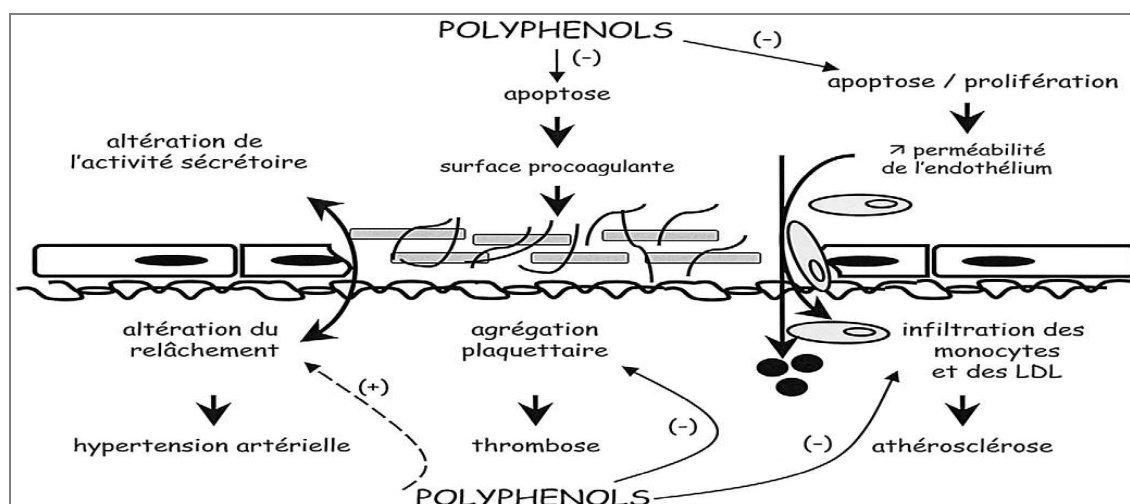


Figure13 : Effets des polyphénols dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Les symboles (–) représentent l'effet inhibiteur des polyphénols, et les symboles (+) montrent l'amélioration de la vasodilatation endothéliale par les polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Bahorun, 1997).

Ces composés montrent des activités antioxydantes (Gomez-Caravaca *et al.*,2006 ; Xiuzhen *et al.*,2010),anticarcinogènes,antiinflammatoires,antiathérogènes,antithrombotiques analgésiques, antibactériennes, antiviraux (Babar Ali, *et al.*,2007), anti-allergènes, vasodilatateurs (Falleh *et al.*,2008 ; Hodgson, 2010)(figure 14).

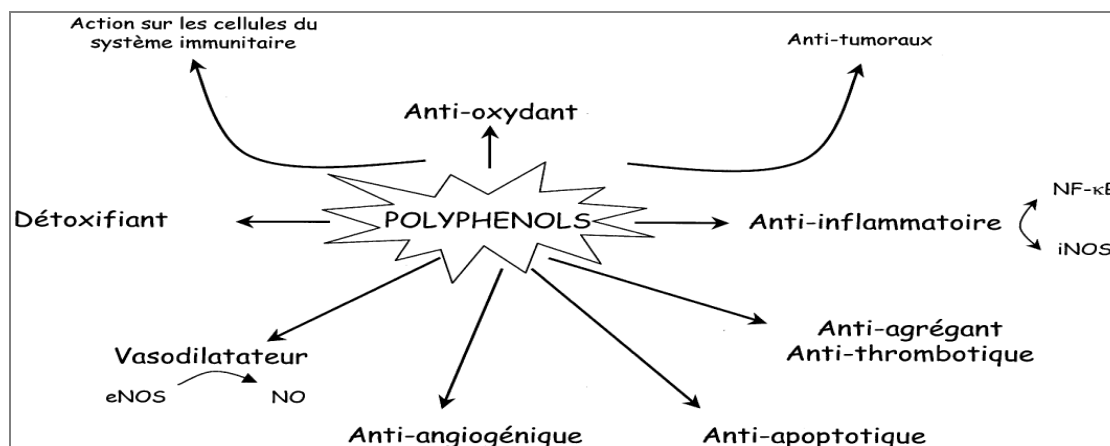


Figure 14 : Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

III-2. Les flavonoïdes

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour designer les pigments ayant un squelette (C6-C3-C6), provenant du mot latin flavus qui signifie jaune (Bouakaz, 2006). Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes (Lhuillier, 2007). Les plus couramment vendus ou utilisés en tant que compléments alimentaires, la vanilline et l'acide vanillique, le resveratrol, l'acide ellagique, les curcumine, stilbène, epigallocatechine gallate et la quercitine (Ferguson, 2001).

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de Szent Gyorgyi en 1938. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de Paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine P n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines. Ils sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses (Milane, 2004).

III-2-1. Structures chimiques et classification

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone (figure 15), fait de deux cycles benzéniques C₆ reliés par une chaîne en C₃ (Milane, 2004). Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone. La distinction des sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale (figure 16).

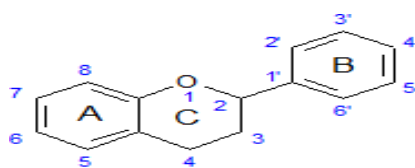


Figure 15 : Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003).

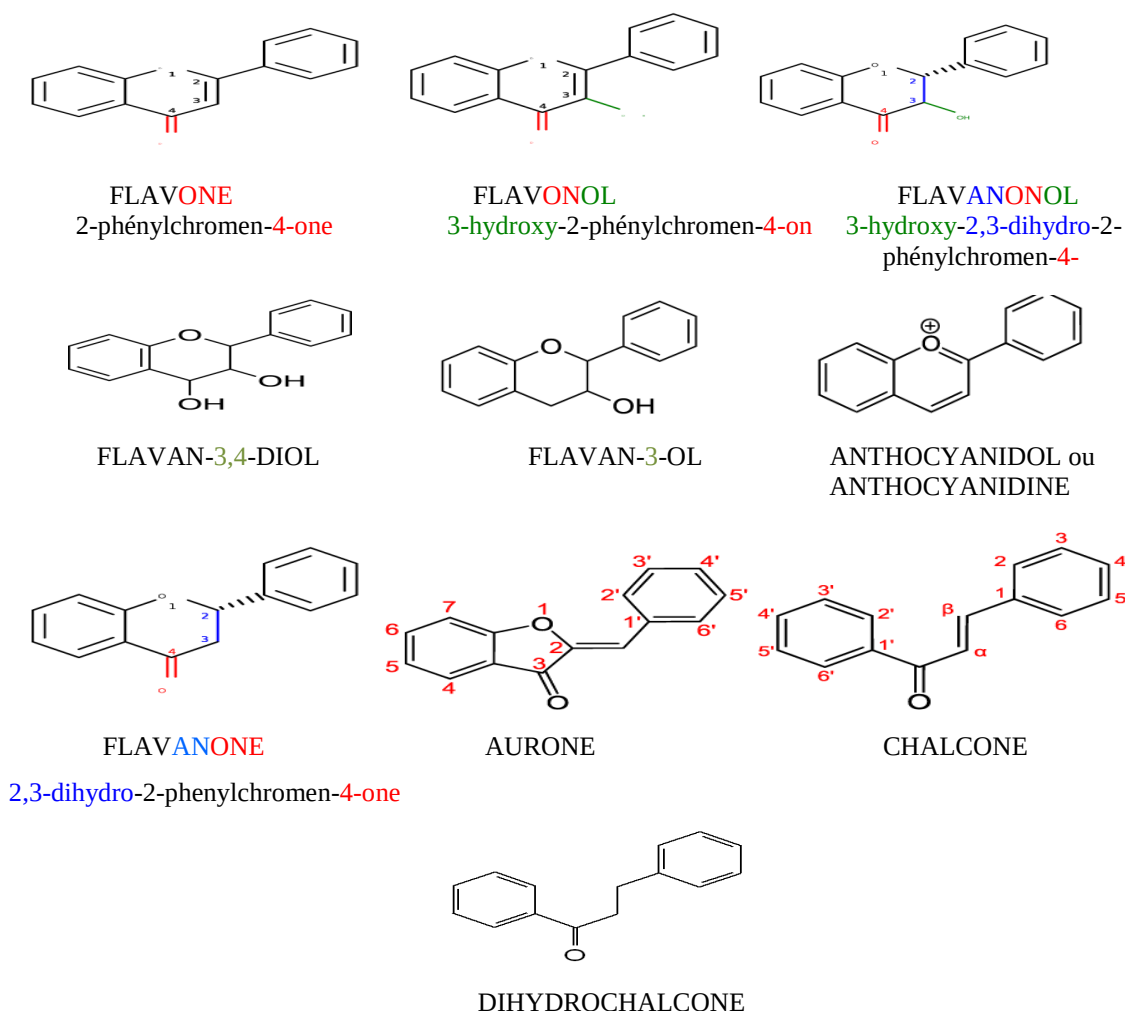


Figure 16 : Structures chimiques de quelques flavonoïdes (Scalbert et Williamson, 2000).

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 (figure 15). Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé Flavane. Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle la flavane est appelée Flavanone. Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé Flavone. Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle il est désigné par le nom de Flavonol. Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme Isoflavane (Bouakaz, 2006).

III-2-2. Biosynthèse

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA. Le *p*-coumaroyl CoA et les 3 malonyl CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone. Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes (Lhuillier, 2007). Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elles se trouvent *in vivo* (Bouakaz, 2006).

III-2-3. Effets biologiques des flavonoïdes

III-2-3-1. Effets antioxydant et pro-oxydant

Les flavonoïdes sont des composés avec une activité anti-oxydante prononcée (Hodek, *et al.*, 2002). Les flavonoïdes expriment les propriétés anti-oxydantes par : Le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), La suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production, La protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (Boudiaf, 2006).

Les flavonoïdes sont des antioxydants mais il ne faut pas négliger leurs propriétés pro-oxydantes. Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène. En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides in vitro . Alors, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes (Milane,2004).

III-2-3-2. Effets cardiovasculaires

De nombreux travaux publiés dans le N°31 du revue scientifique, *Molecular Aspects of Medicine* pour l'année 2010 suggèrent que les flavonoïdes participent à la prévention des maladies cardiovasculaires (Etudes faites par plusieurs auteurs, Crozier, ; Das, ; Fraga, ;Hodgson,; Larossa, et Perez viscaino., *et al*,2010). Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguin et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). En inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribue à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus. Les flavonoïdes agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères (Scalbert, *et al.*, 2005).Des études cliniques réalisées aux Royaume-Uni ,l' Australie, et l'Europe ont montré que les flavonoïdes améliorent le fonctionnement de l'endothélium la couche cellulaire qui tapisse les surfaces des vaisseaux sanguins et qui joue un rôle essentiel dans le contrôle du bon fonctionnement du système vasculaire en réduisant les risques d'athérosclérose (Peters, *et al.*, 2001;Mulvihill, et Huff., 2010),une études similaire a été réalisé au Arabie Saoudite confirment les résultats précédentes (Hakim, *et al.*, 2003), donc les flavonoïdes possèdent des effets préventifs contre les risques de thrombose limiteraient les risques d'infarctus du myocarde. Autre études ont montré que Les flavonoïdes notamment les coumarines sont des agents anticoagulants, antiagrégants plaquettaire (Zhou, *et al.*,2009) ,et antiathérogènes ce qui explique leur

effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires (Chang, *et al.*, 2009). La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être "veino- actifs", c'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (Bruneton, 2009), donc ils participent à renforcer l'élasticité, l'étanchéité des vaisseaux sanguins. Ils contribuent également à améliorer l'irrigation et la dilatation des artères et réguleraient ainsi la tension artérielle. Ils participeraient également à lutter enfin contre l'altération des fibres de collagène, indispensable au maintien de la santé cellulaire (Mulvihill et Huff ., 2010). Les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes (Xu *et al.*, 2007). Parmi les 17 flavonoïdes examinés par Xu et ses collaborateurs (2007), les agents de relaxation vasculaires les plus efficaces sont l'apigénine, lutéoline, kaempferol et lagénisteine. Cette relaxation est attribuée à l'action directe des flavonoïdes sur le muscle lisse vasculaire.

III-2-3-3. Autres effets biologiques

Les flavonoïdes seraient impliqués dans la prévention des cancers. Ajoutés au régime de divers animaux de laboratoire, ils limitent le développement de tumeurs induites expérimentalement par exposition à des agents carcinogènes. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie, etc.) à tous les stades de la cancérogenèse (Petti, et Scully, 2009). Au stade d'initiation, ils agissent comme agents bloquants en empêchant l'activation de procarcinogènes, en piégeant les mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation des ADNs mutés. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agents suppresseurs de tumeurs (Ho, *et al.*, 2007). Les mécanismes impliqués peuvent là encore être très variés: prévention du stress oxydant, inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique et des réactions inflammatoires associées, inhibition de la protéine kinase C et de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose (Petti, et Scully, 2009), inhibition de l'angiogenèse. Les preuves de leurs effets chez l'homme restent cependant encore insuffisantes.

Une étude clinique a permis de montrer une activité anticancéreuse de la quercétine, administrée par voie intraveineuse chez des patients atteints du cancer (Hodgson, *et al.*, 2010). Les flavonoïdes pourraient aussi exercer des effets protecteurs contre les maladies hormonodépendantes telle que l'ostéoporose en modulant la réponse aux oestrogènes

endogènes. Certains polyphénols et plus particulièrement les isoflavones du soja très étudiées aujourd'hui, ont une affinité remarquable pour les récepteurs des oestrogènes et sont qualifiés pour cela de phyto-oestrogènes. Les fruits et légumes contiennent aussi des polyphénols tels la quercétine de l'oignon ou le kaempferol de la chicorée qui possèdent également des propriétés pseudo-oestrogéniques ou inhibent la perte osseuse chez la rate ovariectomisée (Saleh,2011). Là encore, de nouvelles études restent nécessaires pour confirmer ces effets chez l'homme.

Des flavonoïdes ayant une activité antivirale semble être associée aux composés non glycosylés et l'hydroxylation en position 3 est apparemment nécessaire à cette activité. (Hodek, *et al.*,2002).Ainsi, une activité microbiennes via l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien(Milane,2004).Lahouel et ses collaborateurs, (2004) ont évalué l'effet des flavonoïdes donnés par voie orale pendant 14 jours, vis-à-vis la toxicité hématologique et hépatique du cyclophosphamide et de la vinblastine, ainsi que la toxicité hépatique du paracétamol.Chez les rats prétraités par les flavonoïdes il apparaît une nette amélioration dans les effets toxiques (Lahouel, *et al.*,2004). La quercétine et la rutine une fois administré oralement aux souris hyper-uricémique induits par l'oxonate de potassium, réduisent les niveaux d'acide urique dans le sérum, les cataractes diabétiques. Une étude clinique pour son utilisation dans le traitement du sida.(Martin et Andriantsitohaina, 2002).Les flavonoïdes sont *in vitro* des inhibiteurs enzymatiques, des élastases et des collagénases sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase. Quant à (lutéolol, apigénol, chrysine, etc.) inhibent la cyclo-oxygénase donc de la biosynthèse des prostaglandines. Ce qui peut expliquer l'activité anti-inflammatoire des flavonoides (Bruneton,1999).

Cet effet est dû à l'inhibition de certains enzymes (lipoxygénase,phospholipase,cyclooxygénase) impliquées dans leur biosynthèse (Potapovich, *et al.*,2011). L'activité anti-tumorale de plusieurs flavonoïdes comme la quercétine, est attribuée à leurs efficacité d'inhiber la topoisomérase I et II(Hodek *et al.*,2002).Les flavanols (catéchines et procyanidines) peuvent moduler l'expression de nombreux gènes régulés par le facteur de transcription NF-κB (Hodgson et Croft, 2010; Potapovich, *et al.*, 2011).

IV. L'olivier « *Olea europaea* L. »

IV -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 intégré 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 peut 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. (figure17).

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 18 .

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

Les fleurs blanches (figure17), à corolle en tube portant quatre lobes ovales, sont groupées en grappes dressées et apparaissent à l'aisselle des feuilles vers mai-juin.

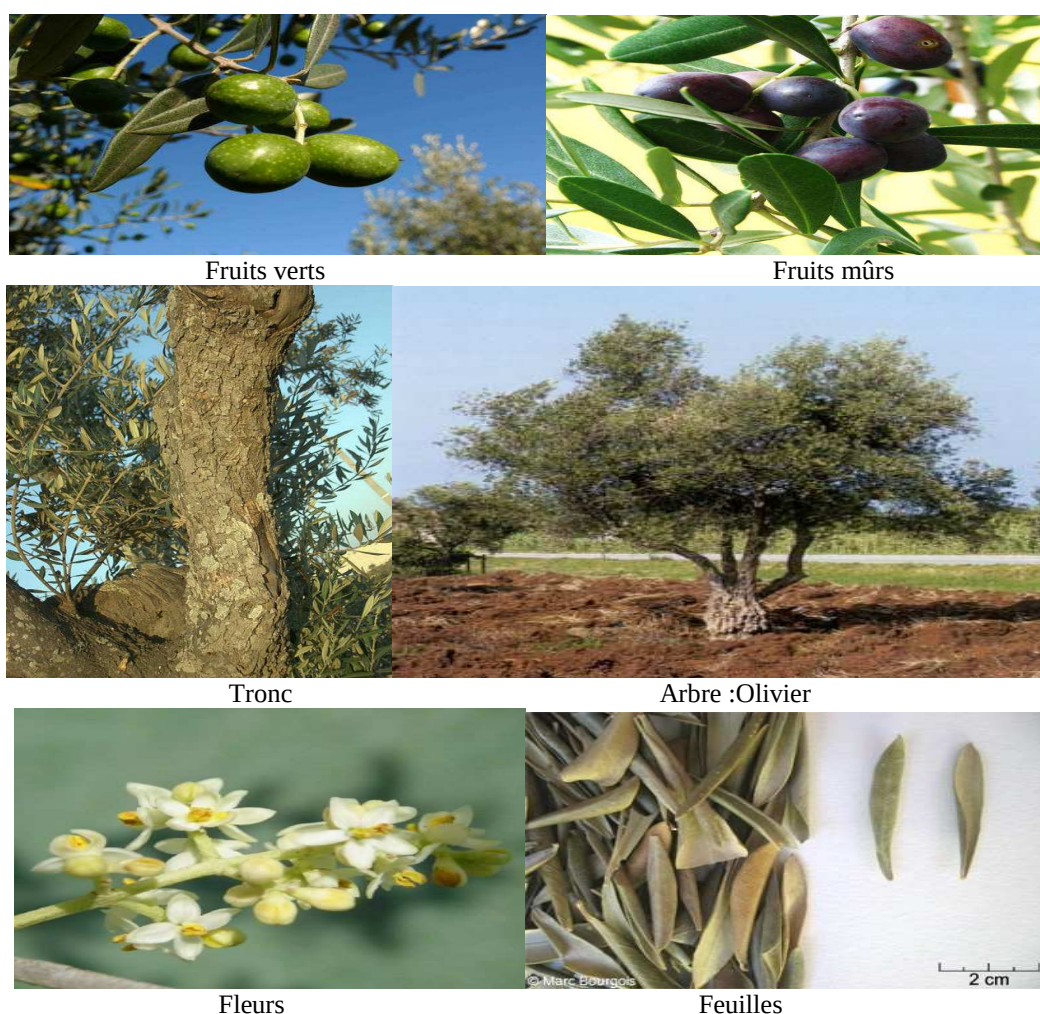


Figure 17 : Aspect morphologique de la plante *Olea europaea* L. et leurs parties.
« <http://www.wikiophyto.org/wiki/Olivier> »

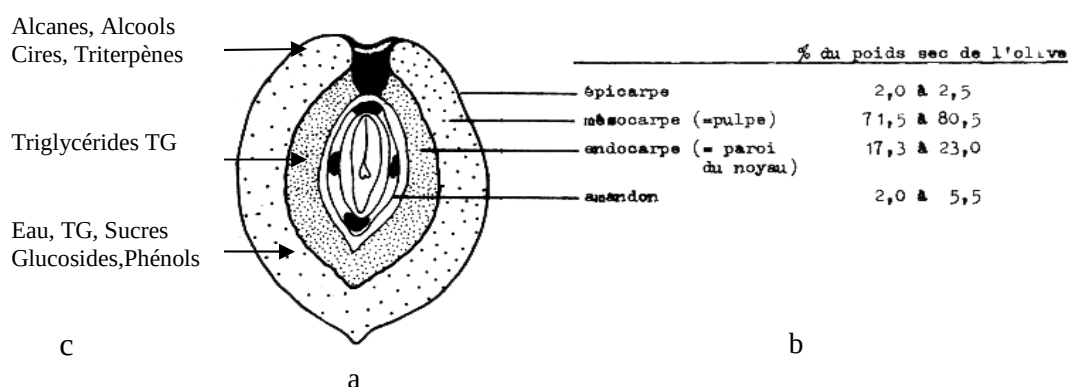


Figure 18 : Section transversale (a) (Maymone, *et al.*, 1961 ; Sansoucy, 1984) et composition physique (b) (Nefzaoui, 1991). composition chimique de l'olive (c) (Bianchi, 1999).

IV-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** : Zaitounة الزيتون.

Systématique

Règne : *Plantae*.

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*.

Ordre : *Scrophulariales*.

Famille : *Oleaceae*.

Genre : *Olea*.

Espèce : *Olea europaea*.



La plante *Olea europaea* L.

(Kohler's Medizinal-Pflanzen, 1887)

IV-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 (figure19). 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).

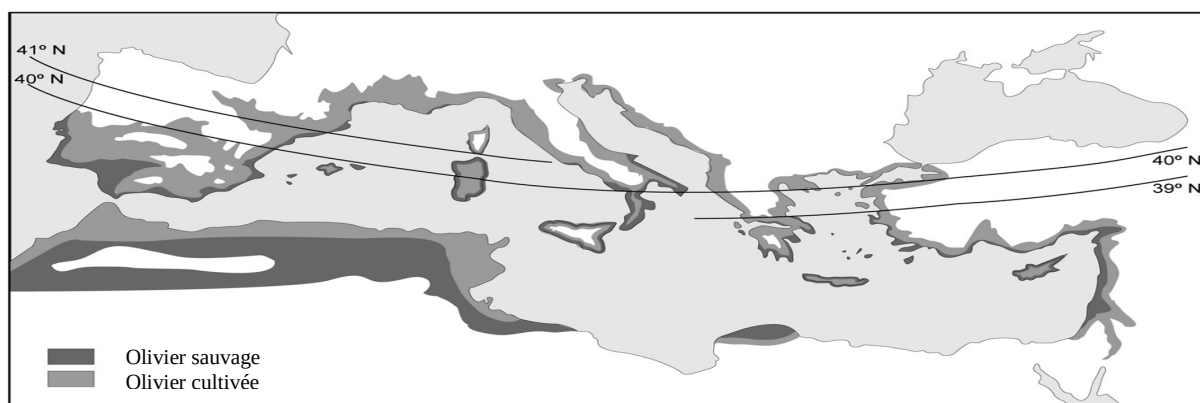


Figure 19 : Aire de répartition de l'olivier sauvage et cultivée dans le bassin méditerranéen. (Carrion, *et al.*, 2010).

IV-4. Composition chimique

IV -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 (stérols, 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 -linolénique (ω 3) (C18:3n-3) <1,5%,Acide arachidonique (C20:0) <0,8(Tripoli, 2005).

IV-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 sécoïridoïdes 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

élenolique. 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 élenolique (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.*, 2000_d).

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 20.

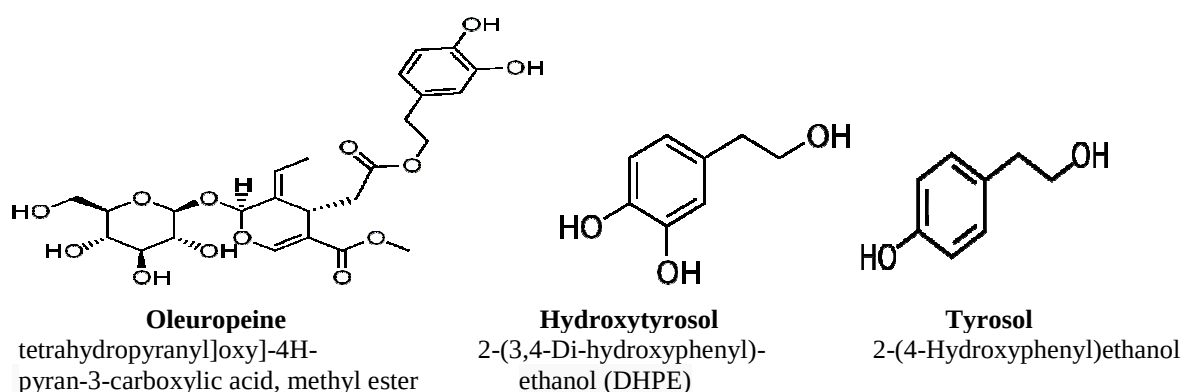


Figure 20 : Structures chimiques des trois principaux composés phénoliques d'olive (Tripoli, *et al.*, 2005).

IV-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).

IV -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).

IV -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).

IV -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 de 70-90mg/100g (Owen, *et al.*, 2000) principalement , les stérols et les avenastérols (Tsimidou, 2006).

IV -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).

IV -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 à base de feuille d'olive et modulation de l'expression des gènes 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 infections 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 (figure21). 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).

