

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



MÉMOIRE

Présenté par

RAMDAOUI Soufiane
ROUABI Soufyane

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences biologiques : Biochimie

Thème

**Evaluation des propriétés antioxydantes des extraits des feuilles
de l'olivier cultivé (*Olea europaea* L)**

Soutenu le 23 / 06 / 2022, devant le jury composé de :

Président :	M ^R AZZI R.	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur :	M ^R CHAUCHE M.T.	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen
Promotrice :	M ^{lle} MEZOUAR D.	Maitre de conférences A	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022



Remerciements



Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire pédagogique Labo n° 2 pôle Biochimie de faculté des sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'univers
Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen



A la grâce de **DIEU** et la puissance nous a donne le courage, la volonté et la réussite qu'il nous a accordé toutes le déroulement de nos formation, et de bien arriver à la fin du travail.

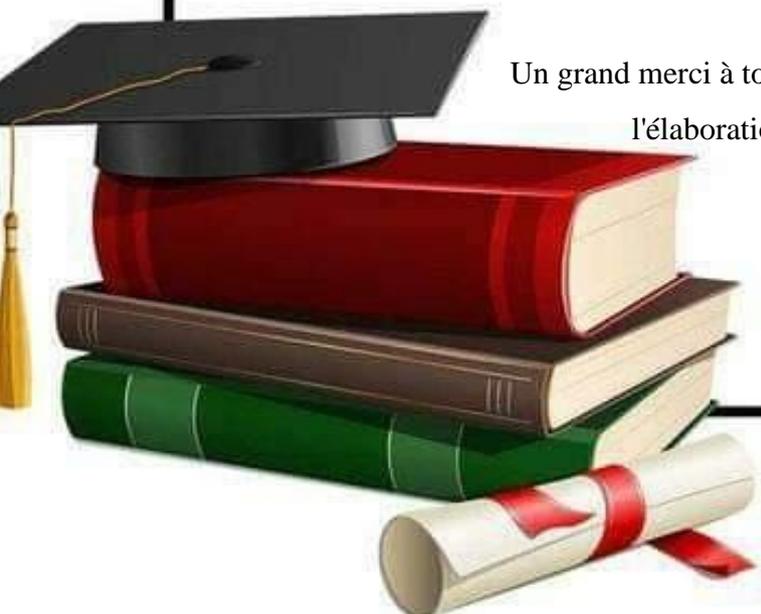


Nous exprimons nos remerciements **À** notre promotrice, **M^{lle} MEZOUAR D** Maître de conférences classe A au département de Biologie Faculté SNV-STU Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen pour sa patience, sa disponibilité, le temps qu'il consacré m'apporter les outils méthodologiques indispensables pour la conduite de cette recherche et n'oublions jamais ses critiques bénéfiques pour nous diriger vers un esprit scientifique.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements **À M^r AZZI R** Professeur au département de Biologie, Faculté du SNV-STU, Université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen, pour l'avoir accepté comme membre du jury et nous avoir fait l'honneur de présider notre travail.

Nous adressons également nos vifs remerciements **À M^r CHAUCHE M.T.** Maître de conférences classe A au département de Biologie Faculté SNV-STU, Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.





Dédicaces

Je dédie ce travail



A mes très chers parents, source de vie, d'amour et l'affection,

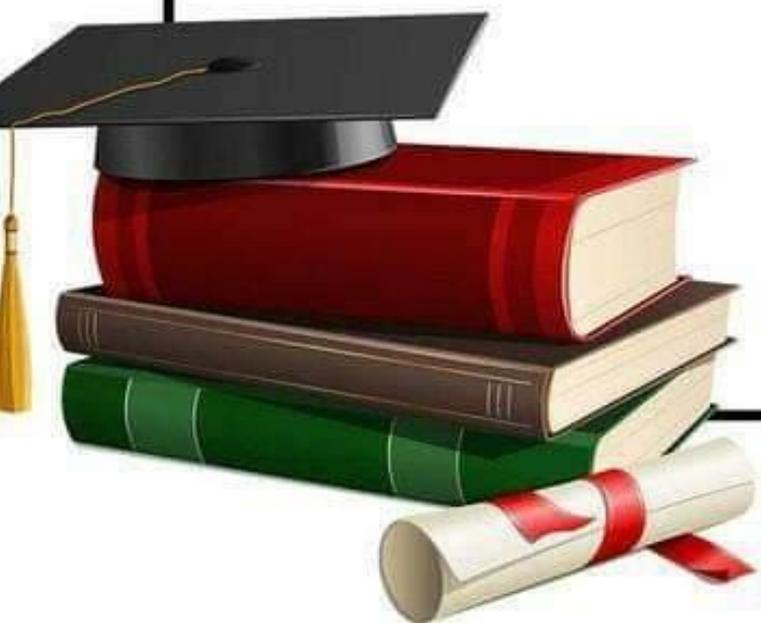
A mes chers frères et ma sœur, source de joie et de bonheur,

A toute les membres de ma famille, source d'espoir et de motivation,



A tous mes amies de la promotion de master en biochimie.

Soufiane





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail



À celle qui m'a soutenu dans ses prières et ses supplications, À celle qui partage mes joies et mes peines, À la source de bonté et de tendresse À la femme la plus merveilleuse qui soit
ma chère mère,

À ceux qui m'ont appris que le monde est un combat dont l'arme est la science et le savoir,
À celui qui ne m'a rien épargné, À ceux qui cherchaient mon confort et mon succès À
l'homme le plus grand et le plus cher dans l'univers, **mon cher père,**
Que Dieu les protège et prenne soin d'eux.

À mes chères sœurs qui m'ont soutenu jusqu'au dernier moment **Amira et Ahlam.**