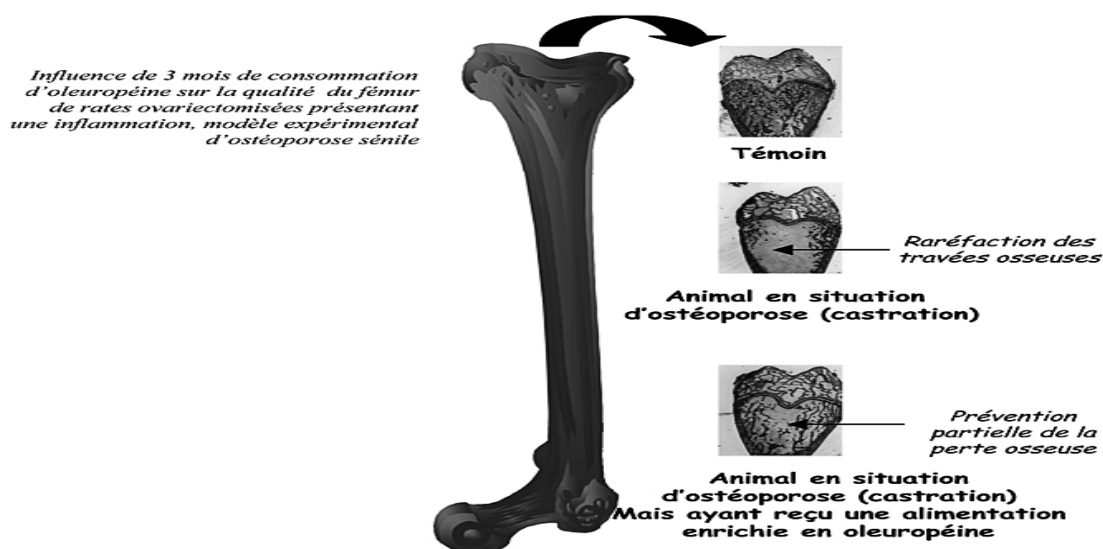


Figure21 :Effet préventif de l'oleuropéine contre l'ostéoporose(Saleh, N.K. et Saleh, H.A.,2011).

IV-6. Mécanisme d'action

Malgré le nombre d'études qui contribuent au modèle représenté à la figure 22 (Perona, *et al.*, 2006), plusieurs lacunes qui doivent être remplies avec d'autres enquêtes sont toujours présents.

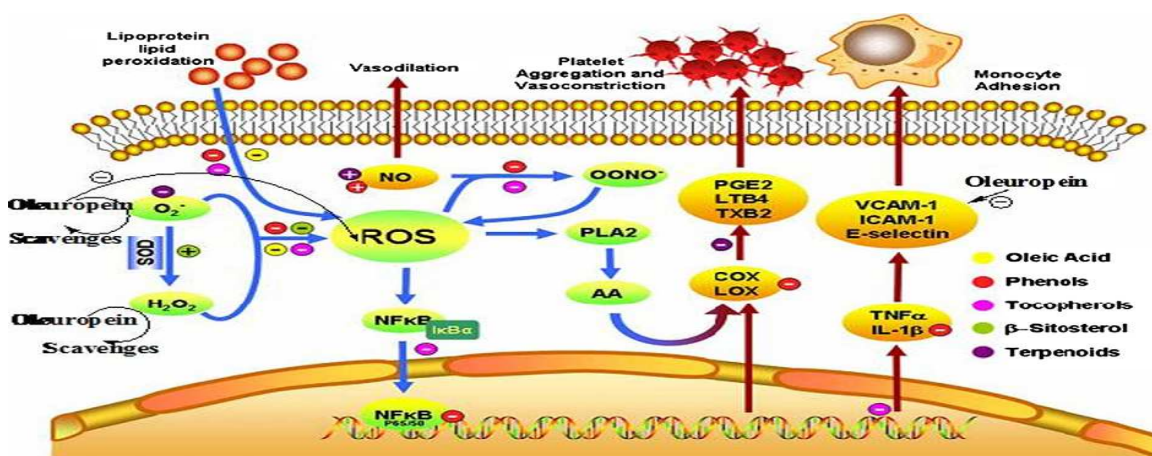


Figure 22 : Modèle proposé pour les mécanismes d'action de l'acide oléique et des composés mineurs de l'huile d'olive (Perona, *et al.*, 2006).

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 le β -sitostérol peut réduire la production des ROS intracellulaire. le β -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 peroxynitrite ($\text{OONO}^\bullet$).

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).

Partie Experimentale

I. Matériel et méthodes

I-1 . Matériel

I -1-1 . Matériel végétal

Les échantillons d'olive utilisés dans cette étude ont été collectés durant le mois de décembre 2009 au niveau de la commune de Béni-Ourtilane (wilaya de Sétif) connue pour sa vocation oléicole .Selon les données de la direction des services agricoles (D.S.A) de Sétif, notre choix a été orienté vers deux variétés d'olives les plus prépondérantes, les variétés Bouchouk (VB), et Khanfes ou Akhenfes (VK) (figure 23).Ces variétés sont utilisées ou bien pour la préparation des olives de table ou pour l'extraction d'huile.

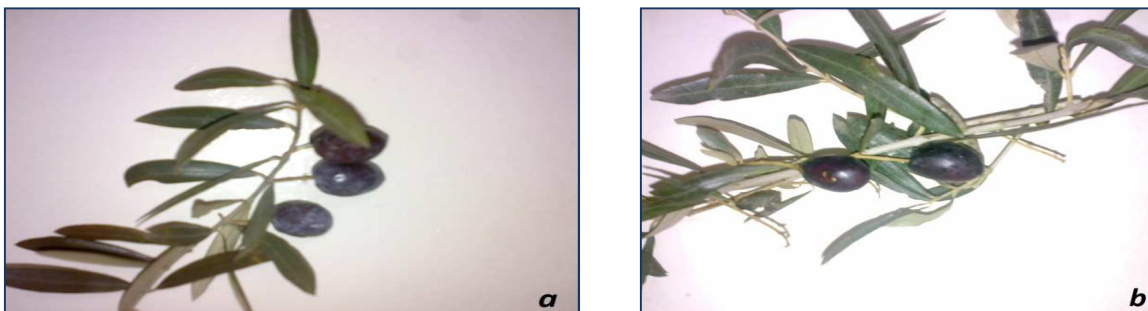


Figure 23 : Fruits et feuilles des variétés d'olive BOUCHOUK(a) et KHANFES (b) .

I -1-2 .Produits et réactifs chimiques

Les solvants organiques utilisés dans les différents compartiments de cette étude sont de grade analytique (Le méthanol, l'éthanol, le chloroforme, l'éther de pétrole ont été fournis par Sigma- Aldrich, l' hexane par Prolabo, et l'acétate d'éthyle par Fisher Laboratory). Les différents acides sont : L'acide acétique ($C_2H_4O_2$) ,l'acide sulfurique (H_2SO_4), l'acide formique (CH_2O_2) du Biochem ,l'acide linoléique $C_{18}H_{30}O_2$ du Merk, l'acide trichloracétique (TCA) de Fluka, et l'acide gallique de Sigma.

Les réactifs chimiques sont le DPPH diphenylpicryl β hydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) et le trichlorure d'aluminium($ALCL_3$) ont été fournis par Fluka, le Folin-Ciocalteu(FCR) par Prolabo. Les sels sont : Bicarbonate de sodium (Na_2CO_3), Citrate de Sodium ($C_6H_5Na_3O_7$) , Chlorure de Sodium (Nacl) par Prolabo, Chlorure de calcium ($CaCl_2$) de Sigma-Aldrich,

Sodium Phosphate dibasique (Na_2HPO_4), Phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4) de Sigma. D'autres produits chimiques utilisés : la rutine, la vanilline, la catéchine et la quercétine ont été fournis par Sigma, le Chlorure de fer (FeCl_3), Ferricyanide de Potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) par Aldrich, le tyrosol (2-4 hydroxy phényl éthanol) et l'oleuropéine par Sigma-Aldrich, le β Carotène ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) et le butylhydroxytoluène (BHT) par Fluka, et le gel de Silice par Prolabo.

Pour l'évaluation de l'activité anticoagulante on a utilisés les produits suivants : La thromboplastine (BIO-TP), le tampon de reconstitution de la thromboplastine, la céphaline kaolin (BIO-CK), la thrombine (BIO-Fibri) ont été fournis du Biolabo de France, l'héparine ou la Fraxiparine (une héparine de 2850 UI, constitue une solution injectable dans des seringues pré-remplies à usage thérapeutique) achetée du pharmacie.

I-2 . Méthodes

Les différentes étapes réalisées dans cet étude son : la caractérisation pomologique, l'extraction des polyphénols et leurs caractérisation quantitative et qualitative, puis l'évaluation *in vitro* des activités antioxydante et anticoagulante des olives (figure 23)

I-2-1 .Caractérisation physique ou pomologique

L'étude des paramètres pomologiques des olives a été réalisée dans le but de l'identification variétale, elle consiste à la détermination des moyennes du poids, de largeur et de longueur, le taux d'humidité, le taux de matière grasse, la teneur en polyphénols de la fraction huileuse des pulpes d'olive des deux cultivars étudiés.

Ces deux derniers ont été caractérisés à partir d'échantillons homogènes d'olives noires. Le traitement de l'olive dans laboratoire se fera conformément au protocole représenté à la figure 24. Des échantillons aléatoires de 50 fruits qui seront pesés pour déterminer le poids frais moyen du fruit, la largeur et la longueur moyennes ont été réalisé à l'aide d'un pieds - coulisse. Ces fruits seront ensuite congelés jusqu'au moment où ils pourront être dénoyautés.

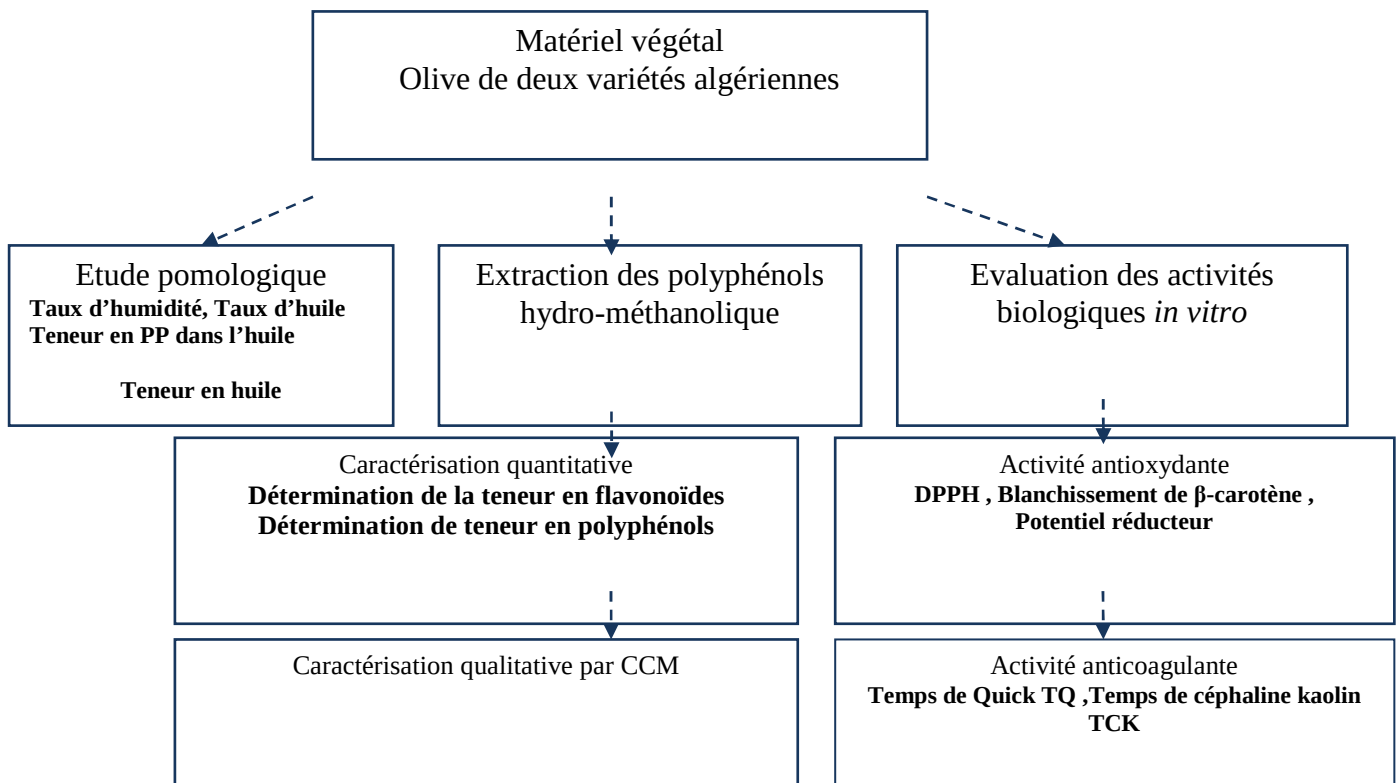


Figure 24 : Représentation schématique des étapes réalisées dans cette étude.

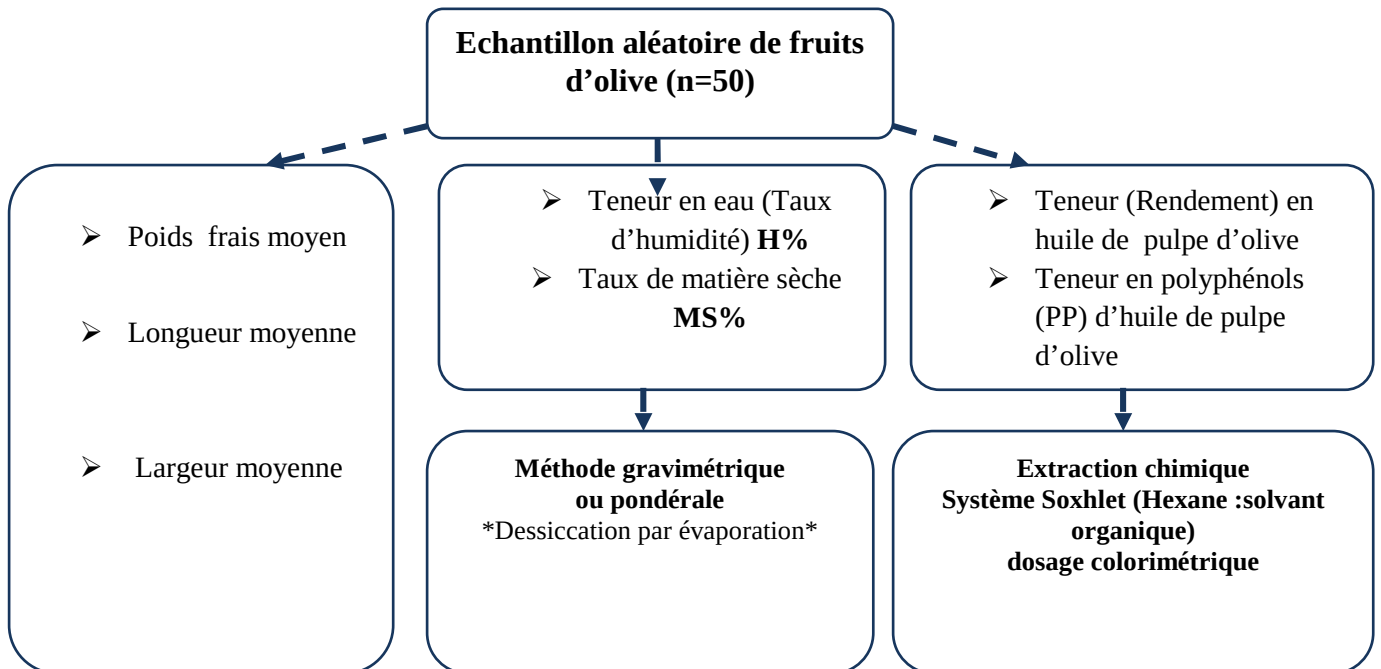


Figure 25 : Schéma de caractérisation des fruits d'olive des différentes variétés VB et VK.

I-2-1-1 .Taux d'humidité ou teneur en eau

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 plaques 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 (Del Rio, Romero et Caballero., 1998). 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 :

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

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 :

$$\text{MS \%} = 100 - \text{H\%}$$

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

L'huile de pulpe d'olive est extraite par un système Soxhlet (figure 26) à l'aide de l' n-hexane selon la méthode de Virot et ces collaborateurs (2002) avec certaines modifications. 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 , porté à une température voisine de celle de l'ébullition du solvant, soit 60°C environ (figure 26). Cette technique est utilisée pour donner une estimation exacte de la teneur en huile des olives. (Abaza et al.,2002).

La masse d'huile est déterminée par double pesée, et les rendements en matière grasse (MG%) de pulpe pour les deux variétés étudiées sont ainsi calculés.



Figure 26 : Extraction des huiles de pulpe d'olive par Soxhlet (A gauche) et Evaporation sous vide par rotavapor de type Heidolph (A droite).

I-2-1-3 .Teneur en polyphénols d'huile de pulpe d'olive

Pour l'extraction des polyphénols de la fraction apolaire on procède à la méthode de (Vassiliki et al.,2009), 1g d'huile est dissoudre dans 5ml d'hexane, puis 5ml du mélange méthanol/ eau (60 :40 , v/v) est ajouté puis l'agitation par un vortex, ainsi qu'une centrifugation à 3500 r p m pendant 10 minutes est effectuée. On obtient deux fractions une couche apolaire, et l'extract polaire a été utilisé dans l'analyse principalement le dosage des polyphénols dans l'huile d'olive par la méthode colorimétrique du Folin-Ciocalteu

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

La préparation des échantillons est d'une importance capitale pour toute analyse fiable. 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 cet 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 (figure 27). Le matériel végétal a été conservé dans des flacons ombrés, dans la congélateur pour les analyse ultérieures.

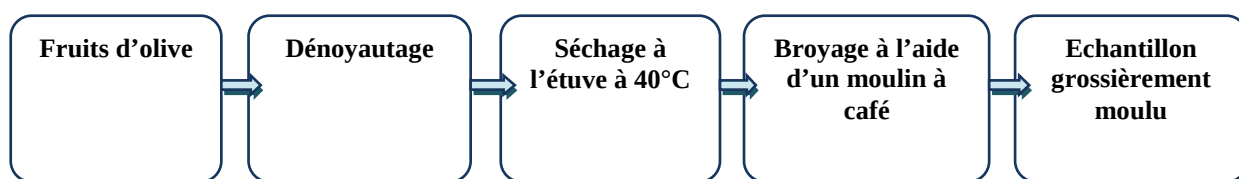


Figure 27 : Schéma qui représente la procédure suivie pour la préparation de l'échantillon d'olive destiné à l'extraction.

Dans une première extraction on ajoute à 25g de l'échantillon préparée (comme mentionné précédemment) 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 de N° 4, le filtrat1 a été évaporé sous pression à l'aide d'un rotavapor de type Heidolph(figure) pour une élimination totale du méthanol, et l'obtention d'un extrait aqueux 1. le premier résidus a été récupéré pour une deuxième extraction hydrométhanolique (MeOH-Eau : 50% (v/v), puis le mélange a été agité par un Osill, 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 à une délipidation par l'hexane.

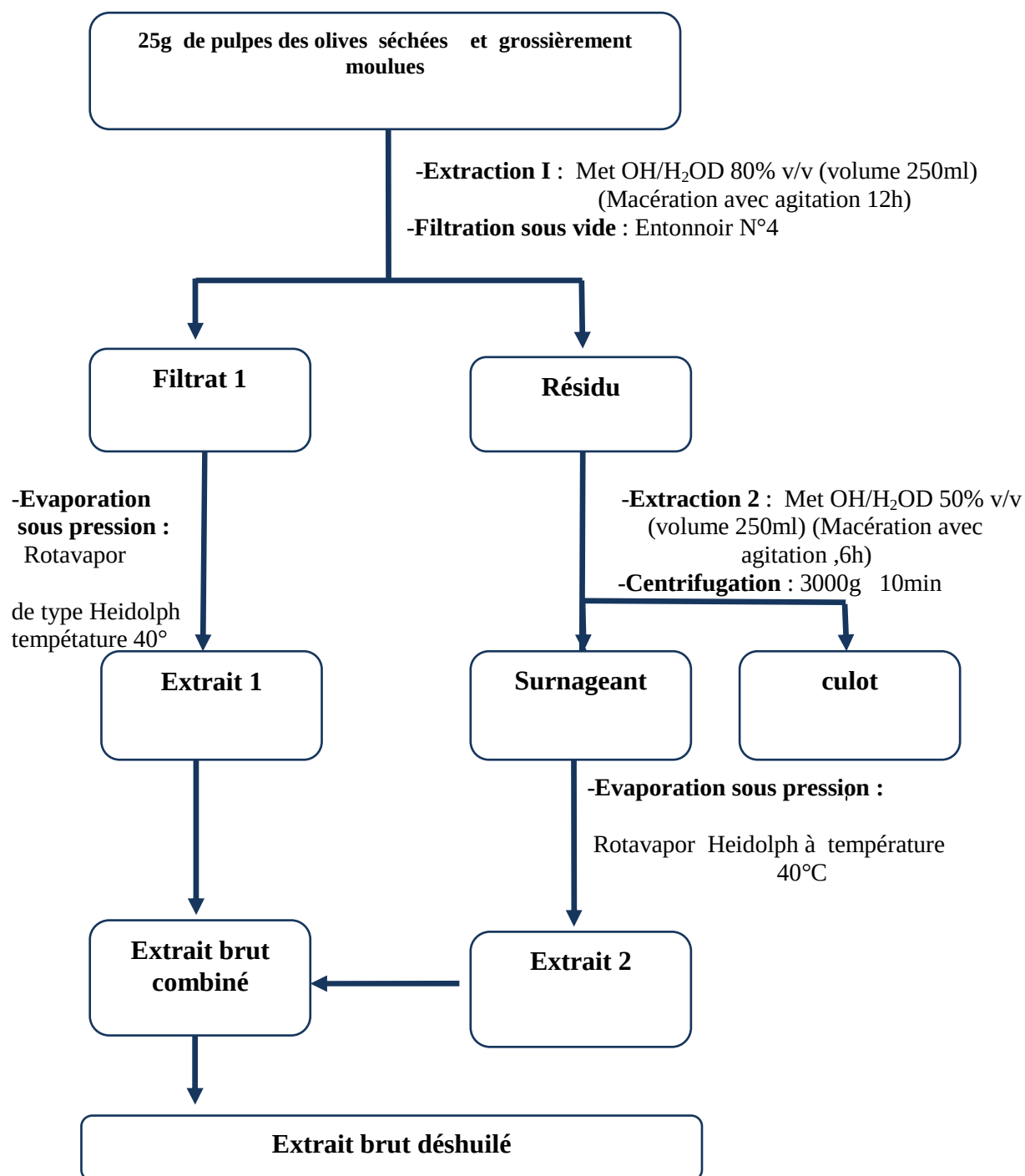


Figure 28 : Schéma qui représente la procédure suivie pour l'extraction des polyphénols d'olive.

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 par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrite en 1965 par Singleton et Rossi. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006 ; Ghazi et Sahraoui, 2005).

Les polyphénols (PP) ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2007 par Li et ses collaborateurs. 200 µl d'extrait végétal dilué est mélangé avec 1 ml de réactif de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois dans de l'eau distillée. Après 4 minutes, 800 µl de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à concentration de 7,5g/l sont ajoutés. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0-250 µg/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 détermination de la teneur en flavonoïdes des extraits de pulpes d'olive est effectuée par la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (Djeridane, *et al.*, 2006 ; Bahorum T., 1997). Brièvement, un millilitre d'extrait dilué dans le méthanol, ainsi que le flavonoïde standard la rutine aussi préparé dans du méthanol est ajouté à 1ml de $AlCl_3$ (Solution méthanolique de 2%) . Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée par la routine à différentes concentrations (0-10 µg/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.

Pour caractériser les deux extraits VB et VK de pulpe d'olive, une CCM a été utilisée. Dans un premier temps, des plaques pour CCM à base de silice d'une épaisseur de 0,25 mm ont été préparées par étalement de 5g de silice dans 10 ml de l'eau sur une plaque de 20x20 cm (figure 29). Après activation des couches durant 10 minutes du front de migration (15cm), les témoins ou standards (Oleuropein, Tyrosol, Rutine, Quercitine, Catéchine, Vanilline, Acide gallique) de concentration de 5mg/ml, les échantillons concentrés 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). Après développement, les plaques sont séchées sous hotte, puis visualisées par deux révélateurs. Le bleu de Prusse 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 $K_3Fe(CN)_6$, 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 (H_2SO_4) préparée de la manière suivante : 1g vanilline dans 100ml d'une solution de 20% de l'acide sulfurique dilué dans l'éthanol. Après pulvérisation de la solution préparée sur les plaques CCM il est nécessaire de les chauffer à l'étuve à une température de 100° pendant 10-15min.

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

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

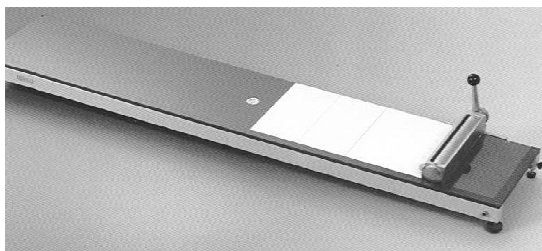


Figure 29: Instrument pour la production manuel des plaque de silice de CCM.

I-2-4. Activité antioxydante *in vitro*

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de polyphénols de pulpes d'olive pour les deux variété étudiées, trois test *in vitro* ont été utilisés pour (le test de DPPH, du bêta carotène/ acide linoléique et du pouvoir réducteur) .

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

Le test DPPH, qui utilise une réaction d'oxydoréduction avec le 2,2-diphényl-1-pikrylhydrazyl radicale, a été utilisé pour déterminer la capacité anti-oxydante des extraits.

Le radical a une couleur violette en raison de l'électron non apparié d'azote et, après réaction avec l'atome d'oxygène d'un piègeur de radicaux de la réduction de DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazin) est formé, qui est jaune (Villano, *et al.*, 2007). Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou un extrait de plante peut être déterminée (Cristina, P., 2009; Molyneux, P., 2004).

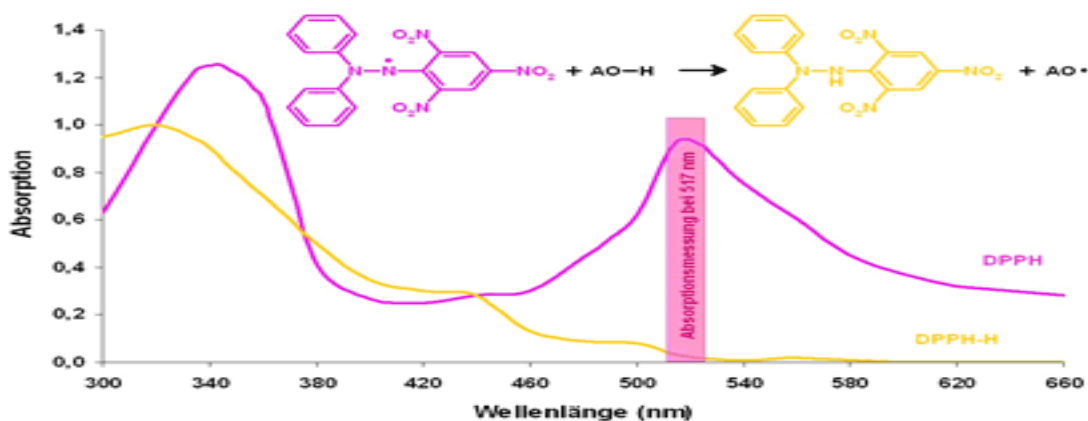


Figure 30 : Principe du test de DPPH.

Dans notre étude on a suivi la procédure faite par (Kartal *et al.*, 2007) comme elle est décrite ici, 50 µl de chaque extrait (VB, VK) 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 (10 mg/ml), et le contrôle sont ajoutées à 1950 µl d'une solution méthanolique du DPPH ($6,086 \times 10^{-5}$ mole/l). Ce mélange a été incubé 30 minutes, puis on a mesuré l'absorbance à 517 nm. Les résultats sont exprimés comme étant le pourcentage de l'activité anti radicalaire.

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

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

La réalisation de la cinétique de cette activité a permis de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC_{50}); la valeur de IC_{50} la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur de IC_{50} est exprimée en $\mu\text{g. ml}^{-1}$ (3 répétitions pour chaque concentration).

I-2-4-2. Le test de blanchissement ou de décoloration du bêta-carotène

(Système β -crotène /Acide linoléique)

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui

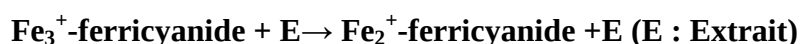
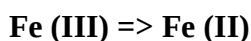
est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β carotène.

Dans ce test, (Barros *et al.*, 2007) on a préparé une émulsion composée de 0,5mg de la β -carotène, 1ml chloroforme, 25 μ l acide linoléique, 200mg Tween 20 et 100ml eau distillée saturée en oxygène. 2,5ml de cette émulsion, on ajoute 0,5ml des extraits EB et EK, standards ou contrôles positifs BHT et Rutine sont incubés 2 heures à 50 °C dans un bain-marie. L'absorbance à T_0 est mesurée dès l'ajout de l'émulsion sur l'échantillon à 490nm, puis on lit l'absorbance à chaque fois avec un intervalle de 20 min, le blanc utilisé est sans β carotène. Finalement on calcule le pourcentage de l'inhibition de la peroxydation lipidique IPL.

$$\% \text{ IPL} = \beta \text{ carotène après 2h} / \beta \text{ carotène initial} \times 100$$

I-2-4-3. le test du pouvoir réducteur ou (potentiel réducteur)

Le pouvoir réducteur des échantillons a été déterminée selon le procédé d'Oyaizu, 1986 dont le principe de ce test est basé sur la réaction chimique suivante :



L'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 700 nm. Plus grande est l'absorbance plus grand est le pouvoir réducteur. On procède à la méthode d'Oyaizu et ces collaborateurs, on ajoute 1,25ml du tampon phosphate saline PBS (0,2M, pH 6,6) à 0,5ml d'extrait des variétés VB, VK et les standards BHT et Rutine, et 1,25ml du ferricyanide $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 %. Ce mélange est incubé 30 min à 50 °C, après incubation on additionne 1,25ml de trichloracétique acide TCA 10% pour faire une centrifugation 10 minutes 1000g.

Le surnageant de volume 1,25ml avec 1,25ml de l'eau distillée et 0,5ml de FeCl_3 0,1% sont mélangés, l'absorbance est lue à 700nm, contre un blanc sans l'antioxydant, les résultats sont traités statiquement. Les EC_{50} sont calculés à partir du graphe.

I-2-5. Activité anticoagulante *in vitro*

L'activité anticoagulante de deux extraits polyphénoliques de pulpe d'olive a été évaluée *in vitro* vis-à-vis des deux voies de la coagulation (la voie endogène et la voie exogène) sur un pool des plasmas normaux déplaquettés et à l'aide de deux tests globaux chronométriques ; le temps du chépaline-kaolin (TCK) et le temps de Quick (TQ).

Le pool plasmatique pauvre en plaquette est un mélange de plasmas déplaquetés de 10 jeunes adultes comme volontaires sains non traités, dont les TCK et les TQ sont normaux et comparables. Le sang de chaque volontaire est prélevé par ponction veineuse dans un tube en plastique sur une solution anticoagulante de citrate de sodium à 3,2 % et à raison de 1 volume pour 9 volumes du sang (1 : 9, v/v). Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm pour obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Le plasma standard obtenu est conservé à basse température (-10°C) jusqu'à son utilisation (Athukorala, *et al.*, 2007).

I-2-5-1. Temps de Quick ou taux de prothrombine (TP)

Le test de Temps de Quick (TQ) permet une exploration de la voie extrinsèque de la coagulation. Le TQ, converti en "taux de prothrombine" (TP) permet d'évaluer l'activité des facteurs du complexe prothrombinique en référence à un plasma normal à 100%.

Cet examen consiste à mesurer le temps que met à se former un caillot de fibrine à 37°C lorsqu'on ajoute dans le plasma un excès de thromboplastine ou facteur tissulaire en présence de calcium. Normalement le caillot se forme en 12 à 13 sec ce qui représente le temps de Quick. Le TQ explore les facteurs de la voie exogène de la coagulation: facteur VII, facteur X, facteur V, facteur II, fibrinogène (Caquet, R., 2004).

Un temps de coagulation allongé par rapport à celui du contrôle négatif explique que l'échantillon exerce un effet anticoagulant vis-à-vis de cette voie de coagulation.

L'effet des polyphénols d'olive sur la voie exogène de la coagulation a été évalué selon le protocole décrit par Athukorala et ses collaborateurs avec modification (Athukorala, *et al.*, 2007). Dans un premiers temps, nous avons déterminé l'effet du temps d'incubation des extraits phénoliques avec le plasma sur leur pouvoir anticoagulant, pour cela 50 µl des extraits et des standards (Oleuropéine, Tyrosol), dilués sont additionnées à 90µl du plasma standard qui est ensuite incubé à 37°C° durant des temps différents (1, 5, 10 et 15 minutes). Après l'incubation, la coagulation a été déclenchée par l'addition de 200µl de thromboplastine préincubé à 37°C° pendant 15 minutes, puis le mélange constitué de 100µl Plasma et 50 µl Extrait/Standard (Oleuropéine, Tyrosol), a des volumes différents (10, 20, 50 et 100) est incubé à 37°C a un temps optimal d'incubation de 15 minutes,

pour étudier l'effet de volume d'extrait sur l'effet anticoagulant. et le temps qui s'écoule jusqu'à la formation du caillot fibrineux est alors mesuré automatiquement à l'aide du coagulomètre de type Biomérieux, les résultats sont exprimés par le temps de coagulation en seconde (s).

I-2-5-2. Temps de céphaline Kaolin (TCK)

Cet examen consiste à activer la voie intrinsèque de la coagulation par différentes substances : le Kaolin (TCK = Temps de Céphaline Kaolin), ou plus souvent la silice micronisée ou l'acide ellagique. Dans ce test, la céphaline est un phospholipide qui remplace les plaquettes. Le TCA n'est donc pas modifié en cas de thrombopénie ou de thrombopathie. Chez l'adulte, la valeur normale moyenne du TCK est de 30 à 34 sec habituellement. Un laboratoire doit donc toujours rendre un temps témoin pour permettre l'interprétation du test.

Pour que le Temps de Céphaline Activé soit normal, il faut que les facteurs de coagulation de la voie intrinsèque soient normaux : facteur du système contact (facteur XII et XI, kininogène de haut poids moléculaire, prékallicréine), complexe anti hémophilique (facteur IX, facteur VIII), complexe de la prothrombinase (facteur X, facteur V) prothrombine (facteur II), fibrinogène (facteur I). à l'exception des plaquettes. La mesure du TCA est utilisée principalement pour la surveillance des traitements par l'héparine.

Le réactif BIO CK permet la recalcification du plasma en présence d'une quantité standardisée de céphaline (substitut des plaquettes) et d'un activateur du facteur XII (Kaolin). Le kaolin présente le double avantage d'une lecture aisée et d'un temps de lecture plus court

La procédure suivie dans la réalisation de ce test est celle pratiquée par Athukorala et ses collaborateurs avec modification. Le mélange 100µl Plasma +50 µl Extrait/Standard (Oleuropéine, Tyrosol et Héparine), est incubé à 37°C à 15 minutes, puis on ajoute 100µl du réactif le céphaline, on laisse le mélange 3 minutes, suivi d'une addition de 100µl de CaCl_2 pour une reclassification du plasma. Ainsi le temps d'incubation est mesuré à l'aide d'un coagulomètre de type Biomérieux, les résultats sont exprimés par le temps de coagulation en seconde (s).

I-2-6. Analyse statistique

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2007, 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.

II. Résultats et discussion

II-1. caractérisation pomologique des olives

II-1-1. Caractérisation physique des variétés d'olive

La caractérisation pomologique 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

Tableau 3: Caractérisation des olives des variétés Bouchouk et Khanfes d'origine de Sétif.

Variété D'olive	Couleur et Forme	Poids moyen (g)	Longueur (cm)	Largeur (cm)
Variété Bouchouk (VB)	Noire, Arrondie qui se termine par une épine	4,27±0,36 ^a	2,61±0,07 ^a	2,50±0,41 ^a
Variété Khanfes (VK)	Noire, Ovoïde allongée	4,78±1,06 ^a	2,86±0,03 ^a	2,30±0,93 ^a

^a: La moyenne des résultats réalisés sur un échantillon de 50 fruits d'olive ±SD.

Les deux variétés ou cultivars d'olive Bouchouk (VB) et Khanfes (VK) sont noirs à maturité, avec une légère différence morphologique. L'olive de la variété Khanfes VK est caractérisée par un poids de 4,78g supérieur à celui de la variété Bouchouk (4,27g). Concernant la longueur, la VK avec une longueur de 2,86 cm supérieur à celle d'olive de VB (2,61cm), à l'opposé la VB présente la largeur la plus élevée (2,50 cm) par rapport à la VK (2,30 cm). Ces différences entre le poids, la longueur et la largeur qui paraissent faibles entre les deux variétés d'olive sont considérées comme significatives selon l'analyse statistique au seuil de 5%. D'après la classification de Del Rio et Caballero (1998), les variétés VB et VK appartiennent à la catégorie des variétés d'olive dont le fruit est de poids moyen entre 4 et 6 g. Les deux variétés algériennes VB et VK sont caractérisées par un poids moyens de fruit d'olives élevé par rapport aux deux principales variétés de l'oléiculture tunisienne, Chetoui et Chemlali Sfax qui ont des poids moyens de fruit de l'ordre de 2g et de 1g respectivement (Lazzez *et al.*, 2008).

II-1-2. Taux d'humidité

Les taux d'humidité (H%) et de matière sèche (MS%) sont calculés et rapportés dans les histogrammes ci-dessous (figure 31).

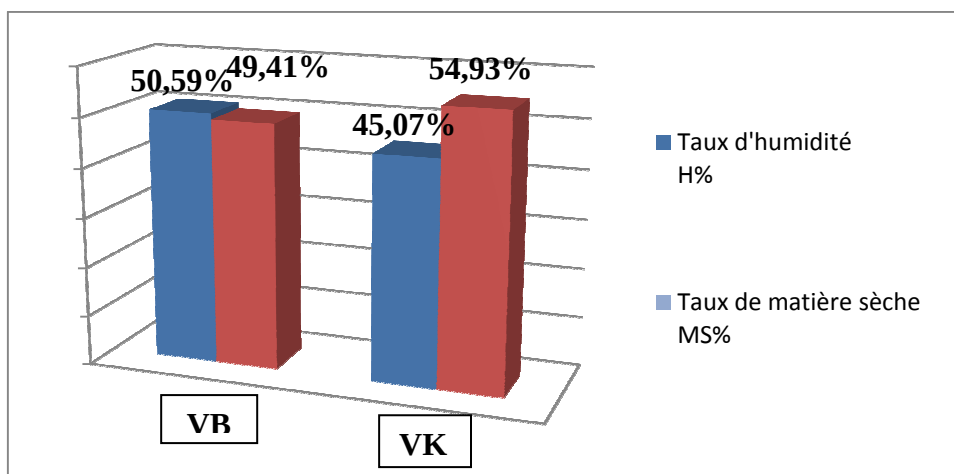


Figure 31 : Taux d'humidité et de matière sèche des variété d'olive Bouchouk et Khanfes.

Au regard des résultats obtenus, il ressort que l'olive de la VB est constituée de presque la moitié de son poids d'eau (50,59%) alors que l'autre moitié c'est de la matière sèche (49,41%). L'olive de VK est caractérisée par un taux d'humidité moindre de l'ordre de 45,07%, et par conséquent un pourcentage de matière sèche MS% supérieur de 54,93%.

Ces résultats pouvant être comparés avec des données de différents travaux réalisés dans le même contexte, la caractérisation des olives selon leurs taux d'humidité, par exemple les olives de la Grèce présentent un taux d'humidité de 48%, inférieur à celui de VB et supérieur à celui de la VK (Boskou *et al.*, 2006). Les olives de table du Portugal « alcaparras » sont caractérisées par une teneur très élevée en eau entre 70-72% (Sousa, *et al.*, 2011 ; Malheiro *et al.*, 2012). Un taux d'humidité élevé constitue un problème majeur au sein du secteur oléicole lors de l'extraction d'huile les eaux résiduelles de végétation de l'olive (margines 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 appel 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

L'extraction des huiles des olives des deux variétés a permis d'obtenir un produit de couleur jaunâtre très clair pour la VK et peu turbide pour la VB (figure 32). L'odeur des deux huiles obtenues est piquante et caractéristique d'une huile d'olive traditionnelle ou industrielle. La moyenne du rendement en huile (donc de la matière grasse) des deux variétés d'olive varie entre 48,75% pour VK et 54% de la VB (figure 33). Ainsi, il apparaît que VB est plus riche en huile par rapport à la VK.



Figure 32 : Huile de pulpe d'olive VB, VK

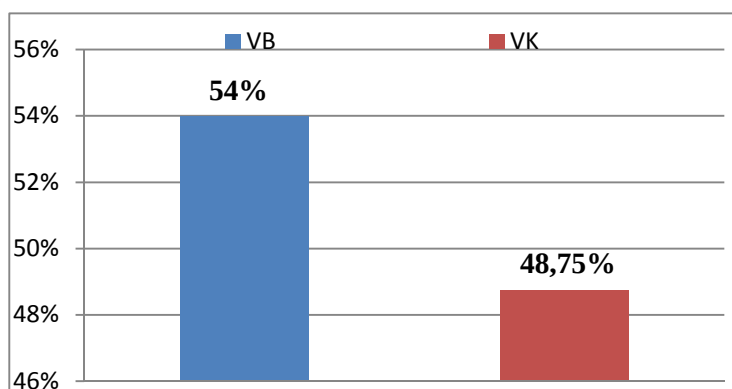


Figure 33 : Teneur en matière grasse MG% des olives VB, VK

D'après différents auteurs qui ont étudiés les teneurs en huile de différentes variétés d'olive, il a été établi que les rendements varient dans une large gamme de 58% pour les variétés italiennes selon (Ryan, 1998), et entre 19% à 71% pour des variétés d'olive grecque (Boskou *et al.*, 2006). Ces grandes fluctuations dans les rendements d'huile entre les variétés et même au sein de la même variété peuvent être expliquées par l'influence des facteurs climatiques, pédologiques et le site géographique.

Romero et ses collaborateurs ont proposé en 2002 une classification variétale selon le contenu en matière grasse des olives, une variété avec un rendement supérieur à 46% est considérée comme variété à rendement élevé, donc cette caractéristique rend la variété beaucoup plus recherchée pour l'huile et non pas pour la préparation d'olive de table. Lorsque le rendement est compris entre 38 et 46% ou inférieur à 46% la variété possède un rendement moyen ou faible respectivement (Romero, *et al.*, 2002). Par projection des résultats de notre étude sur ce modèle de classification, les deux variétés sont considérées

comme variétés à un rendement élevé en huile. 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).

A la lumière des résultats obtenus à partir de cet étude et ceux rapportées en littérature, 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). Des fluctuations du pourcentage de pulpe, du poids moyen du fruit, de la teneur en huile par rapport à la matière fraîche et à la matière sèche en fonction de la variabilité des sites géographiques(Ryan et Robards,,1998; Boskou *et al.*,2006 ; Hannachi *et al.*,2006). Ainsi, chaque individu d'un même cultivar montre des potentialités qui se répercutent sur les caractères pomologiques et technologiques des fruits d'olive (Hannachi *et al.*,2007).

II-1-4. Teneur en polyphénols dans l'huile

Le contenu en polyphénols dans l'huile d'olive est parmi les caractères pomologiques les plus importants, car cette caractérisation permet de faire une identification et /ou une distinction entre les différents variétés vue l'importance de ses composés de métabolites secondaires de la plante dans la stabilité et la protection des huiles contre l'auto-oxydation, et aussi ils sont responsables à la qualité nutritionnelle et aux bénéfices santé d'huile d'olive .

Dans le cas des huiles des variétés VB et VK les concentrations des polyphénols calculées à partir de la droite d'étalonnage de l'acide gallique sont de l'ordre de 6 µg EAG /ml et 4,375 µg EAG /ml d'extrait polaire respectivement. Ainsi , les pourcentages des polyphénols d'huile d'olive sont 0,107%. et 0,078%, ces résultats sont en conformité avec ceux d'Ollivier *et al.*,(2004)La teneur en polyphénols dans l'huile d'olive représente une fraction mineur inférieur ou égal à 2%.

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

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

L'extraction des polyphénols à partir du broyat de pulpe séchée d'olive a permis d'obtenir des extraits de couleur marron foncé, qui sont conservés au frais dans des flacons ombrés jusqu'à leur utilisation.

Le dosage des polyphénols dans les extraits de VB et VK 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 (figure 36). Les résultats obtenus 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 rutine pour établir la gamme d'étalonnage (figure 37). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de rutine par 100g de matière sèche (mg ER /100g MS).

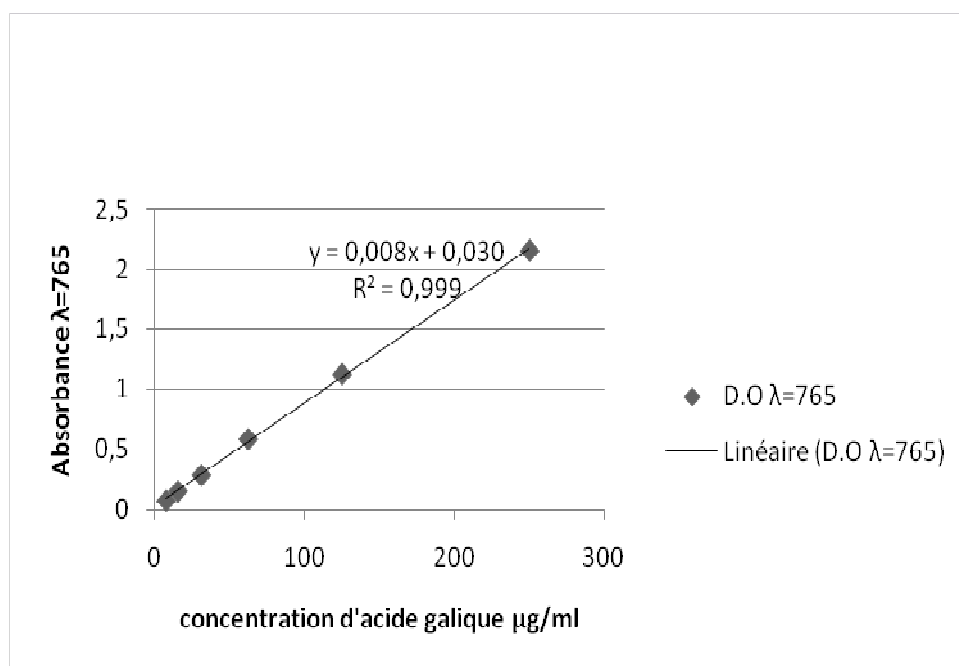


Figure 34: Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique (Moyenne $\pm$ SD de trois essais).

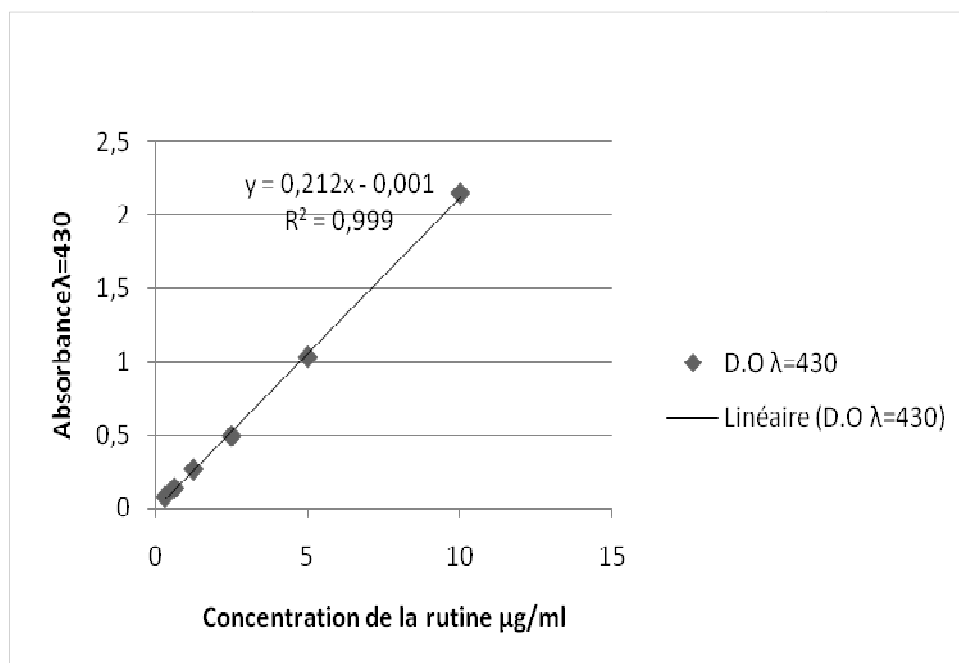


Figure 35: Droite d'étalonnage de la Rutine (Moyenne $\pm$ SD de trois essais).

A la lumière des résultats des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes rapportés dans le tableau 5 il ressort que les deux cultivars algériens d'olive sont riches en polyphénols et en flavonoïdes. En effet, les deux variétés possèdent des teneurs en polyphénol de l'ordre de 3,93g et 3,91g pour 100g de matière sèches d'olive des variétés VB et VK respectivement. Concernant les teneurs en flavonoïdes il apparaît que la VK possède un taux supérieur (422 mg ER /100g MS) par rapport à celui de la VB dont le taux est de 317 mg ER /100g MS. Le rapport flavonoïdes /polyphénols est de l'ordre de 8,07 % et 10,79% pour les variétés VB et la VK respectivement. Ces rapports permettent de dire que la variation des flavonoïdes n'est pas relative à celle des polyphénols, cela peut être expliqué par la prépondérance des polyphénols non flavonoïdiques (acides phénoliques, phénols, iridoïdes et ligstrosides ...).

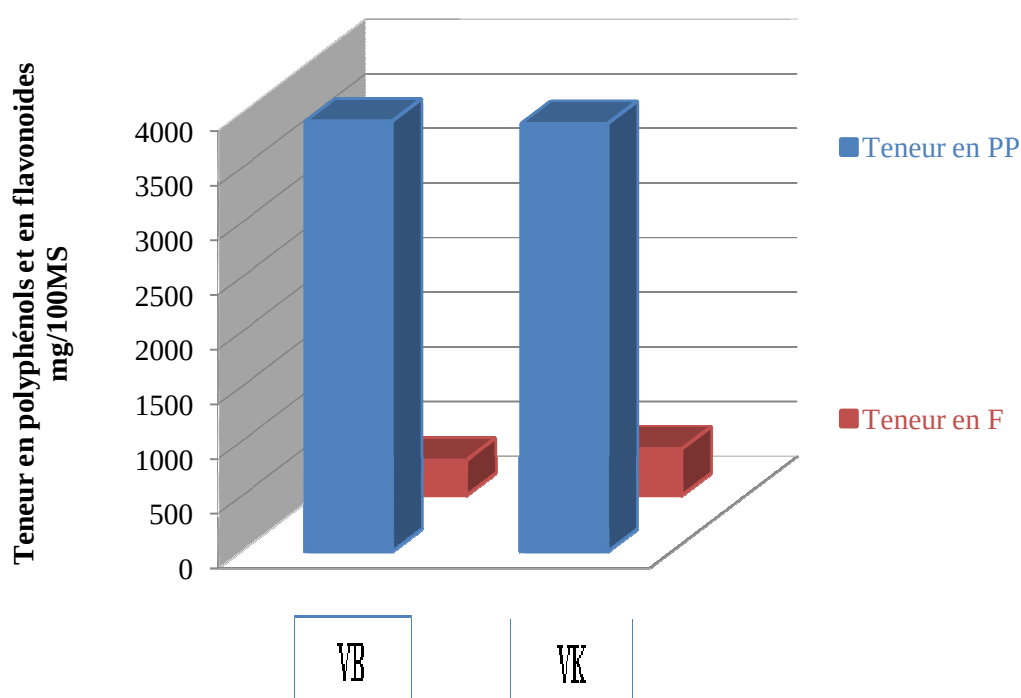


Figure 36 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits d'olive.

Plusieurs études se sont intéressées à la quantification des polyphénols dans les extraits d'olive du nord -ouest (olives Sigoise) dont le contenu varie entre 431,6 et 2288 mg/100g de matière sèche. La quantité en flavonoïdes varie entre 214 et 260 mg/100g de matière sèche (Benlarbi,2004). Une étude similaire réalisée par (Bisset, 2011) a montré que trois variétés d'olive de l'Est Algérien (Batna) 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 mg/100g des variétés Chemlali, Farhi, et Beskri respectivement. Par ailleurs, les variétés d'olive de Grèce et du Portugal sont caractérisées par des teneurs en polyphénols variant dans un intervalle de 82-171mg /100g de pulpe d'olive (Boskou *et al.*, 2006) et de 165,76 mg/Kg de poids frais d'olive (Malheiro *et al.*, 2011) respectivement. Au regard de ces données les extraits d'olive des variétés VB et VK peuvent être considérées comme 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). Le phénomène de la fermentation surtout lors des préparations des olives de dosage table aussi considéré comme un facteur inducteur d'une réduction du contenu phénolique de 32-58% expliquée par leur diffusion dans la saumure (Ben Othman *et al.*, 2009) avec une diminution des quantités de l'oleuropéine et de l'acide procatéchique et une augmentation en hydroxytyrosol et de l'acide caféique.

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.

II-2-2. Caractérisation qualitative des extraits

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

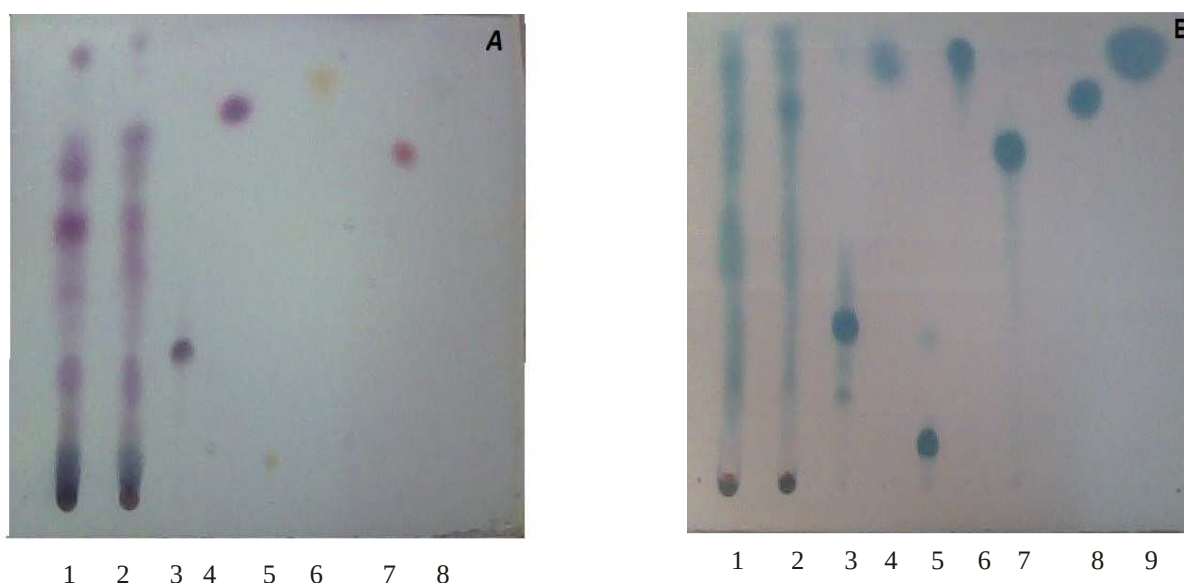


Figure 37: Profiles Chromatographiques des extraits polyphénoliques des variétés d'olive ; (VB) et (VK) dans un système de développement : CEF ,10 /40/ 10,v/v/v. La révélation chimique a été réalisée par La vanilline-acide sulfurique (A) et le bleu de Pruss (B).

-1- : VB, -2- : VK, -3- : Oleuropéine, -4- : Tyrosol, -5-Rutine, -6-Quercétine, -7-Catéchine, -8-Vanilline, -9- : Acide gallique.

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 et Standards	Révélation			
	Vanilline sulfurique		Bleu de Pruss	
	Spots	Rfs	Spots	Rfs
VB	1 bleu foncé	Ligne de dépôt	1 bleu	<u>0,148</u>
	2 bleu	<u>0,149</u>	2 bleu	<u>0,29</u>
	3 violet	0,223	3 bleu	<u>0,32</u>
	4 violet	<u>0,32</u>	4 bleu	<u>0,44</u>
	5 violet	0,447	5 bleu	<u>0,659</u>
	6 violet	<u>0,66</u>	6 bleu	<u>0,80</u>
	7 violet	0,791	7 bleu	<u>0,82</u>
	8 violet	<u>0,800</u>	8 bleu	<u>0,84</u>
	9 violet	<u>0,082</u>	9 bleu	<u>0,89</u>
	10 violet	<u>0,084</u>	10 bleu	<u>0,91</u>
	11 violet	0,953		
VK	1 bleu foncé	Ligne de dépôt	1 bleu	<u>0,148</u>
	2 bleu	<u>0,149</u>	2 bleu	<u>0,32</u>
	3 violet	0,223	3 bleu	<u>0,446</u>
	4 violet	<u>0,32</u>	4 bleu	<u>0,659</u>
	5 violet	0,40	5 bleu	<u>0,80</u>
	6 violet	0,52	6 bleu	<u>0,82</u>
	7 violet	<u>0,66</u>	7 bleu	<u>0,84</u>
	8 violet	<u>0,80</u>	8 bleu	<u>0,91</u>
	9 violet	<u>0,82</u>	9 bleu	<u>0,950</u>
	10 violet	<u>0,84</u>	10 bleu	<u>0,955</u>
	11 violet	0,955		
Oleuropéine	Bleu noir	<u>0,32</u>	bleu	<u>0,32</u>
Tyrosol	Violet	0,8	bleu	<u>0,8</u>
Rutine	Jaune vert	0,149	bleu	<u>0,149</u>
Quercétine	Jaune	0,84	bleu	<u>0,84</u>
Catéchine	Rouge orangé	<u>0,66</u>	bleu	<u>0,66</u>
Vanilline	Jaune vert Très clair	0,82	bleu	<u>0,82</u>
Acide gallique	-	-	bleu	<u>0,91</u>

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 la vanilline-acide sulfurique donnent des spots de différentes couleurs (bleu et violet), dont les rapports frontaux sont calculés. Ces taches correspondent selon leurs R_f à la rutine (0,149), l'oleuropeine (0,32), la catéchine (0,66), le tyrosol (0,8), la quercétine (0,82) et la vanilline (0,84).

Par ailleurs, 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 bleues. Cette coloration bleue est due à la complexion du $FeCl_3$ avec les ions ferreux résultants de l'oxydation du ferricyanide de potassium par les composés phénoliques (Price et Butler, 1977) et dans le même système de développement (CEF) donnent les mêmes spots mais de couleur bleue avec les mêmes constituants correspondant aux mêmes R_f , avec l'apparition de l'acide gallique, ce dernier qui n'a pas été visualisé en utilisant le révélateur de la vanilline-Acide sulfurique. Le chromatogramme obtenu montre que les deux extraits (VB et VK) sont riches en composés phénoliques. Ces résultats confirment ceux du dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu.

Ainsi, il ressort que les deux variétés possèdent une composition variée en polyphénols constitué de tyrosol et de l'oleuropéine (ligstroside majeur). Les flavonoïdes tels que la rutine, la catéchine, la quercétine et la vanilline, et un acide phénolique, l'acide gallique sont d'autres constituants pour des extraits d'olive.

Ces résultats concordent avec ceux de la littérature qui ont montré que les extraits polyphénoliques de l'olive sont caractérisés par la présence de l'oleuropéine et le tyrosol (Boskou, *et al.*, 2005 ; Bianco, *et al.*, 2006). Ces polyphénols identifiés constituent avec l'hydroxytyrosol les polyphénols les plus prépondérants dans l'olive ou l'oleuropéine représente entre 5-10%, le tyrosol 0,3% des polyphénols des extraits aqueux de pulpe d'olive (Soni, 2006). Ces composés 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 trois tests *in vitro*, le DPPH[•], le blanchissement de la bêta-carotène et le potentiel réducteur.

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

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité anti-radicalaire 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) significative ($p < 0,05$) dose-dépendante (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). 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 VB et VK, de BHT et de la rutine (Références ou standards).

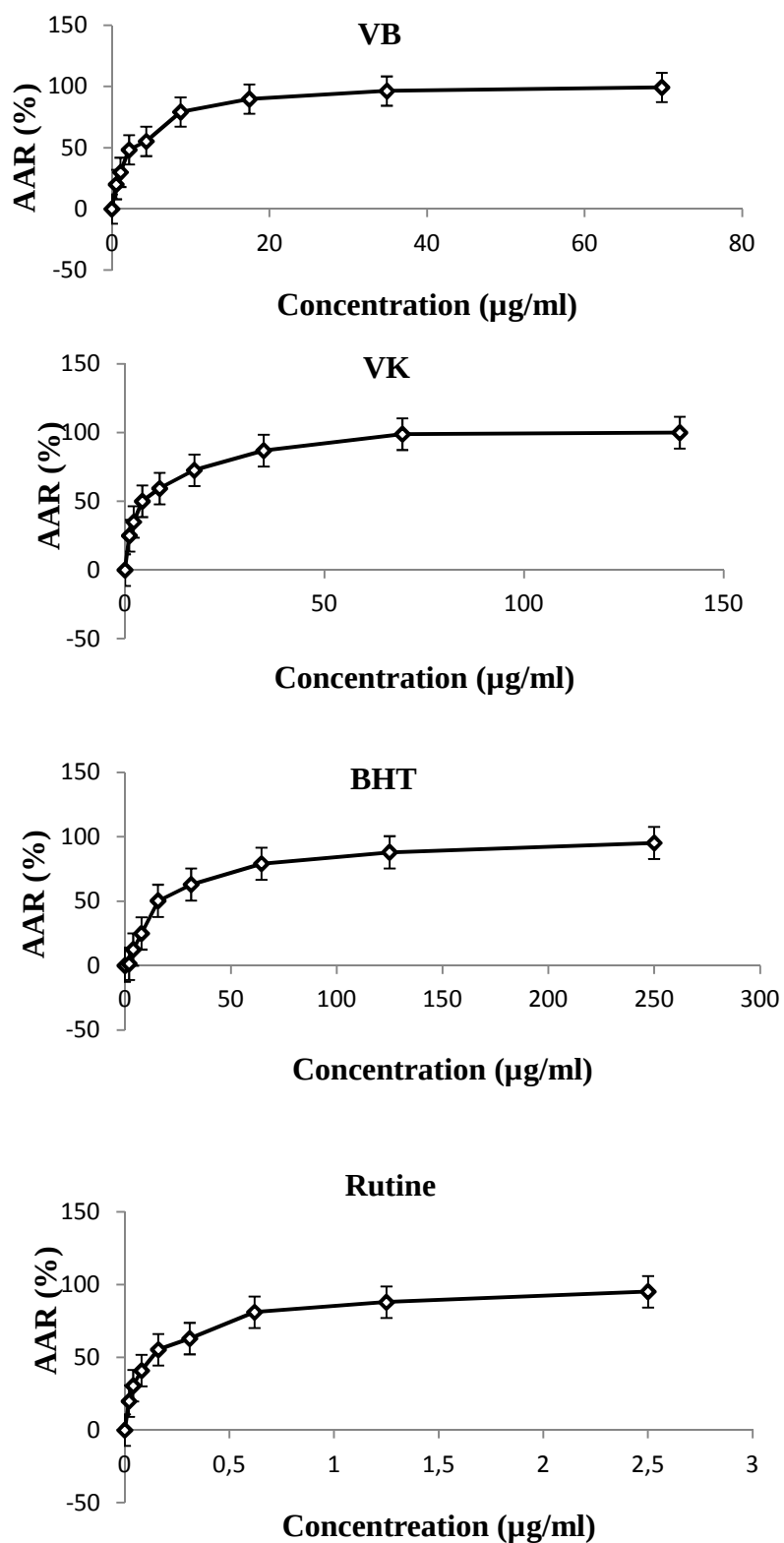


Figure 38 : Activité anti-radicalaire en pourcentage (AAR%) des extraits polyphénoliques des variétés d'olive Bouchouk, Khanfes, et des standards BHT et Rutine (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

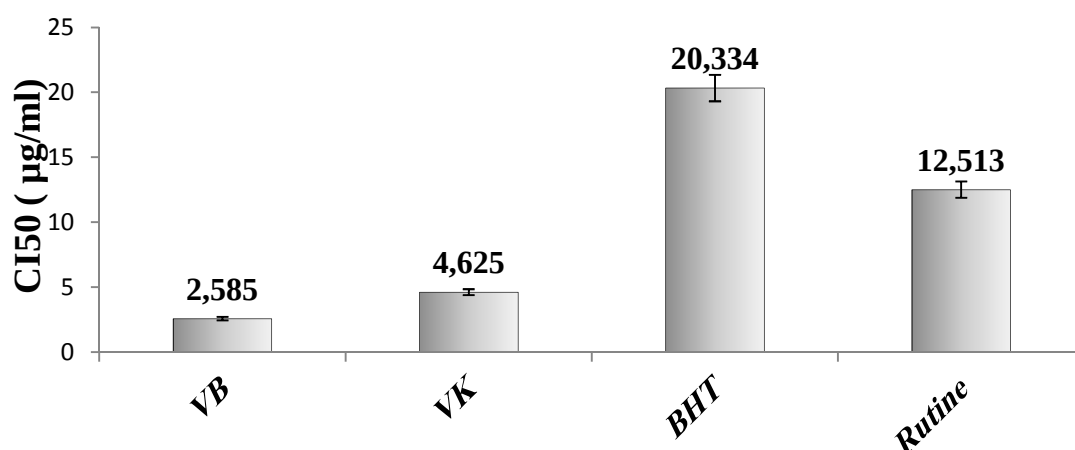


Figure 39 :Concentrations responsables à 50% d' inhibition du radical DPPH[•] (CI₅₀).
(Chaque valeur représente la moyenne de deux essais ± SD).

Les résultats obtenus (figure 39) montrent que les deux variétés présentent des CI₅₀ de l'ordre de 2,585 ± 0,095 µg/ml et 4,625 ± 0,06 µg/ml pour les variétés VB et VK respectivement significativement inférieurs ($p < 0,05$) à celle de l'antioxydant naturel (la rutine) (CI₅₀ = 12,513 ± 0,09 µg/ml) et à celle de l'antioxydant synthétique (BHT) (CI₅₀ = 20,334 ± 0,109 µg/ml). Il apparaît ainsi que les deux variétés présentent l'activité antioxydante la plus élevée, dix fois et six fois supérieure à celle du BHT et de rutine pour l'extrait de la VB respectivement et pour l'extrait de la VK cet activité est supérieure cinq fois et trois fois à celle du BHT et de la rutine respectivement. Ces résultats permettent de classer les extraits par rapport aux standards selon leur pouvoir antioxydant par ordre décroissant (VB > VK > Rutine > BHT).

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 ± 1,29 µg/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 ± 64,31 µg/ml (Bisset, 2011).

Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par Pérez-Bonilla *et al* (2006) qui ont montré dans leurs travaux que l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine, et le tyrosol, trois polyphénols prépondérants dans l'olive possèdent une activité antioxydante vis-à-vis du DPPH[•] de l'ordre de 76,7 %, 20,4 %, et 3,7 %, respectivement. Ainsi, l'activité antioxydante de la VB et VK est probablement due en partie à la présence élevée des deux polyphénols (hydroxytyrosol et oleuropéine) alors que le faible effet anti-radicalaire du tyrosol peut s'interpréter soit parce que ce polyphénol est faiblement antioxydant, soit parce qu'il exerce son effet de façon synergétique avec d'autres polyphénols ou d'autres composés présents dans l'olive.

Les travaux sur l'activité antioxydante des extraits de pulpe d'olive brute par rapport aux huiles d'olive et aux olives de table (produits consommables des olives) sont peu traités par les chercheurs dans ce domaine. En 2006 Boskou et ses collaborateurs ont conclu que cinq variétés d'olives de tables de Grèce présentent des CI₅₀ de l'ordre de 30 - 587 µg/ml plus élevées et 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. Ces résultats sont confirmés par Ben Othman *et al.*, (2009), qui ont montré 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).

La détermination des coefficients de corrélation entre les CI₅₀ et le contenu en polyphénols, et en flavonoïdes a montré l'existence d'une corrélation négative très significative ($R^2 = -1$) pour les deux cas, cette relation inverse fait que les valeurs de CI₅₀ diminuent avec l'augmentation du contenu de polyphénols et de flavonoïdes, ce qui traduit par des activités antioxydantes très élevées qui peuvent atteindre le 100% de cette capacité anti-radicalaire. On outre, un très bon coefficient de corrélation entre les CI₅₀ et le rapport flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux ($R^2 = 0,9905$) est obtenu.

A travers la recherche bibliographique, de très grandes différences de points de vue sont notées à propos de cette corrélation. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les CI_{50} et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, à l'apposé d'autres études n'ont pas établie cette corrélation (Athamena, *et al.*, 2010; Mariod, *et al.*, 2010). Par ailleurs, il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (Heim, *et al.*, 2002) due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de Pinedo, *et al.*, 2007), ce qui peut expliquer en partie la faible activité antioxydante du tyrosol qui ne possède qu'un seul groupement hydroxyle (-OH) dans sa structure. Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Rodriguez-Bernaldo, *et al.*, 2009).

II-3-2. Test de blanchissement du β -carotène

La cinétique du blanchissement ou de décoloration de la β -carotène en présence et absence des deux extraits et des deux références (BHT et Rutine), ainsi que les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique (%IPL) sont présentés dans les figures (40) et (41) respectivement.

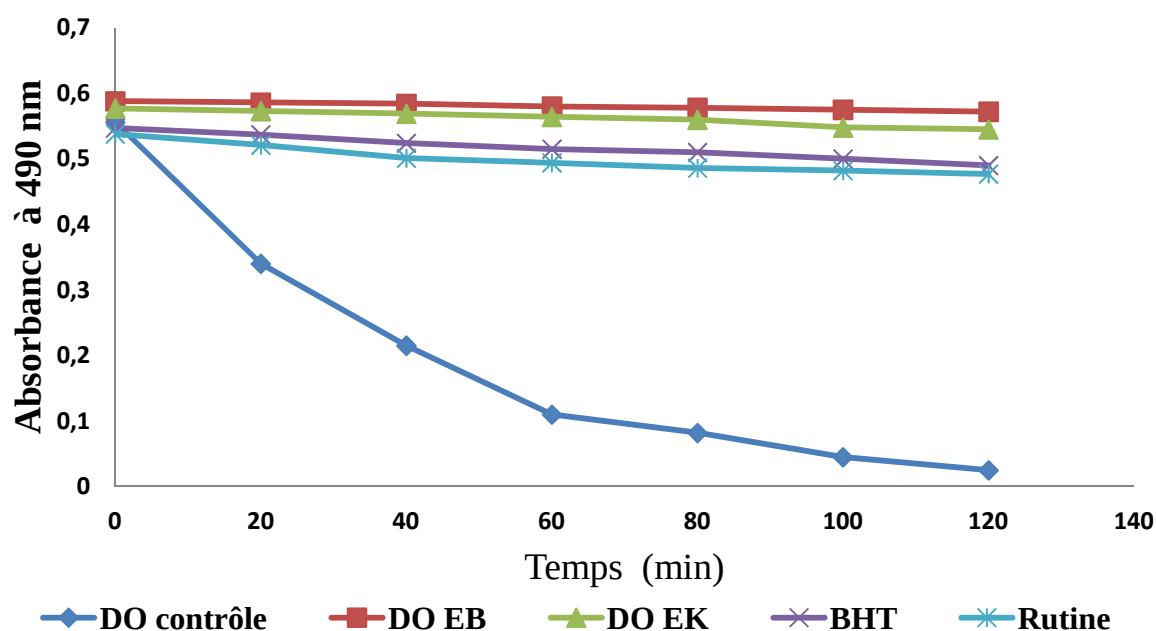


Figure 40 : Cinétique de blanchissement du bêta carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de pulpe d'olive VB et VK, du BHT et de la rutine fonction du temps (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais $\pm$ SD).

A partir des courbes de cinétique de blanchissement du β -carotène on remarque que les deux extraits VB et VK ainsi que le BHT et la rutine exercent un grand effet préventif significatif ($p < 0,05$) contre l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes, en comparaison avec le contrôle négatif qui a produit une décoloration et une diminution rapide de l'absorbance durant 120 minutes d'incubation.

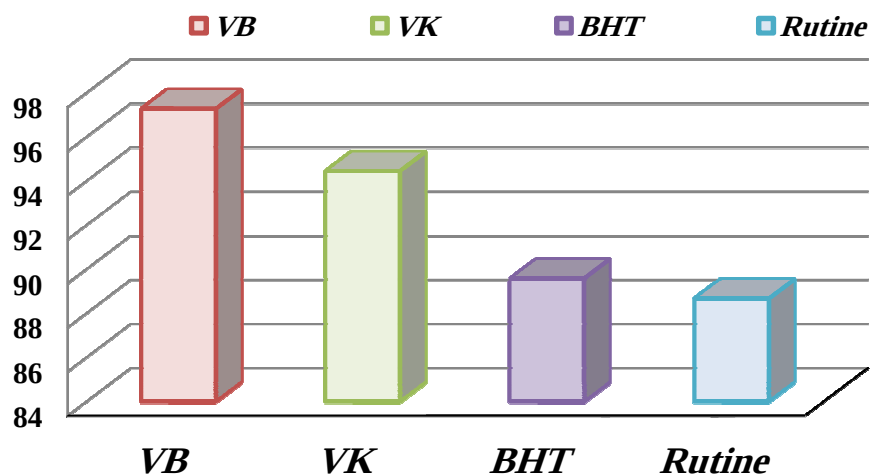


Figure 41 : Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique (%IPL) par les extraits d'olive VB et VK, les standards BHT et Rutine (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

D'après les pourcentages de l'inhibition de la peroxydation lipidique (figure 43), il apparait évident que les extraits des variétés VB et VK ont un très grand effet inhibiteur vis-à-vis de radical peroxyde avec des pourcentages de l'ordre de 97,27 %et 94,45% respectivement, supérieur à celui du BHT(89,57%) et de la rutine (88,66%).

Le pouvoir antioxydant de l' extraits VB est légèrement superieur à celui de la variété Chemlali (IPL=96,75%) et plus élevé à ceux des variétés Farhi (IPL=94,82%) Beskri (IPL=87,3%). Concernant l'extrait VK ce pouvoir est légèrement inferieur à ceux des variétés Chemlali et Farhi, et supérieur à celui de Beskri (Bisset,2011).

L'oleuropéine et le tyrosol ne possèdent pas d'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique dans le système β -carotène /Acide linoléique, ils partagent presque la même cinétique de blanchissement du β -carotène avec celle du contrôle négatif. Ce résultat est probablement expliqué par la grande spécificité de ce test pour les composés apolaires donc lipophiles (Gachkar *et al.*,2007). Ainsi l'extrait qui contient la quantité la plus élevée en polyphénols ou d'autres composés hydrophobes est le plus actif.

Par contre l'apparition de l'activité antioxydante significative de l'oleuropéine et du tyrosol dans le test de DPPH car ce test est indépendant de la polarité des échantillons (Kartal *et al.*,2007) ce qui confirme en grand partie que chaque polyphénol répond différemment dans l'essai mis en œuvre.

Des études récentes ont mis en évidence que la polarité et l'hydrophobicité des agents antioxydants sont deux facteurs importants dans les systèmes de biomembranes (Terpinc, *et al.*,2009). C'est la raison par laquelle beaucoup de chercheurs de l'activité antioxydante choisissent le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplés à celle du β -carotène comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria, *et al.*,2006).

A la lumière de ces résultats, les extraits polyphénoliques de l'olive ont un effet inhibiteur contre la peroxydation lipidique par clivage des réactions de peroxydation lipidique en chaînes par piégeage du radical peroxy LOH , par conséquent ils constituent une source prometteuse de potentiel thérapeutique .

II-3-3. Test du potentiel réducteur

L'activité antioxydante des extraits des deux variétés d'olive par le test de potentiel réducteur a révélé que ces derniers exercent une importante activité dose dépendante (figure 42).

Le potentiel réducteur des extraits et des standards (BHT et rutine) est exprimé par les valeurs des concentrations effectives à 50% (CE_{50})qui correspondent à la concentration des polyphénols nécessaire pour donner une absorbance égale à 0,5 à 700 nm Les CE_{50} des extraits ,du BHT et de la rutine rapportés sur la figure 45 montre que que les deux extraits d'olive VB et VK présentent un potentiel réducteur efficace avec des CE_{50} de 5,055 μ g/ml, 6,110 μ g/ml respectivement. Ce pouvoir réducteur reste supérieure à ceux du BHT et de la rutine dont les CE_{50} sont de 8,667 μ g/ml, 10,828 μ g/ml respectivement.

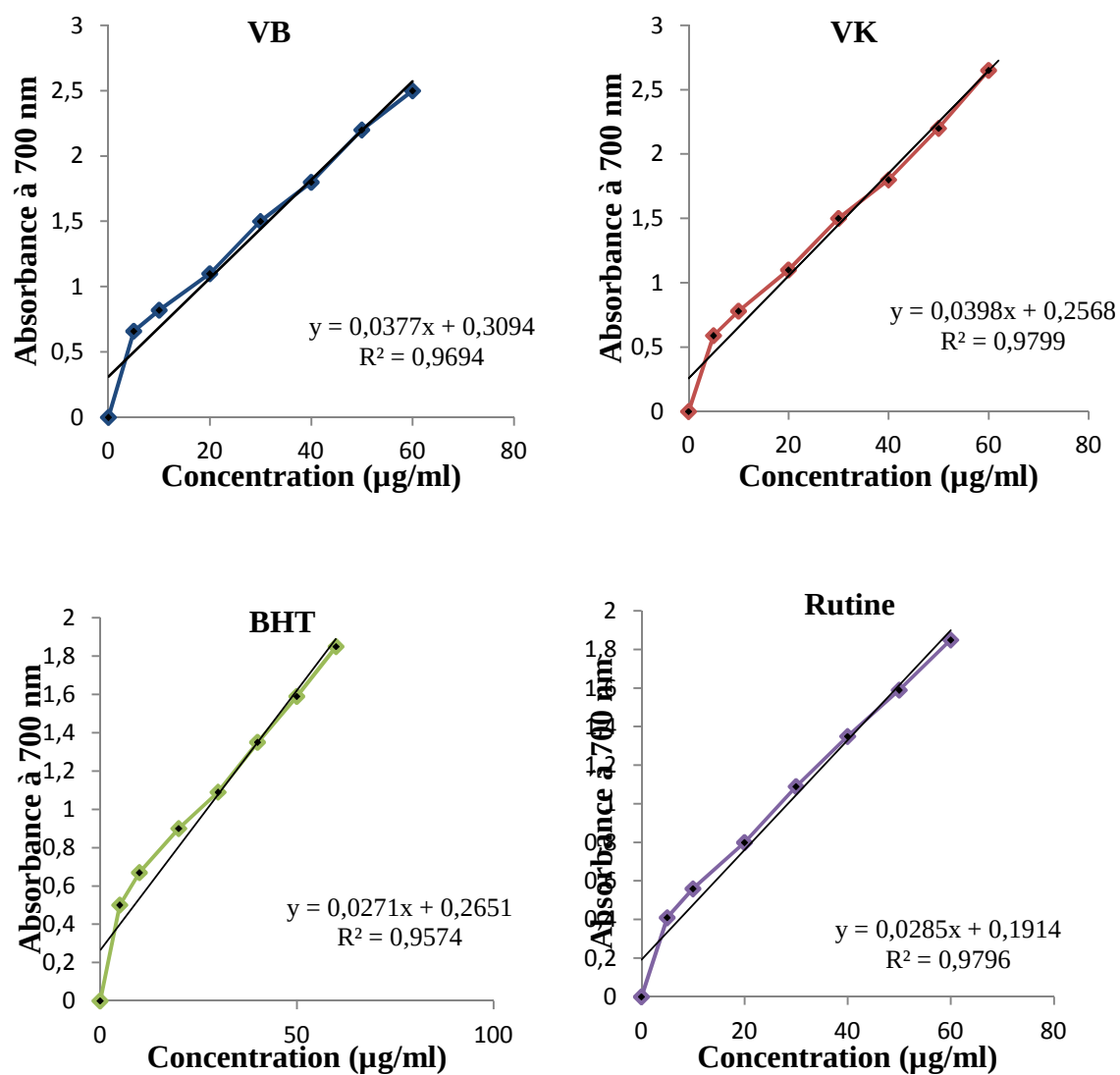


Figure 42: Pouvoir réducteur des extraits de pulpe des variétés d'olive VB, VK, du BHT et de la rutine (Les valeurs sont la moyenne de deux essais $\pm$ SD).

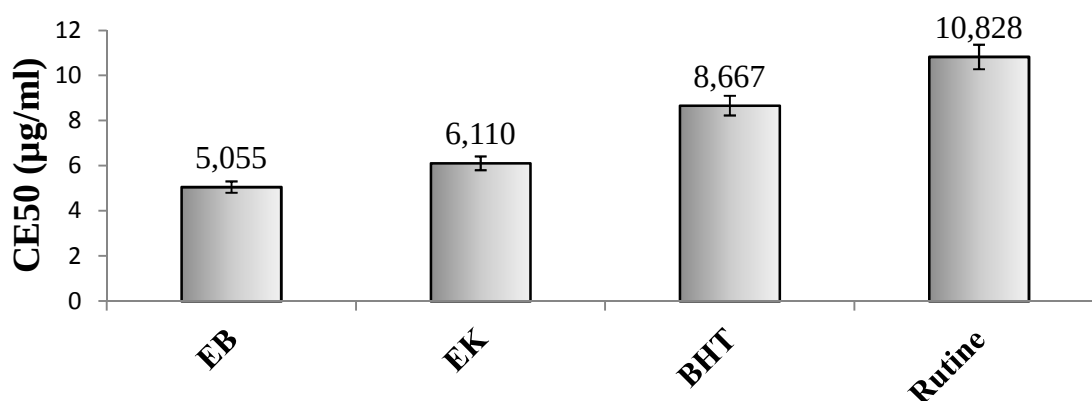


Figure 43:Concentrations effectrices (CE_{50}) responsables du pouvoir réducteur des extraits d'olive VB et VK, les standards BHT et Rutine.(Chaque valeur représente la moyenne de deux essais $\pm$ SD).

La comparaison du pouvoir réducteur de ces deux variétés montre qu'elles possèdent un effet très élevé par rapport à d'autres variétés de la région Trás-Os-Montes (Nord-est du Portugal) dont les CE_{50} varient entre 420 $\mu\text{g/ml}$ et $2,41 \times 10^5 \mu\text{g/ml}$, cette variabilité due aux différents solvants et températures d'extraction (Sousa, *et al.*, 2008 ; Malheiro, *et al.*, 2011). Il aussi supérieur par rapport à d'autres variétés Algériennes (Chemlali, Farhi et Beskri) cultivées dans la wilaya de Batna dont les CE_{50} varient entre 7,16 $\mu\text{g/ml}$ et 9,22 $\mu\text{g/ml}$, (Bisset, 2011).

L'oleuropéine un polyphénols majoritaire de l'olive, présente une activité antioxydante plus élevée ($CE_{50}=5,88 \mu\text{g/ml}$) que celle de BHT($CE_{50}= 8,667 \mu\text{g/ml}$) tandis que le tyrosol semble moins avec une CE_{50} de 176,25 $\mu\text{g/ml}$ comme dans le test de DPPH (Bisset, 2011).

En générale, le potentiel réducteur des extraits végétaux est du à la présence de molécules capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres et les convertir en produits stables, terminant de ce fait les réaction en chaines parmi lesquelles les polyphénols (Ferreira *et al.*, 2007), ce qui explique le potentiel réducteur des extraits d'olive riches en polyphénols.

A la lumière de tous les résultats obtenus concernant l'activité antioxydante des extraits des deux variétés d'olive étudiées évaluée *in vitro* par les trois tests dans un système chimique, soit dans des milieux réactionnels polaires (DPPH et du potentiel réducteur), soit apolaire (Décoloration de la β -carotène), il ressort que les deux extraits d'olive de différents cultivars possèdent un pouvoir antioxydant important plus élevé à celle du BHT antioxydant synthétique utilisé dans l'industrie agroalimentaire comme conservateur des aliments, et cela à travers leur composition quantitative et qualitative surtout en polyphénols qui confèrent à l'olive (huile d'olive ou olive de table) un potentiel thérapeutique notable pour la lutte contre les maladies d'origine liées au stress oxydatif.

II-4. Activité anticoagulante

L'ensemble des activités anticoagulantes des extraits d'olive de différents cultivars a été évalué *in vitro* vis-à-vis de la voie exogène et la voie endogène de la coagulation à l'aide de deux tests chronométriques généraux qui explorent la coagulation d'une manière non spécifique, le TQ et le TCK respectivement.

II-4-1. Test de temps de Quick (TQ)

On a utilisé ce test classique communément connu sous le nom de taux de prothrombine (TP), qui explore la voie extrinsèque (VII) et la voie commune (X, V, II, fibrinogène) de la coagulation sanguine où le facteur tissulaire (thromboplastine) est le déclencheur de cette voie (Tripodi, 2009). Le réactif contient le polybrène (inhibiteur de l'héparine), ce qui explique que le TQ n'est pas allongé par un traitement par héparine, de ce fait elle n'a pas été utilisée comme anticoagulant standard.

Dans le but de rechercher d'un allongement au niveau du temps de coagulation qui se définit par une activité anticoagulante des extraits d'olive vis-à-vis de la cascade de cette voie ce test est réalisé selon la méthode d'Athukorala *et al.*, (2007). Un TQ normal est compris entre 12 et 14 secondes selon les réactifs utilisés (Caquet, 2004).

Dans un premier temps, le facteur de temps d'incubation des deux extraits polyphénoliques d'olive des deux variétés étudiées avec le plasma est testé à fin de déterminer le temps d'incubation optimal qui permet d'obtenir une activité anticoagulante élevée. Les résultats obtenus ont révélé que le temps d'incubation des extraits polyphénoliques avec le plasma influe significativement ($P \leq 0,05$) sur leurs pouvoir anticoagulant (figure 44).

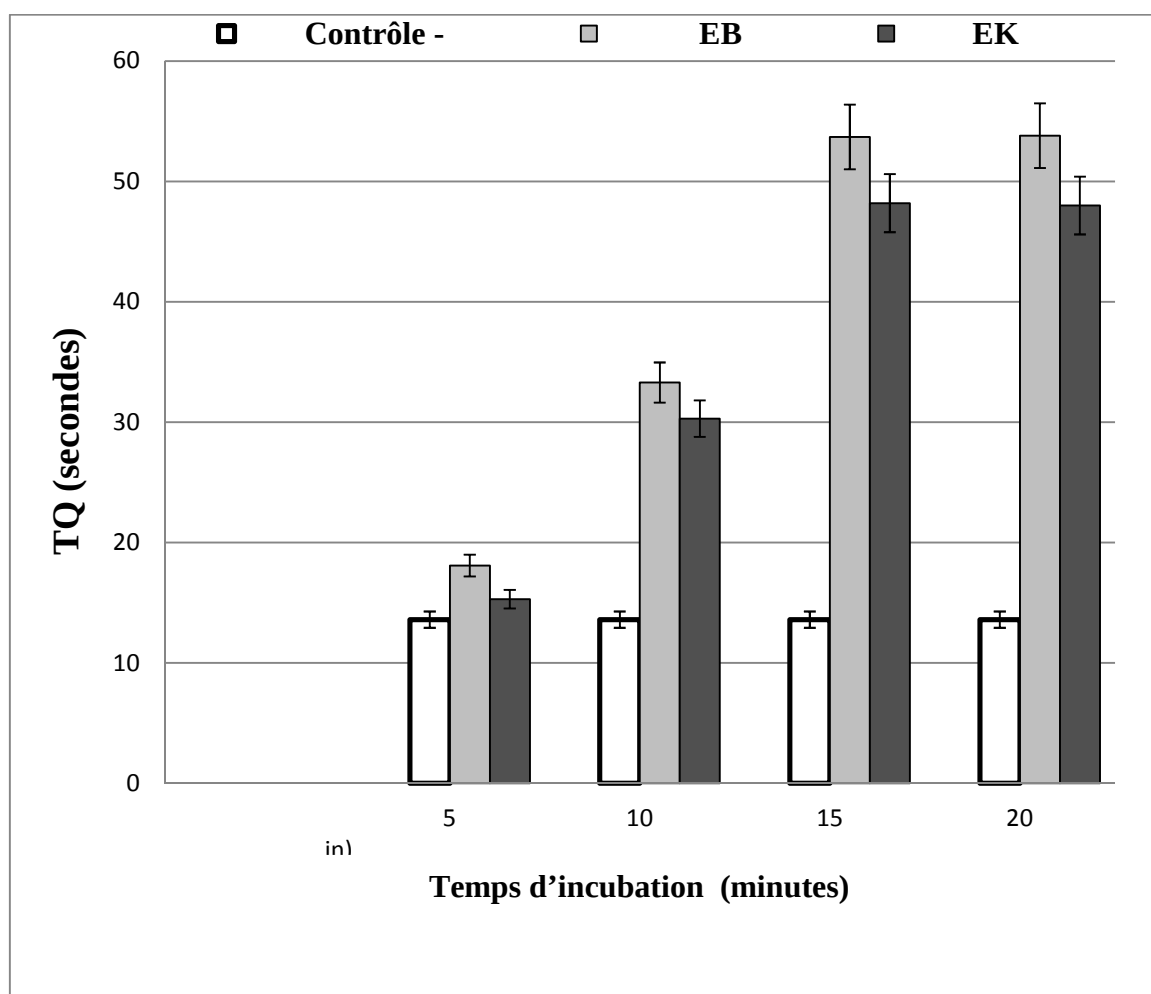


Figure 44: Effet du temps d'incubation des extraits polyphénoliques avec le plasma sur le TQ (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD).

En effet, l'incubation du contrôle négatif durant les différents temps (5, 10, 15 et 20 minutes) n'influe pas sur le temps de coagulation, alors qu'en présence des extraits d'olive l'allongement du TQ est remarquable et temps dépendant (figure 44).

L'incubation pendant 20 minutes est le temps qui a permis d'obtenir une activité anticoagulante significative ($p < 0,05$) et élevée que celle de l'incubation à 5 et à 10 minutes, et très proche à celle induite par les différents extraits lors de l'incubation à 15 minutes, ce qui peut expliquer de loin le choix de 15 minutes comme un temps d'incubation standard dans la réalisation du test de TQ pour l'investigation des propriétés anticoagulantes de différentes substances biologiques et synthétiques à usage thérapeutique.

Dans le temps d'incubation de 15 minutes il y a allongement de TQ de l'ordre de 40,1s (presque 4 fois élevé) et 34,6 s (3 fois élevé) en comparant à celui du contrôle négatif (13,6 s) en présence d'extraits polyphénoliques des variétés VB et VK, respectivement. L'extrait polyphénolique d'olive de la VB présente l'activité anticoagulante la plus élevée par rapport à celle de la VK quelque soit le temps d'incubation (5,10,15 et 20 minutes) avec des différences correspondantes de 2,8 s, 3 s, 5,5 s et 5,8 s respectivement.

Lors de la deuxième étape, la capacité anticoagulante des différents extraits de polyphénols d'olive vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation par le test TQ a été évaluée au temps d'incubation optimal fixé de 15 minutes préalablement établi, avec changement des volumes des extraits incubé avec un volume connue de plasma de 100 μ l.

D'après les résultats obtenus, il ressort que les deux extraits (VB et VK) sont capables d'allonger de manière significative ($P \leq 0,05$) et volume dépendant le TQ (figure 47).

par ailleurs, le contrôle négatif qui est composé du mélange plasma / eau physiologique (solution de NaCl à 0,9 % de poids/volume, soit 9 g/l) de différents volumes n'influe pas sur le temps de coagulation par contre les différents volumes des extraits d'olive (10,20,50 et 100 μ l) l'allongement du TQ est significatif (figure 47).

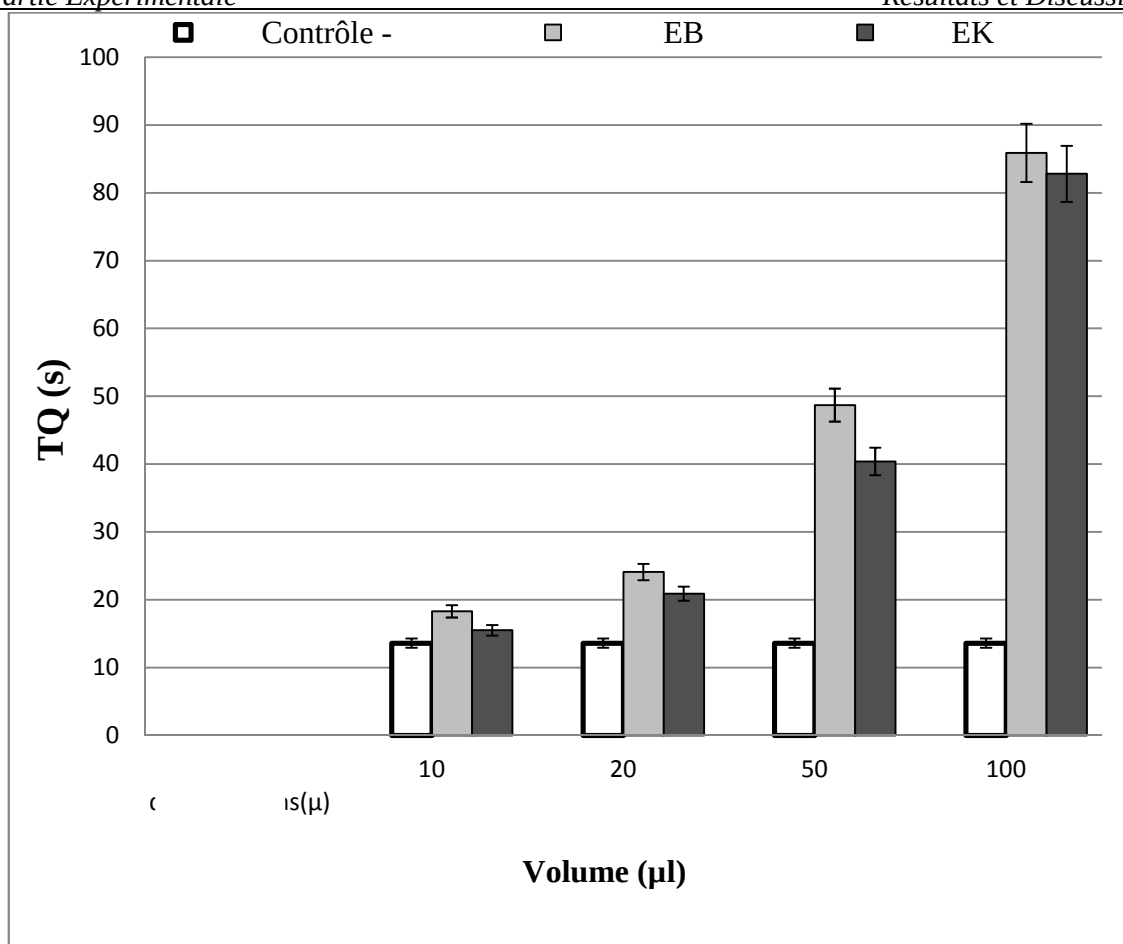


Figure 45 : Effet du volumes des extraits polyphénolique avec le plasma sur le TQ (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD).

Par comparaison des temps de coagulation (TQ) sous l' influence de différents volumes (10, 20 , 50 et 100 µl), il ressort que le volume de 100 µl d'extrait est capable d'exercer une activité anticoagulante significative ($p < 0,05$) et plus élevée estimée par un temps de coagulation de 85,9 s donc un allongement par 72,3 s et de 82,8 s par un allongement de 69,2 s par rapport à celui du contrôle négatif ($13,6 \pm 0,09$ s). Ce volume d'extrait est utilisé dans La procédure suivie dans la présente étude comme volume optimal (Athukorala, *et al.*, 2007). L'extrait polyphénolique Bouchouk exerce un grand effet anticoagulant en comparant avec celui de l'extrait Khanfes quelque soit ses volumes utilisés allant de 10, 20, 50 jusqu'à 100 µl par des différences des temps d'allongement pour chaque volume 2,8 s, 3,2 s , 8,3 s et 3,1 s respectivement.

En outre, le pouvoir anticoagulant des différentes concentrations des extraits d'olive a été évalué à un volume de 100 μ l, et au temps d'incubation optimal (15 minutes) avec le plasma a été étudié.

D'après les résultats obtenus, il ressort que les deux extraits des variétés Bouchouk et Khanfes sont capables d'allonger de manière significative ($P \leq 0,05$) et dose dépendante le TQ avec des coefficients de corrélation linéaire de $0,98 \pm 0,0031$ et $0,99 \pm 0,006$ respectivement (figure 46).

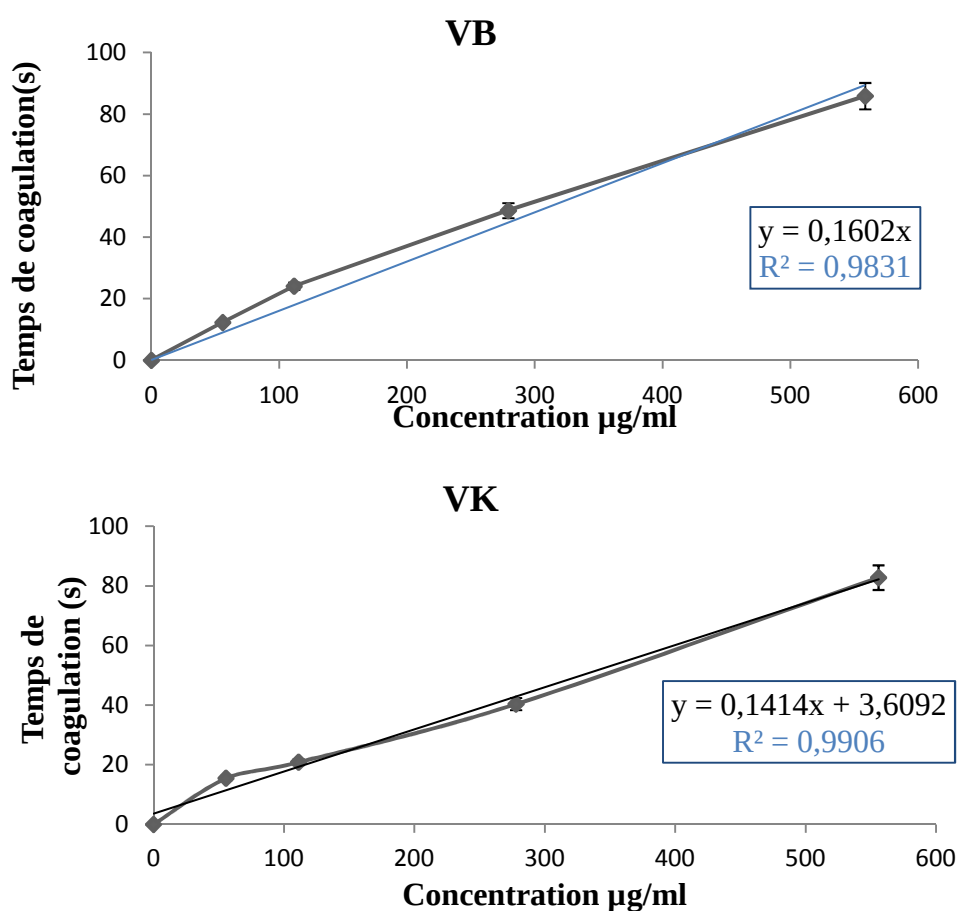


Figure 46: Temps de Quick (TQ) en fonction des concentrations des extraits de polyphénols de variétés d'olive VB et VK (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD).

Dans le présent travail le pouvoir anticoagulant par le test de l'allongement de TQ des polyphénols les plus dominants dans l'olive, l'oleuropéine et le tyrosol d'une concentration de 50 mg/ml est ainsi testées. Les résultats montrent que l'allongement du temps de coagulation provoqué par ses composés séparément est faible par rapport à celui exercé par les deux extraits rapporté précédemment, et il est à égale à 11,9 s (25,5 s) et 12,7s (26,3s) par rapport au contrôle négatif(13,6 s) à 15 minutes d'incubation, respectivement.

A l'issus de cette étude ,on suppose que l'activité anticoagulante des extraits polyphénoliques d'olive peut être due à l'effet synergétique des différentes classes de polyphénols et des autres composés présents dans ces extraits.

II-3-1-2. Test de céphaline Kaolin (TCK)

L'évaluation de la capacité anticoagulante des extrait d'olive vis-à-vis de la voie endogène de la coagulation a été réalisée à l'aide du test de temps de céphaline-Kaolin (TCK).

Dans ce test, cette voie de coagulation est activée par le contact entre le facteur XII et la surface électronégative de l'activateur qui est le kaolin (substitut du collagène et de tissu conjonctif *in vivo*). Cette interaction induit l'activation du facteur XII et par conséquence l'activation séquentielle des facteurs XI, IX, X et la thrombine (facteur II) (Athukorala, *et al.*,2007).

Un temps de coagulation allongé par rapport au contrôle négatif où l'échantillon est remplacé par l'eau physiologique traduit une activité anticoagulante du matériel testé.

L'héparine qu' on a utilisé comme référence dans ce test, pour comparer sa capacité anticoagulante à celle exercé par nos extraits d'olive, est une héparine de bas poids moléculaire (HBPM) sous forme de solution injectable prête a l'emploi caractérisée par une activité anti-Xa élevée et une faible activité anti-IIa ou antithrombinique(Fraxiparine[®] Nadroparine calcique 2 850 UI anti-Xa/ ml) .Ainsi que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol, ces deux polyphénols spécifiques à l'olive sont étudiés pour tester leurs activités anticoagulates vis-à vis de la voie endogène de la coagulation.

La figure 47 représente les temps de céphaline kaolin (TCK) des extraits d'olive VB et VK et des standards (Oleuropéine, Tyrosol, Héparine) par rapport au contrôle négatif.

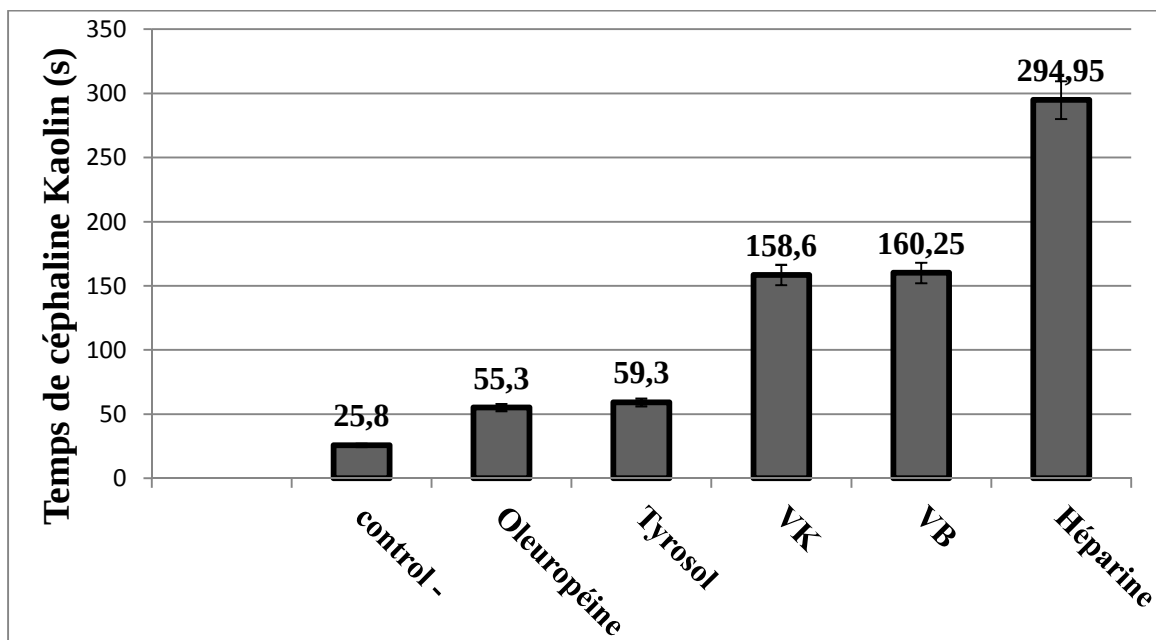


Figure 47 : Temps de céphaline kaolin (TCK) des extraits VB et VK et des standards Oleuropéine, Tyrosol et l'Héparine (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD).

A la lumière des résultats obtenus, il ressort que les deux extraits (VB, VK) sont capables d'allonger significativement le temps de coagulation ($P < 0,05$) avec des valeurs de l'ordre de 134,43 s (160,25 s) et 132,8 s (158,6 s) par rapport à celui du contrôle négatif (25,8 s), respectivement. La prolongation du temps de coagulation induite par les deux extraits d'olive fait que l'extrait de la VB est le premier qui possède l'activité anti-coagulante la plus grande que le second extrait de la VK par une différence minimale de 1,63 s.

Les extraits d'olive ont un effet anticoagulant moindre que celui de l'héparine (Anticoagulant commerciale) dont le temps de coagulation est de 294,95s donc elle provoque un allongement du TCK de l'ordre de 269,15 s par rapport au contrôle négatif, presque le double par comparaison aux pouvoir anticoagulant exercé par les deux extraits VB et VK. Par ailleurs, les polyphénols prédominants d'olive, l'oleuropéine et le tyrosol ont été étudiés pour l'évaluation de leurs pouvoir anticoagulant, et selon les résultats obtenus il est apparu faible avec des allongements du TCK de 29,5 s (55,3 s) et 33,5

(59,3 s) par rapport à celui du contrôle négatif (25,8 s). De ce fait pour avoir une activité anticoagulante efficace, il est probablement nécessaire que les polyphénols d'olive agissent d'une manière synergétique entre eux et/ou entre d'autres composés présents dans les extrait d'olive.

L'analyse statistique a montré l'existence d'une relation linéaire entre l'activité anticoagulante et les différents concentrations des extraits, où les coefficients de corrélation sont de l'ordre de 0,86 et 0,94 pour les variétés bouchouk et Khanfes respectivement. Par conséquent, il ressort que les deux extraits phénoliques d'olive des variétés Bouchouk et Khanfes sont capables d'allonger significativement ($P < 0,05$) le TCK de manière dose-dépendante (figure 48).

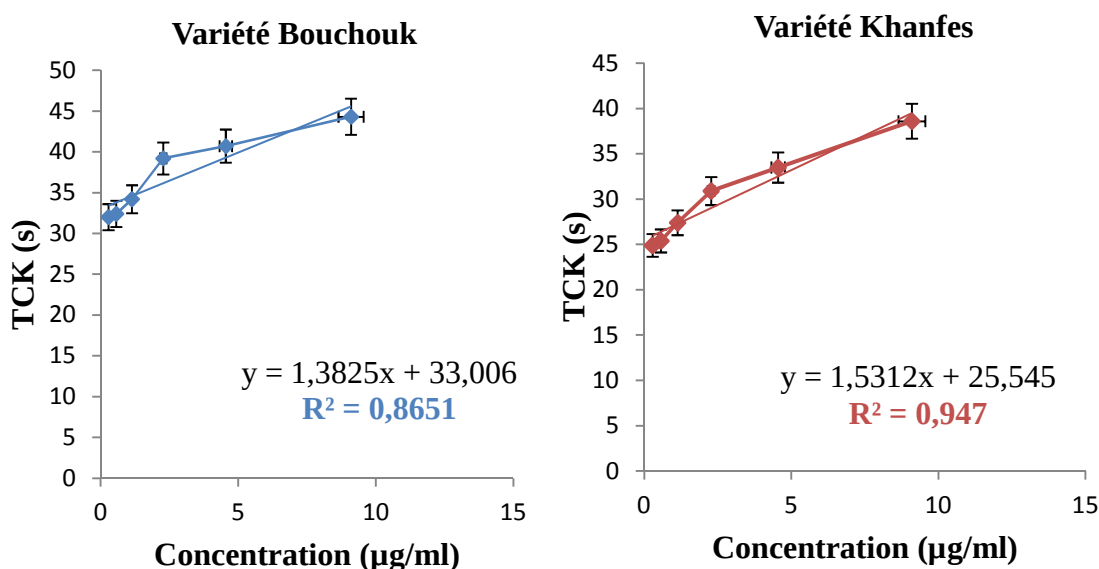


Figure 48 : Temps de céphaline kaolin (TCK) en fonction des concentrations des extraits d'olive des variétés Bouchouk et Khanfes (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm$ SD).

Des études expérimentaux sont intéressées à l'investigation des activités anticoagulantes de divers extraits naturels, elles sont focalisées en premier rang sur l'étude des propriétés anticoagulantes des algues marines brunes et rouges (Pereira *et al.*, 2005; Athukorala *et al.*, 2007 ; Pushpamali *et al.*, 2008). Les composés responsables de l'effet anticoagulant sont

les polysaccharides (Yoon *et al.*,2002; Pawlaczyk *et al.*,2009), ces composés sont les plus étudiés pour leurs activité anticoagulante grâce à la présence dans leurs structures chimiques du groupement hydroxyle (-OH), ainsi en subissant des modifications de type carboxylation ou sulfatation en synergie peuvent provoquer l' inhibition de la voie endogène de la coagulation (Yang, *et al.*,2005) .Parmi les composés doués de cet activité, les peptides (Mieszczanek *et al.*,2004), les glycoprotéines, et les polyphénols (Pawlaczyk *et al.*, 2011) notamment les coumarines (Zhou *et al.*,2009) et quelques tannins (Bae, J-S,2011).

une étude récente réalisée par Bijak *et al.*,(2011) concernant l'évaluation de l' activité anticoagulante *in vitro* des extraits d'une plante *Aronia melanocarpa* et les graines de raisin (*Vitis vinifera*) a montrée que ces deux extraits riches en polyphénols peuvent provoquer un prolongement au niveau du temps de coagulation, de ce fait l'étude donne espoir pour le développment des suppléments alimentaires qui contribuent à la prévention des thromboses.

Malgré qu' il existe de plusieurs projets de recherche axés sur l'activité anticoagulante de divers extraits végétaux , cette activité n'a pas été étudié pour les extraits polyphénoliques d'olive, de ce fait le sujet de ce mémoire est considéré comme étant le premier de son genre qui s'inscrit dans le cadre des études intéressées à la prévention et la thérapie des maladies thrombotiques, et cela par la recherche d'une éventuelle activité anticoagulante des polyphénols l'olive.

D'une manière globale, l'évaluation de la capacité anticoagulante des extraits phénoliques d'olive établi par les deux tests chronométriques d'exploration de la coagulation, le TCK et le TQ démontre que ces extraits exercent une activité anticoagulante importante vis-à-vis des deux voies de la coagulation, mais cette activité est plus marquée vis-à-vis de la voie endogène que vis-à-vis de la voie exogène de la coagulation et que les constituants qui possèdent des groupements fonctionnels particulièrement les polyphénols plus particulièrement les coumarines grâce a leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis des sérines protéases et les polyphénols glycosylés pour former des polymères mimique l'action des héparines (Yang, *et al.*,2005) pouvant être les composés responsables de cette activité anticoagulante.

Conclusion et perspectives

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 anticoagulante des polyphénols extraites de pulpe d'olive. Ce couple d'activités biologiques a été choisis pour formuler une hypothèse qui explique l'effet antiathrombogène de ces molécules et leurs rôle primordial dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires et ses complications graves qui menacent la santé publique, et constituent la première cause de décès à travers le monde.

La description pomologique des fruits d'olive montre des différences entre les deux variétés étudiées de point de vue morphologique, pondéral, ainsi que en taux d'humidité et en rendement d'huile, ces différences sont la conséquence du patrimoine génétique et par le site géographique. Généralement, les deux variétés VB et VK ont des fruits relativement possèdent des poids moyens entre 4et 6g, et un taux d'huile élevé(>45%), de ce fait elles sont considérées comme des variétés à l'huile.

La caractérisation quantitative des extraits phénoliques d'olive a révélée un contenu riche des olives par les polyphénols et les flavonoïdes, on a trouvé que les variétés Bouchouk et Khanfes sont caractérisées par des teneurs en polyphénols de l'ordre de 3930 et 3910 mg EAG /100g respectivement, et pour les flavonoïdes les teneurs sont de 317 et 422 mg ER /100g ce qui nous amène a dire que le contenu en flavonoïdes est faible par rapport a celui des polyphénols pour les deux variétés étudiées. Ces résultats indiquent que le fruit d'olive apparait comme un réservoir d'antioxydant 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 l'oleuropéine , la catéchine, la rutine , 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 2,585 et 4,625 µg/ml pour l'extrait de la VB et l'extrait de la VK respectivement, la comparaiso des IC₅₀ nous a permet de conclure que les deux extrais présentent une meilleurs activité antiradicalaire que les antioxydants utilisés comme standards , le BHT et la rutine.

Autres tests *in vitro*, les tests blanchissement de β -carotène et du pouvoir réducteur. Des résultats obtenus, Cette capacité antioxydante est confirmée par les tests du blanchissement de β -carotène et du pouvoir réducteur. En effet, ces polyphénols des extraits d'olive des VB et VK, respectivement sont aussi capables d'inhiber la peroxydation lipidique avec des pourcentages appréciables de l'ordre de 97,27 % et 94,45%. Ainsi, ils possèdent un très grand pouvoir réducteur avec des CE_{50} de 5,055 μ g/ml et 6,110 μ g/ml.

L'activité anticoagulante des polyphénols d'olive a été également évaluée *in vitro* en utilisant les tests du temps de céphaline-kaolin (TCK) et du temps de Quick (TQ). Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence de ces polyphénols indiquent qu'elles exercent une grande activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation et cette activité est plus observée pour la voie endogène de la coagulation. En effet, les VB et VK sont capables d'allonger le TQ presque 4 fois plus et 3 fois plus élevé par rapport au contrôle négatif respectivement. Ainsi, ils permettent d'allonger le TCK 6,21 et 6,14 fois plus que le contrôle négatif.

L'olive et ses dérivés (huile et olive de table) possèdent de innombrables propriétés biologiques parmi lesquelles les activités antioxydante et anticoagulante, étudiées dans ce mémoire donnant des résultats préliminaires et nécessite des études complémentaires approfondies. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- ❖ Caractérisation quantitative des composés polyphénoliques issus de différentes sources : de pulpe, de feuilles, d'écorce, de grignon, de margine et d'huile d'olive par des méthodes de séparation plus performantes (CLHP, CL/SM, CG/SM...).
- ❖ Evaluation *in vivo* des activités anticoagulante et antiplaquettaires des extraits phénoliques d'olive.
- ❖ Application des tests spécifiques pour l'estimation de l'activité anticoagulante par ciblage des facteurs clés de la coagulation : FII(thrombine) et FX(prothrombine).
- ❖ Purification des polyphénols et détermination de leurs activités antioxydante, et anticoagulante séparément et combinés pour faire ressortir l'effet synergique entre ces molécules.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abaza, L., Mongi, M., Douja, D., Zarrouk, M.** (2002) . Caractérisation des huiles de sept variétés d'olivier tunisiennes. *Oliéagineux, Corps Gras, Lipides*, **9**(2) : 174-179.
- Acquaviva, R., Di-Giacomo, C., Sorrenti, V., Galvano, F., Santangelo, R., Cardile, V., Gangia, S., D'Orazio, N., Abraham, N.G., Vanella, L.** (2012). Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *International Journal of Oncology*, **12** :14-28.
- Ajjan, R., Grant, P. J.** (2006). Coagulation and atherothrombotic disease. *Atherosclerosis*, **186** : 240–259.
- Akowauh, G.A., Zhari, I., Norgyati, I., Sadikun, A., Khamsah, S.M.** (2004). The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, **87**: 559-566.
- Al-Azzawie, HF., Alhamdani, MS.** (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Science*, **78**:1371-1377.
- Aleil, B., Wolff, V., Wiesel, M-L., Gachet, C., Cazenave, J-P., Lanza, F.** (2004). La glycoprotéine V soluble :un nouveau marqueur plasmatique de la thrombose artérielle. *Médecine thérapeutique Cardiologie*, **2**(5) : 267-275.
- Amiot, M., Fleuriet, A.** (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **34**: 823–826.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A., Macheix, J. J.** (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry* **28** : 67–69.
- Amro, B., Aburjai, T., Al-Khalil, S.** (2002). Antioxidative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia*, **73**:456-461.
- Andreadou, I., Iliodromitis, EK., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, AL., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A., Kremastinos, DT.** (2006). The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidant and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *Journal of Nutrition*, **136**: 2213-2219.
- Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E., K., Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., Savvari, P., Gorgoulis, V., Papalabros, E. and Kremastinos, D.T.** (2007). Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecule and Cell Cardiology*, **42**:549-558.
- Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P.** (2002). Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Medicinal Food*, **5**:1-7.
- Artajo, L.S., Romero, M.P., Morelló, J.R., Motilva, M.J.** (2006). Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(16) : 6079-88.
- Aubry, P., Halna du Fretay, X.** (2010). Traitements antithrombotiques du syndrome coronarien aigu avec sus-décalage ST. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, **59**: 335-343.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., khebri, S.** (2010) activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits *CUMINUM CYMINUM* L. *Lebanese Science journal*, **11**(1) 69-81.

- Athukorala, Y., Lee, K.W., Kim, S.K., Jeon, Y.J.** (2007). Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*, **98**: 1711–1716.
- Audigié, C., Figarella, J., Zonszain, F.** (1978). Manipulation d'analyse biochimique. Doin (Ed). Paris p 247.
- Audrey, C., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M.C., Pénicaud, L., Casteilla, L.** (2006). Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie M/S : *médecine sciences*, **22** (1): 47-53.
- Babar, A. M., Hahn, E.J., Paek, K.Y.** (2007). Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*, **12**: 607-621.
- Bae, J-S.** (2011). Antithrombotic and profibrinolytic activities of phloroglucinol. *Food and Chemical Toxicology*, **49** :1572–1577.
- Bahorun, T.** (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiass*, p83-94.
- Battinelli, L., Daniele, C., Cristiani, M., Bisignanob, G., Saijab, A., Mazzanti, G.** (2006). In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine*, **13** :558-563.
- Batty, P., Smith, G.** (2010). Anticoagulation. *Surgery*, **28** (6): 243-247.
- Bauters, C.** (2002). Athéromatose : un même processus pour différents territoires artériels ?. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, **51** : 177–180.
- Beaudeau, J.L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand, D., Peynet J.** (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, **21** : 144–150.
- Bedossa, A., Samama, M.M., Emile, C.** (2000). Cahier de Formation, Biologie médicale : Hemostase et Thrombose. *Bioforma*, **20** : 11-199.
- Belkheiri, N.** (2010). Divers phénoliques à activités Antiathérogènes. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse.
- Benlarbi, F.** (2004). Caractérisation des lipides et des phénols de quelques groupes d'oliviers d'Algérie. Mémoire de magister. Laboratoire des sciences fondamentales. Université de Laghouat, p 70-86-88.
- Ben Othman, N., Roblain, D., Thonart, P., Hamdi, M.** (2008). Tunisian table olive phenolic compounds and their antioxidant capacity. *Journal of Food Science*, **73**(4) : 235–240.
- Ben Othman, N., Roblain D., Chammen, N., Thonart, P., Hamdi, M.** (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, **116** : 662–669.
- Ben Temime, S., Campeol, E., Cioni, P. L., Daoud, D., Zarrouk, M.** (2006). Volatile compounds from Chetoui olive oil and variations induced by growing area. *Food Chemistry*, **99** : 315–325.
- Bianchi, G.** (1999). Extraction systems and olive oil. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides OCL*, **6** (1) :49-45.
- Bianco, A., Chiacchio, M., Grassi, G., Iannazzo, D., Piperno, A., Romeo, R.** (2006). Phenolic components of *Olea europea*: Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*, **95** : 562-565.
- Bianco, A., Uccella, N.** (2000). Biophenolic components of olives. *Food Research International*, **33** :475–485.

Bisset, S.(2011). Activités antioxydante et inhibitrice vis-à-vis de l'élastase d'extrait des polyphénols d'olive (*Olea europaea* L.).Mémoire de magister, Université Ferhat Abbas Sétif.

Bijak, M., Bobrowski, M., Borowiecka, M., Podśędek, A., Golański, J., Nowak, P.(2011). Anticoagulant effect of polyphenols-rich extracts from black chokeberry and grape seeds. *Fitoterapia*,**82** (6): 811-817.

Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A. (1999). On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **51**: 971-974.

Blekas, G., Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2002). On the importance of total polar phenols to Monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104** :340-346.

Boizot, N., Charpentier, Jean-Paul.(2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de L'Inra*, pp :79-82.

Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. *Journal of Chromatography A*, **1217**: 7972–7980.

Bouakaz, I. (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C.(1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **28**: 25-30.

Braun, L. (2005). Olive-leaf extract. *Journal of Comparative Medicine*, **4**: 69-73.

Brenes, M., Garcia, A., Rios, J.J., Garcia, P., Garrido, A. (2002). Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International Journal of Food Science & Technology*, **37** : 615-625.

Bruneton, J.(2009). *Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales*, (4^e éd), revue élargie, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, p 1288 .

Bruneton, J.(1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, (3^{ème} éd.). Editions Tec & Doc Lavoisier, p 1120.

Bogani, P., Galli, C., Villa, M., Visioli, F.(2007). Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, **190** :181–186.

Boros, B., Jakabova, S., Dornyei, A., Horvath, G., Pluhar, Z., Kilar, F., Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. *Journal of Chromatography A*, **1217** : 7972–7980.

Boskou, D., Visioli, F. (2003). Biophenols in olive oil and olives. In M. Pilar Vaquero (Ed.), *Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. Metabolic and technological aspects*, pp :161–192.

Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M.(2005). Phenolic compounds in olive oil and olives. *Current Topics in Nutraceutical Research*, **3**(2) : 125–136.

Boskou, D.(2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, **17** : 505–512.

Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M.(2006). Olive oil composition. Dans D. Boskou (Ed.), *Olive oil, chemistry and technology* (2nd edition). Champaign Illinois: American oil chemists society, pp : 41-72.

- Bouaziz, M., Grayer, R. J., Simmonds, M.S.J., Damak, M., Sayadi, S.** (2005). Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar *Chemlali* growing in Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** : 236-241.
- Burton, G. W., Ingold, K. U.** (1986). Vitamin E: Application of the principles of physical organic Chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research*, **19** : 194-201.
- Caen, J., Lrriue, M.J., Samama, M.** (1975). L'hémostase : méthodes d'exploration et diagnostic pratique (2^{ème} éd), Expansion Scientifique Française (Paris); pp :15-20.
- Carluccio, M.A, Siculella, L., Ancora, M.A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distante, A., De Caterina, R.** (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thrombosis Vascular Biology*, **23**: 622–629.
- Carrion, Y., Ntinou, M., Badal, E.** (2010). *Olea europaea* L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early–Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews* **29** : 952–968.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., Fernandez-Gutierrez, A.** (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of Separation Science*, **28** : 837–858.
- Caquet, R.** (2004). 250 examens de laboratoire : prescription et interprétation (9^{ème} éd), Masson (Paris), pp: 388-389.
- Chang, C-L., Wang, G-J., Zhang, L-J., Tsai, W-J., Chen, R-Y., Wua, Y-C., Kuo, Y-H.** (2009). Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamus quiquiesetinus*. *Phytochemistry*, **10** : 1–9.
- Cherif, S., Rahal, N., Haqala, M.A.** (1996). Clinical trial of a titrated *Olea* extract in the treatment of essential arterial hypertension. *Journal de Pharmacie de Belgique*, **51**: 69-71.
- Cicerale, S., Conlan, X.A., Sinclair, A.J., Keast, R.** (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **49**: 218–236.
- Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R. S.** (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Science*, **11**(2) : 458–479.
- Cicerale, S., Conlan, X.A., Barnett, N.W., Keast, R.S.J.** (2011). Storage of extra virgin olive oil and its effect on the biological activity and concentration of oleocanthal. *Food Research International*, **6** : 963-969.
- Cimato, A.** (1990). Effect of agronomic factors on virgin olive oil quality. *Olivae*, **31**: 20-31.
- Circosta, C., Occhiuto, F., Gregorio, A., Toigo, S., De Pasquale, A.** (1990). Activité cardiovasculaire de jeunes pousses et de feuilles de *Olea europaea* L. Et de l'oleuropeine. *Plantes Med Phytother*, **24**(4) : 264-277.
- Colvin, B.T.** (2004). Physiology of haemostasis. *Vox Sanguinis*, **87**(1): 43-46.
- Corti, R., Hutter, R., Badimon, J.J., Fuster, V.** (2004). Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thrombosis Thrombolysis*, **17**: 35–44.
- Crozier, A., Del Rio, D., Clifford, M.N.** (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, **31** : 446–467.
- Crozier, S., Woimant, F.** (2007). Infarctus cérébral grave: quelle prise en charge? Acute management of severe ischemic stroke. *Réanimation*, **16** : 441- 451.
- Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Dominguez, H.** (2009). Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, **114** : 806-812.

- Covas, M.I, Ruiz-Gutierrez, V., de la Torre, R., Kafatos, A., Lamuela-Raventos, R.M., Osada J.**(2006).Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutrition Reviews*, **64** (1): 20–30.
- Covas, M. I.**(2007).Olive oil and cardiovascular system. *Pharmacological Research*,**55** : 175-186.
- Dacosta, E.** (2003).Les phytonutriments bioactifs.Yves Dacosta (éd). Paris, p**317**.
- Das, Manika., Das, Dipak. K.**(2010). Resveratrol and cardiovascular health.*Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 503–512.
- Database on polyphenol content in foods.** Phenol-explorer: la première base de données en ligne sur les polyphénols alimentaires.<http://www.phenol-explorer.eu/compounds>.
- Davies, M. J., Woolf, N.**(1993).Atherosclerosis: what is it and why does it occur?.*British Heart Journal*, **69** : 3- 11.
- De la Puerta, R., Ruiz Gutierrez, V., Hout, JR.** (1999).Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemistry Pharmacology*, **57**: 445-449.
- De Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Delaye, J., Mamelle, N.**(1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, **99**: 779-785.
- De Whalley, C., Rankin, S., Hout, J., Jessup, W., Leake, D.** (1990).Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochemistry. Pharmacology*, **39** : 1743-1750.
- Del Rio, C., Caballero, J.M.** (1998).Preliminary agronomical characterization of 131 cultivars introduced in the olive germplasm bank of Cortoba in March 1987. *Acta Horticulturae*, **356** : 110-115.
- Dimitrios, B.**(2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, **17** : 505-515.
- Edardes, Joseph P.**(2008).Coumarin Anticoagulant Research Progress. *Nova Science Publishers, Inc.* pp **1-9**.
- El Boustani, E., Prost, J., Benkhalti, F., El Yodafar, C., Stocker, P., Jimenez, F., Prerez.**(2004). Régime alimentaire méditerranéen et protection contre les maladies cardiovasculaires. *Congrès international de Biochimie*. Forum des jeunes Chercheurs, Marrakech. Maroc.
- Erdogan, B., Ahmet, I., Hatice, G.** (2009). Distribution of olive (*Olea Europaea* L.) genotypes in the southern marmara region of Turkey.*Pakistan Journal of Botany*, **41**(3) : 1077-1080.
- Etsuo, Niki.**(2010).Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo.*Free Radical Biology & Medicine*, **49**: 503–515.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C.**(2008).Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities.*Comptes Rendus Biologies*, **331**: 372-379.
- Favier, A.**(2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, p**108-115**.
- Fehri, B., Alache, J.M., Mrad, S., Korbi, S., Lamaison, J.L.**(1996).*Olea europaea* L.: Stimulant, anti-ulcer and anti-inflammatory effects. *Bollettino chimico farmaceutico*, **135**(1): 42-49.
- Ferguson, L.R.**(2001).Role of plant polyphenols in genomic stability.*Mutation Research*, **475** : 89–111.

- Fernandez-Rodriguez, J., Maisonneuve, P., Boyle, P.**(1994) Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *International Journal of Cancer* , **58** : 774-780.
- Ferrara, LA., Raimondi, AS., d' Episcopo, L., Guida, L., Dello Russo, A., Marotta, T.** (2000).Olive oil and reduced need for antihypertensive medication. *Archives of Internal Medicine*, **160** (6): 837-842.
- Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, L.M.L., Aranjó, M.E.M.** (2006).The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*,**108** : 31-37.
- Ferroni, F., Maccaglia, A., Pietraforte, D., Turco, L., Minetti, M.** (2004). Phenolic antioxidants and the protection of low density lipoprotein from peroxynitrite-mediated oxidations at physiologic CO₂.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**52**: 2866-2874.
- Fki, I., Allouche, N., Sayadi. S.**(2005).The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4- dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, **93** : 197-204.
- Fki, I., Bouaziz, M., Sahnoun, S., Sayadi, S.**(2005).Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,**13** :5362–5370.
- Fleming, HP., Walter, WM., Etchells, JL.** (1973).Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis. *Journal of Applied Microbiology*,**26** (5) : 777-782.
- Fortes, C.,Forastiere, F.,Farchi, S.,Mallone, S., Trequattrinni, T., Anatra, F., Schmid, G., Perucci, C.A.**(2003).The protective effect of the Mediterranean diet on lung cancer. *Nutrition and Cancer*,**46** : 30–37.
- Fraga,C.G.,Galleano, M.,Verstraeten, S.V.,Oteiza, P.I.**(2010).Basicbiochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols.*Molecular Aspects of Medicine*, **31** : 435–445.
- Fredrickson, W.R.,F and S Group, Inc.** (2000). Method and Composition for Antiviral Therapy with Olive Leaves.*U.S. Patent Journal*, **6** : 117-884.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh S.A., Rasooli, I.**(2007).Chemical and boilological characteristics of Cuminum cyminum and Rosemarinus officinalis essential oils. *Food Chemistry*, **102** : 898-904.
- Gaussorgues, R.,** (2009). L'olivier et son pollen dans le bassin méditerranéen. Un risque allergique ? *Revue française d'allergologie*, **49** : 2–6.
- Geissmann, T.A., Hinreiner, E.**(1952).Theories of biogenesis of flavonoid compounds. *Botanical Review*, **18** : 77-244.
- Ghazi, F., Sahraoui S.,** (2005). Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia, mémoire d'ingéniorat en agronomie, El Harrach.
- Ghedira, K.**(2008). L'olivier. *Phytothérapie*, **6** (2): 83–89.
- Ghosh, D., Scheepens, A.** (2009).Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*,**53** : 322 – 331.
- Gikas, E., Bazoti, F. N.,Tsarbopoulos, A.**(2007).Conformation of oleuropein, the major bioactive compound of *Olea europea*. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **821** (1-3): 125-132.

- Gimeno, M., Castellote, A.I., Lamuela-Raventos, R.M., De la Torre, M.C., Lopez-Sabater, M.C.**(2002).The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, a-tocopherol, and b-carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, **78** :207–211.
- Girardel, J.M, Samama, C.M.**(2006).Les nouveaux antithrombotiques:une thérapeutique en mutation,des perspectives d’avenir New anticoagulant agents: the present and the future. *Réanimation*, **15**: 117–123.
- Giuseppe Palasciano.**(2008).Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis.*Journal of Nutritional Biochemistry*, **19** :491-504.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman,D., Segura-Carretero, A.,Fernandez-Gutierrez, A.**(2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 1220-1234.
- Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, MJ., Utrilla, MP., Jimenez, J., Osuna, I.**(1992). Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Medica*, **58**: 513-515.
- Granados-Principal, S.,Quiles, J. L.,Ramirez-Tortosa, C.L.,Sanchez-Rovira,P., Ramirez-Tortosa, M.C.**(2010).Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews* ,**68** (4): 191–206.
- Grasso, S., Siracusa, L., Spatafora, C., Renis, M., Tringali, C.**(2006). Hydroxytyrosol lipophilic analogues: Enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorganic Chemistry*,**35** : 137–152.
- Gul, M.K.,Seker, M.**(2006).C comparative analysis of phytosterol components from rapeseed(*Brasica napus* L.) and olive (*Olea europaea* L.) varieties. *European Journal of lipid Technology*, **108** : 759-765.
- Gutierrez, F., Jimenez, B., Ruiz, A., Albi, M. A.**(1999) Effect of olive ripeness on the oxidativestability of virgin olive oil extracted from the varieties pictual and hojiblanca and on thedifferent components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**(1) : 121-127.
- Hagerman, A.F.**(1995).Tanin analysis.Thèse de doctorat.Université d’Oxford p 7-9.
- Hakim, I.A.,Alsaif, M.A., Alduwaihy, M.** (2003).Tea consumption and the prevalence of coronary heart disease in Saudi adults: results from a Saudi national study. *Preventive Medicine Journal*, **36**: 64–70.
- Halliwell, B.** (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view.*Nutrition Reviews*, **52**: 253-265.
- Hamdi, KH., Castellon, R.** (2005).Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **334** : 769-778.
- Hannachi, H., Msallem, M., El Gazzah, M., Ben EL hadj, S.**(2006).Etude de la variabilité pomologique des olives et de la composition en acides gras des huiles de 15 variétés d’olivier tunisiens (*Olea europaea* L.). *Revue des Régions Arides*, **17** : 43-64.
- Hannachi, H., Monji, M., Ben Elhadj, S., El Gazzah, M.**(2007).Influence du site géographique sur les potentialités agronomiques et technologiques de l’olivier(*Olea europaea* L.) en Tunisie.Biologie et pathologie végétales/Plant biology and pathology.C. R. Biologies, **330** :135-142.

- Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., Ben El Hadj, S., El Gazzah, M., Berville, A.** (2008). Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia. *Scientia Horticulturae*, **116** : 280–290.
- Haralabos, C., Karantonis, S., Antonopoulou, D.N. P., Dimitrios, P.S., Stamatios, E., Theocharis, N.K., Dimitrios, G., Iliopoulos, C. A. Demopoulos.** (2006). In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **16** : 174-185.
- Haton C.,** (2005). Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, pp : 43.
- Heim, K-E., Tagliaferro, A-R., Bobilya, D-J.** (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, **13** : 572–584.
- Helft, G., Leger, P.** (2009). Que retenir de la littérature récente concernant les anti-thrombotiques. What's new on antithrombotics? *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, **58** : 230-235.
- Herrera, M.D., Perez-Guerrero, C., Marhuenda, E., Ruiz-Gutierrez, V.** (2001). Effects of dietary oleic-rich oils (virgin olive and high-oleic-acid sunflower) on vascular reactivity in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, **86**: 349–357.
- Ho, Y.C., Yang, S.F., Peng, C.Y., Chou, M.Y., Chang, Y.C.** (2007). Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, **36** : 588–93.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M.** (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, **139**: 1-21.
- Hodgson, J. M., Croft, K.D.** (2010). Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 495–502.
- Hodgson, J. M., Croft, K.D.** (2006). Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86** : 2492–2498.
- Ignazio, G., Vincenzo, O., Palmieri, P., Portincasa A. M., Popovici C., Ilonka S., Bartek, T.** (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, **4** : 25-39.
- Igor, E. K., Nicolai, M., Nikolai, M. A.** (2006). Anichkov's Theory of Atherosclerosis. *Texas Heart Institute Journal*, **33** : 417-23.
- Jacotot, B.** (1993). L'huile d'olive, de la gastronomie à la santé éditions Artulen, p 224.
- Jemai, H., Fki, I., Bouaziz, M., Bouallagui, Z., El Feki A., Isoda, H., Sayadi, S.** (2008). Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol fed rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56** : 2630-2636.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., Sayadi, S.** (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, **176** : 88-98.
- Jemai, H., El Feki, A., Sayadi, S.** (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **57** (19): 8798-804.

- Juan –B., Guillermo, R, Rocio, R., Guillen, R., Jimenez, A.**(2006).Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste.*Grasas y Aceites*,**57**(1) : 95-106,
- Kahle, W.,Leonhardt, H., Platzer, W.** (1990).Anatomie.Tome 2, viscères. 2^{ème} éd.Paris, Flammarion.Médecine-Sciences.
- Karakaya, S.**(2009).Olive tree (*Olea europaea*) leaves : potential beneficial effects on humanhealth.*NutritionReviews*, **67**(11):632-8.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A.,** (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L.using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*,**100** : 584–589.
- Keys, A.** (1970). Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, **41** (21) : 1-211.
- Keys, A.** (1995). Mediterranean diet and public health: Personal reflections. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **61**:1321-1323.
- Khayyal, MT., El-Ghazaly, MA., Abdallah, DM., Nassar, NN., Okpanyi, SN., Kreuter, MH.** (2002).Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea-europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung*,**52** : 797-802.
- Knaggs, A.R.** (2003).The biosynthesis of shikimate metabolites.*Natural Product Reports*, **20** : 119–36.
- Koechlin-Ramonatxo,C.** (2006).Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutritionclinique et métabolisme*,**20** : 165–177.
- Kohyama, N., Nagata, T., Fujimoto, S., Sekiya, K.** (1997) Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry*, **61** : 347-350.
- Köhler.** (1887). Kohler's Medicinal Plants(Kohler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterte Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica), **2**: p155.
- Lacut, K., Deluc, A., Le Moigne, E., Mottier, D.**(2008).Existe-t-il un lien entre la maladie artérielle athéromateuse et la maladie veineuse thromboembolique?*Mathematics Teaching* ,**14** (1) : 32-36.
- Laguerre, M.,Lopez-Giraldo, L., Lecomte, J., Pina, M.,Villeneuve,P.**(2007).Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante.*Oxford College of London*,**14** (5): 278-292.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J.P.**(2004).Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine,du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*, **52** : 314–322.
- Larrosa, M.,Garcia-Conesa, M.T., Espin, J.C.,Tomas-Barberan, F.A.**(2010). Ellagitannins,ellagic acid and vascular health.*Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 513-539.
- Laughton, M., Evans, P., Moroney, M., Houlst, J.,Halliwell, B.**(1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochemistry and Pharmacology*,**42**: 1673-1681.
- Lazzez, A., Kammoun, N., Arous, N.,Hamdi, T., Rekik, H.,Cossentini, M.**(2008).Caractérisation pomologique des olives et physico-chimique des huiles des variétés Chétoui et Chemlali.*Revue des régions arides*, **21** : 95-102.
- Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, PL., Chang, YT., Huang, PL.**(2003).Anti-HIV activity of olive leaf extract(OLE) and modulation of host cell gene expressionby HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemistry and Biophys Research Commun*, **307**: 1029-1037.

- Lee, O.H., Lee, B.Y. (2010).Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Olea europaea leaf extract.*Bioresources and Technology*,**101** (10): 3751-3754.
- Lee, O.H., Kim,Y.C., Kim, K.J., Kim, Y.C., Lee, B.Y.(2007).The effects of bioactive and fatty acid composition on the oxidative stability of extract virgin olive oil varieties. *Food Sciences and Biotechnology*,**16** : 415–420.
- Léger, C. L.(2008).Les polyphénols de l'olive de table et de l'huile d'olive vierge,2 formes de consommation de l'olive-drupe – Propriétés antioxydantes et rôles biologiques. 1ères Journées Scientifiques du Génie des Procédés Appliqué à l'Agro Alimentaire.Inra Marseille(France).<http://www.gp3a.auf.org>.
- Léon, L., Uceda, M., Jimenèz, A., Martin,L.M., Rallo,L.(2004).Variability of fatty acid composition in olive (*Olea europaea* L.) progenies.*Spanish Journal of agricultural Research*, **2**(3) : 353-359.
- Léoni, Jérôme.(2001).Physiopathologie de l'athérosclérose - Mécanismes et prévention de l'athérombose.Thèse d'exercice pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie.France.
- Lhuillier, A.(2007).Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : Agauria salicifolia Hook.f ex Oliver,Agauria polyphyllaBaker (*Ericaceae*), Tambourissa-trichophylla Baker (Monimiaceae) et Embelia concinna Baker(Myrsinaceae).Thèse de doctorat. Toulouse.
- Li , H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., chen, F., Tian, Y.(2007).Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chimestry*, **102** : 771-776.
- Luc, G., Lecerf, J.M., Bard, J.M.(1991).Cholestérol et athérosclérose.Masson,Paris.
- Luis, M., Marcela,A., Salette, R., José, L.F.C.Lima, R.(2008).Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.*Analytica Chimica Acta*, **613** : 1-19.
- Malheiro, R., Sousa, A., Casal, S., Bento, A., Pereira, J. A. (2011).Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives.*Food and Chemical Toxicology*, **49** : 450–457.
- Malheiro, R.,Casal, S.,Sousa, A., de Pinho, P., Peres, A. M., Dias, L. G., Bento, A., Pereira, J.A.(2012).Effect of Cultivar on Sensory Characteristics, Chemical Composition,and Nutritional Value of Stoned Green Table Olives.*Food and bioprocess technology*, **5** (5) : 1733-1742.
- Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, **16** : 1–8.
- Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Moltedo, O., Leone, A., Zappia, V. (1997). The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*,**127** : 286-292.
- Manna, C., Martin-Moreno, J., Willet, W., Gorgojo, L., Banegas, J., Rodriguez-Artalejo, F., Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G.,Galli, C.(1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*, **78**: 151-160.
- Migliardi, V., Golino, P., Scognamiglio, A., Galletti, P., Chiariello, M., Zappia, V. (2004).Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, **15**:461-466.
- Mariod, A.A., Ibrahim, R.M., Ismail, N. (2010). Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monchema ciliatum*) and white mahlab

- (Prenus mahaleb) seedcakes. *Food Chemistry*, **118** : 120-127.
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B.**(2001).Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing.*Food Chemistry*, **74** : 55–60.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R.**(2002).Mécanismes de la protection cardiaque etvasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, **51** : 304–315.
- Matalas, A.-L., Zampelas, A., Stavrinou, V., Wolinsky, I.**(2001).The Mediterranean Diet: Constituents and Health Promotion;CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Maymone, B., Battaglini, A. et Tiberio, M.**(1961).Recherche sur la valeur nutritive du grignon d'olive.*Informations Oléicoles internationales*, **17** : 65–98.
- Merghem, M.**(1996).Les facteurs antinutritionnels(F.A.M) phénoliques de Pisum sativum et Uisia faba L. (Leguminosae).Aspects structuraux , génétiques et phénotypiques.Thèse de doctorat d'état en biochimie appliquée.Université de Constantine.
- Micol, V, Caturla, N, Pérez-Fons, L, Más V, Pérez L, Estepa, A.**(2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research*, **66** (2-3): 129-36.
- Middleton, E., Kandaswami, C.**(1992). Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions.*Biochemistry and Pharmacology*, **43** : 1167-1179.
- Mieszczanek, J., Harrison,L. M.,Vlasuk,G.P.,Cappello, M.**(2004). Anticoagulant peptides from *Ancylostoma caninum* are immunologically distinct and localize to separate structures within the adult hookworm. *Molecular&Biochemical Parasitology*, **133** :319–323.
- Milane, H.** (2004).La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant oucapteurs de radicaux libres;études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat.Strasbourg.
- Miles, EA., Zoubouli, P., Calder, PC.**(2005).Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, **21**: 389-394.
- Molyneux, P., Songklanakarin, J.**(2004).The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for estimating antioxidant activity. *SciencesTechnology*, **26** (2) :211-219.
- Mulvihill, E. E.,Huff, M.W.**(2010).Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Canadian Journal of Cardiology*, **26** : 17-21.
- Nasir, S. A. Malik, Joe, M. Bradford.**(2008). Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive(*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Food Agriculture and Environment*, **6** (2) : 8 -13.www.world-food.net.
- Nefzaoui, A.**(1991).Valorisation des sous-produits de l'olivier.*Optiom Méditerranéennes*, **16**: 101-108.
- Naczki, M., Shahidi, F.**(2004).Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054** : 95–111.
- Nkhili, E-Z.** (2009).Polyphénols de l'Alimentation: Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant.Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des pays de vaucluse, Montpellier.
- Norris, L.A.**(2003).Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecology*,**17** : 369–83.
- Ollivier, D., Boubault, E., Pinatel, C.,Souillol, S.,Guérère, M., Artaud, J.**(2004). Analyse de la fraction phénoliques des huiles d'olive vierges.*Annales des falsification,de l'expertise chimique et toxicologique*,2^{ème} Semestre, **965** : 169-196.

- Omar, S.H.** (2010).Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Science and Pharmacology*, **78** (2) : 133–154.
- Organisation mondiale de la santé (OMS).**(2011).Genève. Principales causes de décès dans le monde. *Aide-mémoire* N°310, www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/.
- Organisation mondiale de la santé (OMS).**(2003). Regime alimentaire, nutrition et Prevention des maladies chroniques. *Série de Rapports techniques*, N° **916**.
- Organisation mondiale de la santé (OMS).**(1958). Genève. Classification des lésions d'athérosclérose. *Série de Rapports Techniques*, **143** :1-22.
- Owen, RW., Mier, W., Giacosa, A., Hull, WE., Spiegelhalder, B., Bartsch, H.**(2000)a. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, single phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, **38** : 647-659.
- Owen, RW., Giacosa, A., Hull, WE., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H.** (2000)b.The antioxidant/ anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, **36**: 1235-1247.
- Owen, RW., Giacosa, A., Hull, WE., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch H.**(2000)c. Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncology*, **1**: 107–112.
- Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B,Bartsch H.** (2000)d. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil.*Clinical Chemistry*, **46** : 976–988.
- Owen RW, Haubner R, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H.** (2003).Isolation, structure, elucidation and antioxidant potential of the majorphenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes.*Food and Chemical Toxicology*, **41** : 703-717.
- Oyaizu, M.**(1986).Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44** : 307-315.
- Paraskevi, Moutsatsou.**(2007).The spectrum of phytoestrogens in nature : our knowledge is expanding. *Hormones*, **6** (3) : 173-193.
- Pauwels, E.K.** (2011).The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk.*Medical Principles and Practice*, **20** (2) : 103-11.
- Pawlaczyk, I., Czerchawski, L., Pilecki, W., Lamer-Zarawska, E., Gancarz, R.**(2009). Polyphenolic-polysaccharide compounds from selected medicinal plants of Asteraceae and Rosaceae families: Chemical characterization and blood anticoagulant activity. *Carbohydrate Polymers*, **77** : 568–575.
- Pawlaczyk, I., Czerchawski, L., Kuliczowski, W., Karolko, B., Pilecki, W., Witkiewicz, W., Gancarz, R.**(2011).Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L.*Thrombosis Research*, **127** : 328–340.
- Penna, C, Mancardi, D., Rastaldo, R., Pagliaro P.**(2009).Cardioprotection: A radical view Free radicals in pre and postconditioning.*Biochimica et Biophysica Acta*, **1787**: 781-793.
- Pereira, M. G., Benevides, N. M. B.,Melo, M. R. S.,Valente, A. P.,Meloc, F. R., Mourao, P. A. S.**(2005).Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?.*Carbohydrate Research*,**340** : 2015–2023.
- Pereira, J.A., Pereira, A. P. G.,Ferreira, I. C. F. R., Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R.,Estevinho, L., Bento, A.** (2006).Table olives from Portugal phenolic compounds antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry*, **54**(22): 8425-8431.
- Perez-Bonilla, M., Salido, S., Teris, A. van Beek, J., Linares-Palomino, Altarejos J., Nogueras, M., Sanchez, A.**(2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *Journal of Chromatography A*, **1112**: 311-318.
- Perez-Jimenez, F., Alvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L., Barja.**(2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. Consensus report, Jaen (Spain). (2004). *Journal of Clinical Investigation*, **35**: 421-424.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J.** (2010). Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 478-494.
- Peters, U, Poole, C, Arab, L.** (2001). Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, **154**: 495-503.
- Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, GF., Galli, C.** (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*, **78**:151-160.
- Petti, S., Scully, C.**(2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry*, **37**: 413-423.
- Pontes-Arruda, A.** (2009). Biological benefits of an oleic acid-rich lipid emulsion for parenteral nutrition. *Clinical Nutrition Supplements*, **4**: 19-23.
- Popovici, C., Ilonka, S., Bartek, T.** (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, **4**: 25-39.
- Potapovich, A. I., Lulli, D., Fidanza, P., Kostyuk, V. A., De Luca, C., Pastore, S., Korkina, L.G.**(2011). Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFκB and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **255**: 138-149.
- Price, M.L., Butler, L.G.**(1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of the tannin content of sorghum grain. *Journal of agricultural and food chemistry*, **25**: 1269-1273.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., Boskou, D.**(2000). α-tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** (5): 1770-1775.
- Pushpamali, W. A., Nikapitiya, C., De Zoysa, M., Whang, I., Kim, S. J., Lee, J.** (2008). Isolation and purification of an anticoagulant from fermented red seaweed *Lomentaria catenata*. *Carbohydrate Polymers*, **73**: 274-279.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B.B.**(2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radical Biology & Medicine*, **49**: 1603-1616.
- Rhizopoulou, S.**(2007). *Olea europaea* L.A Botanical contribution to culture. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, **2**(4): 382-387.
- Ribéreau-Garyon, P.** (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod Paris, **254**.
- Riov, J., Gottlieb, H.E.**(2006). Metabolism of auxin in pine tissues: Indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia Plantarum*, **50**: 347-352.
- Roberts, CK., Sindhu, K.K.**(2009). Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, **84**: 705-712.
- Rodriguez-Bernaldo, de Quirs, A., Lage-Yusty, M.A., Lopez-Hernandez, J.**(2009). HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, **42**: 1018-1022.

- Romero, C., Brenes, M., Garcia, P., Garrido, A.** (2002). Hidroxytyrosol 4- β -glucoside an important phenolic compounds in olive fruit and derived product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** : 3835-3839.
- Romero, C., Garcia, P., Brenes, M., Garcia, A., Garrido, A.** (2002). Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties. *European Food Research and Technology*, **215** : 482-496.
- Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., Garcia, P., Garcia A., Garrido, A.** (2004)a. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52** : 479-484.
- Romero, C., Brenes, M., García, P., García, A., Garrido, A.** (2004)b. Polyphenol changes during fermentation of naturally black olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52** (7) : 1973-1979.
- Russel, R., Franklin, H., Epstein, M.D.** (1999). Atherosclerosis— an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, **340** (2) : 115-126.
- Ryan, D., Robards K.** (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, **123** : 31-43.
- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S.** (1999). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, **34** : 265–274.
- Saija, A., Trombetta, D., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Princi, P., Uccella, N., Bonina, F., Castelli, F.** (1998). In vitro evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *International Journal of Pharmaceutics*, **166**: 123-133.
- Sakouhi, F., Harrabi, S., Absalon, C., Sbei, K., Boukhchina, S., Kallel, H.** (2008). α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives: Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chemistry*, **108** : 833-839.
- Saleh, N.K., Saleh, H.A.** (2011). Olive Oil effectively mitigates Ovariectomy induced Osteoporosis In Rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, p **11-10**.
- Samama, M.M., Gerotziafas, G.T., Elalamy, I., Horellou, M.H., Conard, J.** (2002). Biochemistry and clinical pharmacology of new anticoagulant agents. *Pathophysiol Thrombosis and Haemostasis*, **32** : 218-224.
- Sansoucy, R.** (1984). Utilisation des sous produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen. Etude FAO production et santé animale. p **43**.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V.** (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions *Tec & Doc*, p **398**.
- Savarese, M., De Marcoa, R., Sacchi, E.** (2007). Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **105** : 761–770.
- Sayadi, S., Bouaziz, M., Hammami, H., Bouallagui, Z., Jemai, H.** (2008). Production of antioxidants from olive processing by-products. *E. J .EAF .Chemistry*, **78** : 3231-3236.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C.** (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**: 287–306.
- Scalbert, A., Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, **130** : 2073-2085.
- Schlesier, K., Harwat, M., VBöhm., Bitsch R.** (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, **36** (2): 177-187.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G.** (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatogr A*, **1054** : 113–127.

- Sherwin, E. R.** (1976). Antioxidants for vegetable oils. *Journal of the American Chemical Society*, **53** : 430-436.
- Shimizu, H.** (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population : the Hisayama study, *Stroke*, **35** (9) : 2072-2077.
- Sies, H.** (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, **82** : 291-295.
- Singh, R.B., Dubnov, G., Niaz, M.A., Ghosh, S., Singh, R., Rastogi, S.S., Manor, O., Pella, D., Berry, E.M. (2002). Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study): A randomised single-blind trial. *Lancet*, **360** : 1455-1461.
- Singh, I., Mok, M., Christensen, A.M., Turner, A., Hawley, J.A. (2008). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **18** (2): 127-132.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A., Jr.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16** : 144-158.
- Somova, L.I., Shode, F.O., Ramnanan, P., Nadar A. (2003). Antihypertensive, anti-atherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subsp. *africana*, leaves. *Journal Ethnopharmacology*, **84** (2-3) : 299-305.
- Soler-Rivas, C., Espin, J., Wichers, C.H.J.** (2007). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80** : 1013-1023.
- Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Bento, A., Pereira, A.** (2008). Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". *Learning with Technologies*, **41** : 739-745.
- Sousa, A., Casal, S.S., Bento, A.A., Malheiro, R.R., Oliveira, B.M., Alberto, J. J., Pereira, A.** (2011). Chemical characterization of "alcaparras" stoned table olives from northeast Portugal. *Molecules*, **16** (11) : 9025-9040.
- Stark, A.H., Madar, Z.** (2002). Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutrition Reviews*, **60** : 170-176.
- Stavric, B.** (1994). Role of chemopreventers in human diet. *Clinical Biochemistry*, **27**: 319-332.
- Szent Gyorgyi, A.** (1938). Crystallized vitamin C and hexuronic acid Cox. *Science*, p 540-542.
- Terpinc, P., Bezjak, M., Abramovic, H.** (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, **115** : 740-744.
- Tirzitis, G., Bartosz, G.** (2010). Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, **57** : 139-142.
- Torres de pinedo, A., Pen alver, P., Morales, J.C.** (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant : structure-activity relationship. *Food Chemistry*, **103** : 55-61.
- Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., Trichopoulos, D.** (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *The New England Journal of Medicine*, **348** : 2599-2608.
- Tripodi A.** (2009). Tests of Coagulation in Liver Disease. *Clinics in Liver Disease*, **13**: 55-61.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M.** (2005). The phenolic compounds of olive oil : structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, **18** : 98-112.

- Trovato, A., Forestieri, A.M., Iauk, L., Barbera, R., Monforte, M.T., Galati, E.M.** (1993). Hypoglycaemic activity of different extracts of *Olea europaea* L. in the rat. *Plantes Med Phytother*, **26** (4) : 300-308.
- Tuck, K. L., Hayball, P. J.** (2002). Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13** : 636-644.
- Turner, R.** (2005). Antioxidant and anti-atherogenic activities of olive oil phenolics. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **75** (1) : 61-70.
- Vassiliki, T., Papoti, M., Tsimidou, Z.** (2009). Looking through the qualities of a fluorimetric assay for the total phenol content estimation in virgin olive oil, olive fruit or leaf polar extract. *Food Chemistry*, **112** : 246-252.
- Vendemiaie, G., Grattagliano, I., Altomare, E.** (1999). An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, **29** : 49-55.
- Venkat- Ratnam, D., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Ravi Kumar, M.N.V.** (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, **113** : 189-207.
- Villano, D., Fernandez-Pachon, M.S., Moya, M.L., Troncoso, A.M., Garcia-Parilla, M.C.** (2007). Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, **71** : 230-235.
- Viola, P., Viola, M.** (2009). Virgin olive oil as a fundamental nutritional component and skin protector. *Clinics in Dermatology*, **27** : 159-165.
- Virost, M., Tomao, V., Ginies, C., Visinoni, F., Chemat, F.** (2008). Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *The Journal of Chromatography A*, **1197** : 57-64.
- Visioli, F., Galli, C.** (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences*, **55** : 1965-1971.
- Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G., Galli, C.** (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, **117** : 25-32.
- Visioli, F., Galli, C.** (1995). Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease: the potential role of olive oil and its minor constituents. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **5** : 306-314.
- Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C.** (1998)a. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **247** : 60-64.
- Visioli, F., Bellosta, S., Galli, C.** (1998)b. Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sciences*, **62** : 541-546.
- Visioli, F., Galli, C.** (2001). Antiatherogenic components of olive oil. *Current Atherosclerosis Reports*, **3** : 64-67.
- Visioli, F., Poli A., Galli, C.** (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, **22** : 65-75.
- Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., Sirtori, C., Galli, C.** (2005). Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *European Journal of Nutrition*, **44** : 121-127.
- Vogler, A.E., Siedlecki, A.C.** (2009). Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials*, **30** : 1857-1869.
- Wagner, W.L., Herbst, D.R., Sohmer, S.H.** (1999). *Manual of the Flowering Plants of Hawai'i*. 2 vols. Bishop Museum Special Publication 83, University of Hawai'i and Bishop Museum Press, **4** : 1-9.
- Wiseman, S., Mathot, J., De Fouw, N., Tijburg, L.** (1996). Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density

- lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*, **120**: 15-23.
- Xiuzhen, H., Tao, S., Hongxiang, L.** (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, **8** : 950-988.
- Yang, J- Y., Yumin, D., Ronghua, H., Yunyang, W., Yan, W.** (2005). The structure-anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide. Effect of carboxyl group and position of sulfation. *International Journal of Biological Macromolecules*, **36**: 9-15.
- Yoon, S-J., Pereira, M. S., Pavao, M. S.G., Hwang, J-K., Pyun, Y-R., Mourao, P.A.S.** (2002). The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. *Thrombosis Research*, **106** :51- 58.
- Zandecki, M.** (2006). Physiologie de la coagulation. *Hématologie biologique*, Faculté de Médecine – CHU 49000 Angers France, p 1-5.
- Zhou, H-Y., Hong, J-L., Shu, P., Juan Ni, Y., Qin, M. J.** (2009). A new dicoumarin and anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino. *Fitoterapia*, **80** : 283-285.

Annexes

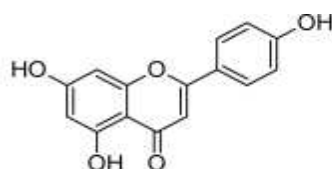
Les différentes variétés d'olive cultivées en Algérie (source du document COI : conseil oléicole internationale)

N°	Code	Variété d'olive	N°	Code	Variété d'olive
1	SAA000155	Bouchouk	33	SAA000117	Abani
2	SAA000157	Souidi	34	SAA000119	Aaleh
3	SAA000159	Ferkani	35	SAA000153	Bouchouk lafayette
4	SAA000191	Sigoise	36	SAA000591	Aharoun
5	SAA000193	Akerma	38	SAA000603	Taliani
6	SAA000195	Aghenfas	39	SAA000605	Blanquette
7	SAA000197	Boughenfous	40	SAA000607	Gerboua
8	SAA000199	Mekki	41	SAA000608	Olive De Guelma
9	SAA000229	Bouchouk guergour	42	SAA000615	Issoual
10	SAA000231	Aghchren d'el ousseur	43	SAA000616	Selti
11	SAA000234	Aguenau	45	SAA000617	Balbale
12	SAA000237	Zeletn	46	SAA000618	Bouchoukra
13	SAA000239	Neb Djemel	47	SAA000619	Derdi
14	SAA000274	Aghchren de titest	48	SAA000552	Abeskri
15	SAA000543	Chemlal	49	SAA000553	Azeboudj
16	SAA000035	Takesrit	50	SAA000554	Khadraya
17	SAA000036	Grosse du hamma	51	SAA000555	Azougagh
18	SAA000075	Boukaila	52	SAA000558	Akenane
19	SAA000076	Bouricha	53	SAA000578	Ahia ousbaa
20	SAA000115	Bouichret	54	SAA000579	Zeboudj boudoudane
21	SAA000116	Aime	55	SAA000580	Azeboudj
22	SAA000269	Agrarez	56	SAA000581	Biskri
23	SAA000270	Azeradj	57	SAA000582	Zitoun
24	SAA000271	Aberkane	58	SAA000583	Blanquette de gastu
25	SAA000013	Blanquette de guelma	59	SAA000584	Rougette
26	SAA000017	Ronde de miliana	60	SAA000548	Agrarez (Setif)
27	SAA000019	Longue de miliana	61	SAA000550	Atounsi (Setif)
28	SAA000033	Tabelout	62	SAA000551	Aghchren (Setif)
29	SAA000037	Rougette de mitidja	63	SAA000559	Aguenau (Setif)

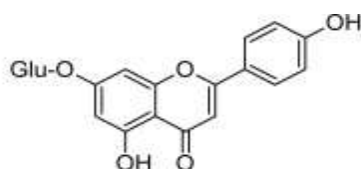
Les différentes variétés d'olive cultivées en Algérie (source du document COI : conseil oléicole internationale)

30	SAA000077	Limli	64	SAA000549	Aimel (Setif)	
31	SAA000073	Hamra	65	SAA000560	Altifane	72
32	SAA000113	Tefah	66	SAA000561	Abouchouk (Setif)	73
N	Code	Variété d'olive		 Source de document : COI		
67	SAA000562	Tabouchoukt (Setif)	67			
68	SAA000563	Aghenfas (Tamokra)	68			
69	SAA000565	Azeradj (Tamokra)	69			
70	SAA000566	Abouchouk (Tamokra)	70			
71	SAA000567	Akerma (Tamokra)	71			

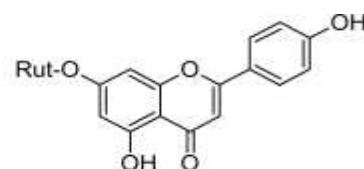
Structures chimiques des Polyphénols identifiés dans les fruits , les feuilles et les huiles d'olive classées par ordre alphabétique(Omar, S.H.,2010).



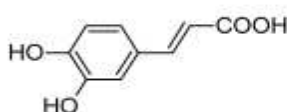
Apigenin



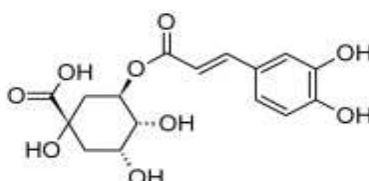
Apigenin-7-glucoside



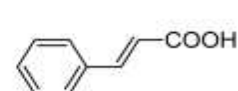
Apigenin-7-rutinoside



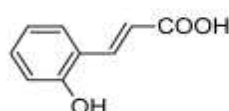
Caffeic acid



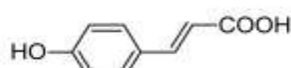
5-Caffeoylquinic acid



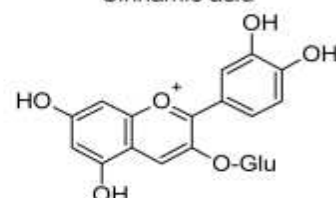
Cinnamic acid



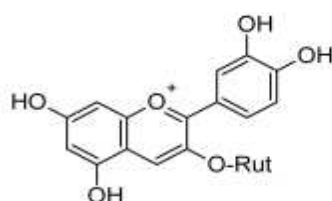
o-Coumaric acid



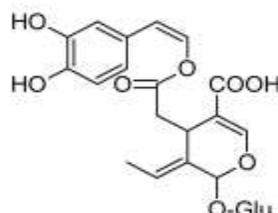
p-Coumaric acid



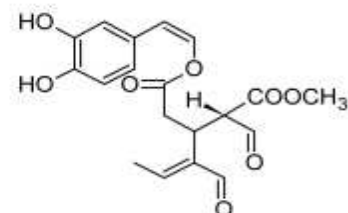
Cyanidin-3-glucoside



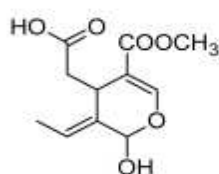
Cyanidin-3-rutinoside



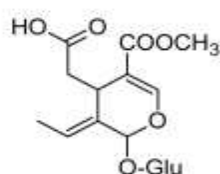
Demethylleuropein



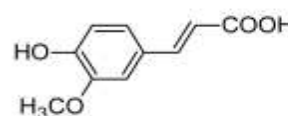
3,4-DHPEA-EDA



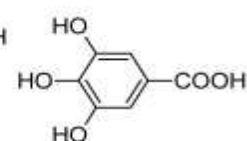
Elenoic Acid



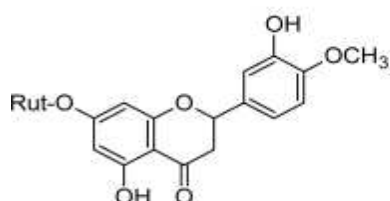
Elenoic acid glucoside



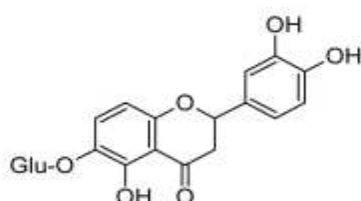
Ferulic acid



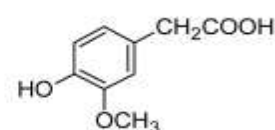
Gallic acid



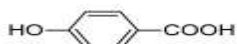
Hesperidin



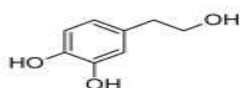
Homoorientin



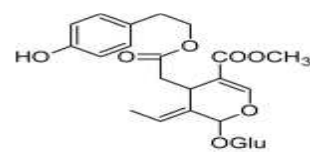
Homovanillic acid



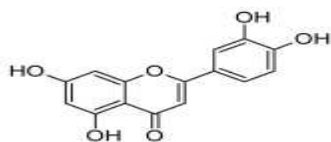
4-Hydroxybenzoic acid



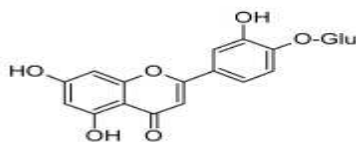
Hydroxytyrosol



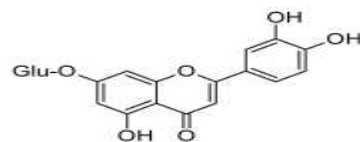
Ligstroside



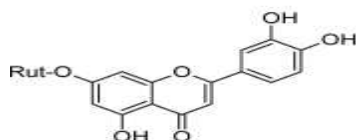
Luteolin



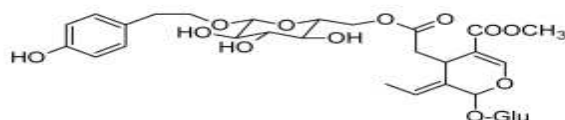
Luteolin-4-glucoside



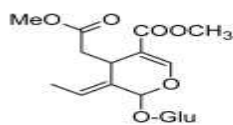
Luteolin-7-glucoside



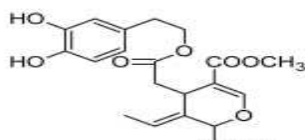
Luteolin-7-rutinoside



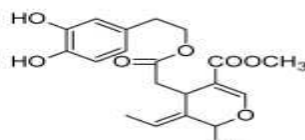
Nüzhenide



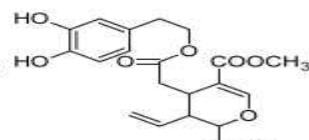
Oleoside



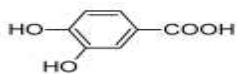
Oleuropein



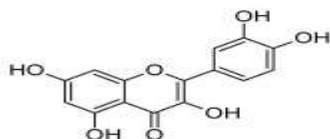
Oleuropein aglycon



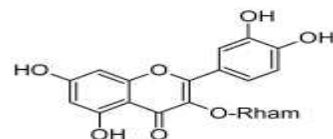
Oleurosides



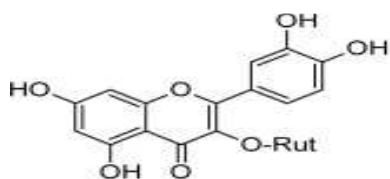
Protocatechuic acid



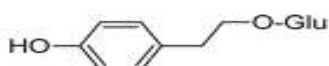
Quercetin



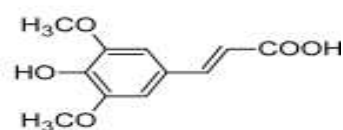
Quercitrin



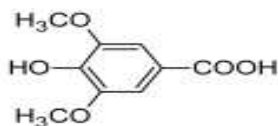
Rutin



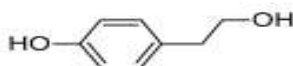
Salidroside



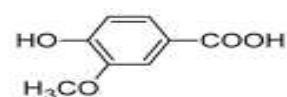
Sinapic acid



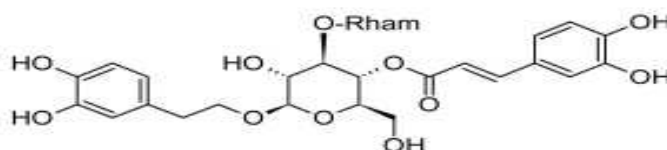
Syringic acid



Tyrosol

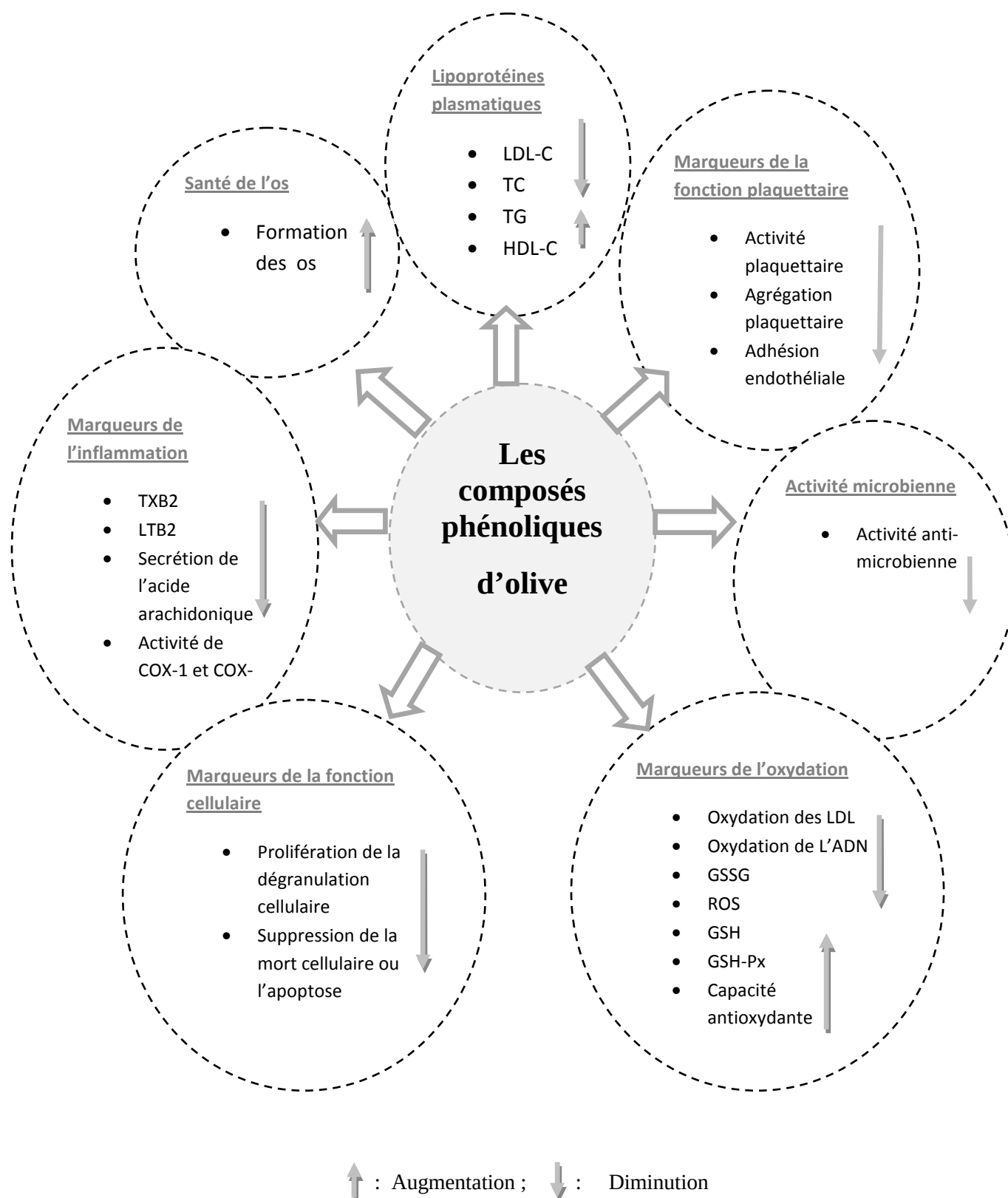


Vanillic acid



Verbascoside

Les effets bénéfiques des composés phénoliques des olives sur la santé (Cicerale, Conlan, Sinclair, & Keast, 2009; Cicerale, Lucas, & Keast, 2010).



Les principaux activités biologiques exercées par l'olive

Activités biologiques	Références bibliographiques
Antioxydante directe	(Owen <i>et al.</i> , 2000) (Amro, <i>et al.</i> , 2002) (Somova, <i>et al.</i> , 2003) (Turner, 2005) (Jemai, <i>et al.</i> , 2008)
Activité anti-inflammatoire Inhibition de la phospholipase A2 Inhibition de la libération de l'acide arachidonique Inhibition de la lipooxygénase et de la cyclooxygénase	(Petroni <i>et al.</i> , 1995) (Fehri, <i>et al.</i> , 1996) (De la Puerta, 1999) (Miles, <i>et al.</i> , 2005)
Activité cardioprotectrice Inhibition de l'agrégation plaquettaire Activité antiathérogénique Inhibition de l'oxydation des LDL	(Circosta, <i>et al.</i> , 1990) (Andrikopoulos, <i>et al.</i> , 2002) (Somova, <i>et al.</i> , 2003) (Ferroni, <i>et al.</i> , 2004) (Manna, <i>et al.</i> , 2004) (Turner, 2005) (Haralabos, <i>et al.</i> , 2006) (Singh, <i>et al.</i> , 2008)
Activité hypolipidimique Réduction du taux du cholestérol plasmatique Activité hypocholestérolémiante	(Andreadou, <i>et al.</i> , 2006) (Jemai <i>et al.</i> , 2008) (Omar, S.H., 2010)
Stimulation du système immunitaire, Activité antimicrobienne Activité antiviral activité antiallergique	(Fleming, <i>et al.</i> , 1973) (Bisignano, <i>et al.</i> , 1999) (Lee-Huang, <i>et al.</i> , 2003)
Protection de la peau	(Battinelli, <i>et al.</i> , 2006) (Viola, et Viola, 2009)
Activité anticancéreuse, antitumorale antiproliférative	(Owen, RW., Giocosa, A., 2000) (Fki, <i>et al.</i> , 2005) (Hamdi, et Castellon, 2005)
Activité antidiabétique Activité hypoglycémiante	(Gonzalez, <i>et al.</i> , 1992) (Trovato, <i>et al.</i> , 1993) (Al-Azzawie, <i>et al.</i> , 2006) (Omar, S.H., 2010)
Activité antihypertensive, hypotensive	(Cherif, <i>et al.</i> , 1996) (Ferrara, <i>et al.</i> , 2000) (Khayyal, <i>et al.</i> , 2002) (Somova, <i>et al.</i> , 2003)

Résumé

L'objectif de cette étude est l'évaluation des activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols obtenus à partir des extraits de pulpe d'olive (*Olea europaea* L.) de deux variétés cultivées à Sétif. La caractérisation pomologique des deux variétés étudiées a montré une différence inter-variétale en terme de poids, largeur, longueur, taux d'humidité et de la teneur en huile et son contenu en polyphénols. L'analyse quantitative des extraits a révélée une richesse des olives par les polyphénols et les flavonoïdes mais le contenu en flavonoïdes est faible par rapport à celui des polyphénols pour les deux variétés étudiées. L'analyse qualitative des deux extraits polyphénoliques par CCM a révélé la présence de nombreux constituants, parmi lesquels l'oleuropéine, le tyrosol, la catéchine, la rutine, la quercitine, la vanilline et l'acide gallique. Le pouvoir antioxydant de ces extraits a été évalué *in vitro* par les tests du DPPH^{*}, du blanchissement de β -carotène et du pouvoir réducteur. Des résultats obtenus, il ressort que ces polyphénols ont une grande capacité de piéger le radical DPPH^{*} avec des CI_{50} de 2,585 et 4,625 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait de la variété Bouchouk et l'extrait de la variété Khanfes respectivement. Cette capacité antioxydante est confirmée par les tests du blanchissement de β -carotène et du pouvoir réducteur. En effet, ces polyphénols sont aussi capables d'inhiber la peroxydation lipidique avec des pourcentages appréciables de l'ordre de 97,27% et 94,45 % et elles possèdent un très grand pouvoir réducteur avec des CE_{50} de 5,055 et 6,110 $\mu\text{g/ml}$ pour les extraits des variétés Bouchouk et Khanfes respectivement. L'activité anticoagulante des extraits de polyphénols d'olive a été également évaluée *in vitro* en utilisant les tests du temps de Quick (TQ) et du temps de céphaline-kaolin(TCK). Les temps de coagulation obtenus sur un plasma normal en présence des ces polyphénols indiquent qu'ils exercent une grande activité anticoagulante sur les deux voies de la coagulation mais cette activité est plus marquée sur la voie endogène que sur la voie exogène.

Mots clés: *Olea europaea* L , polyphénols , espèces réactives , thrombose , activité antioxydante ,activité anticoagulante.

Abstract

The objective of this study is the evaluation of antioxidant and anticoagulant activities of polyphenols obtained from extracts of olive pulp (*Olea europaea* L.) of two varieties cultivated in Setif. The Pomological characterization for the two varieties studied showed a difference between them in terms of weight, width, length, humidity and oil content and its polyphenol content. Quantitative analysis of extracts revealed a wealth of olives by polyphenols and flavonoids, but the content in flavonoids is low compared to that of polyphenols for both studied varieties. Qualitative analysis of two polyphenolic extracts by TLC revealed the presence of numerous constituents, including oleuropein, tyrosol, catechin, rutin, quercitin, vanillin and gallic acid. The antioxidant capacity of this polyphenolic extract was evaluated *in vitro* by three different tests: DPPH^{*} free radical scavenging assay, β -carotene bleaching test and reducing power assay. The extract demonstrated a great capacity to scavenge the DPPH^{*} radical with an IC_{50} equal to 2.585 and 4.625 $\mu\text{g/ml}$ for the variety Bouchouk extract and for the variety Knanfes extract, respectively. This antioxidant capacity is confirmed by the β -carotene bleaching assay and the reducing power test. Indeed, these extracts are also able to inhibit lipid peroxydation with respectable percentages of about 97.27 % for the extract of Bouchouk variety and 94.45% for the extract of Khanfes variety and they have a great reducing power with an EC_{50} of 5.055 and 6.110 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The anticoagulant activity of olive polyphenols was also evaluated *in vitro* by using two tests: the test of the cephalin-kaolin time and the test of Quick time. The times of coagulation obtained on normal plasma in the presence of these polyphenols indicate that they carry an anticoagulant activity on the two pathways of coagulation but this activity is highly marked on the endogenous pathway than on the exogenous pathway.

Key words: *Olea europaea* L , polyphenols , reactive species , thrombosis , antioxidant activity, anticoagulant activity.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاطات المضادة للأكسدة و تخثر الدم لعديدات الفينول المستخلصة من لب الزيتون (*Olea europaea* L.) لـصنفين مزروعين بسطيف. أظهرت الدراسة الوصفية أن هناك فرق بين الصنفين المدروسين من حيث الوزن، الطول، العرض، نسبة الرطوبة، محتوى الزيت ونسبة عديدات الفينول في هذا الأخير التحليل الكمي للمستخلصات كشف عن ثراء الزيتون بعديدات الفينول والفلافونويد، ولكن يعتبر المحتوى في الفلافونويد منخفضاً مقارنة بالمحتوى من البولي فينول لكل من الصنفين المدروسين. التحليل النوعي لمستخلصي البولي فينول بـكروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة أظهر وجود العديد من المركبات منها: *oleuropeine*, *tyrosol*, *catéchine*, *rutine*, *quercitine*, *acide gallique* و *vanilline*. النشاطية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات تم تقديرها في الزجاج باستعمال إختبارات DPPH^{*}، إبيضاض البيتا-كاروتان، و القدرة الإرجاعية. من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح بأن هذه المستخلصات تملك قدرة عالية على إلتقاط الجذر الحر DPPH^{*} وب IC_{50} تعادل 2,585 و 4,625 ميكروغرام/مل بالنسبة لمستخلص الزيتون من الصنف بوشوك و مستخلص الصنف خنفاس على التوالي. هذه النشاطية المضادة للأكسدة تم تأكيدها بإختبار إبيضاض البيتا-كاروتان و القدرة الإرجاعية، إذ أن هذه المستخلصات قادرة أيضاً على تثبيط الأكسدة الليبيدية و بنسب معتبرة تعادل 97,27% بالنسبة لمستخلص الزيتون من الصنف بوشوك و 94,45 % بالنسبة لمستخلص الصنف خنفاس، و من جهة أخرى هذه المستخلصات تملك قدرة إرجاعية عالية تظهر من خلال EC_{50} تعادل 5,055 و 6,110 ميكروغرام/مل على التوالي. النشاطية المضادة للتخثر لمستخلصات عديدات الفينول للزيتون تم تقديرها أيضاً في الزجاج باستعمال إختبارين: إختبار زمن كويك (TQ) و إختبار زمن Céphaline-kaolin (TCK). أزمنة التخثر المتحصل عليها في بلازما عادية بوجود هذه المستخلصات تظهر بأن مواد الأيض هذه تمارس نشاطية مضادة للتخثر على كلا مسريي التخثر الدموي وبأن هذه النشاطية تكون أكثر فاعلية على المسرى الداخلي مقارنة مع المسرى الخارجي.

الكلمات المفتاحية: *Olea europaea* L. ، عديدات الفينول ، الأنواع النشطة ، مرض تجلط الدم ، النشاطية المضادة للأكسدة ، النشاطية المضادة للتخثر.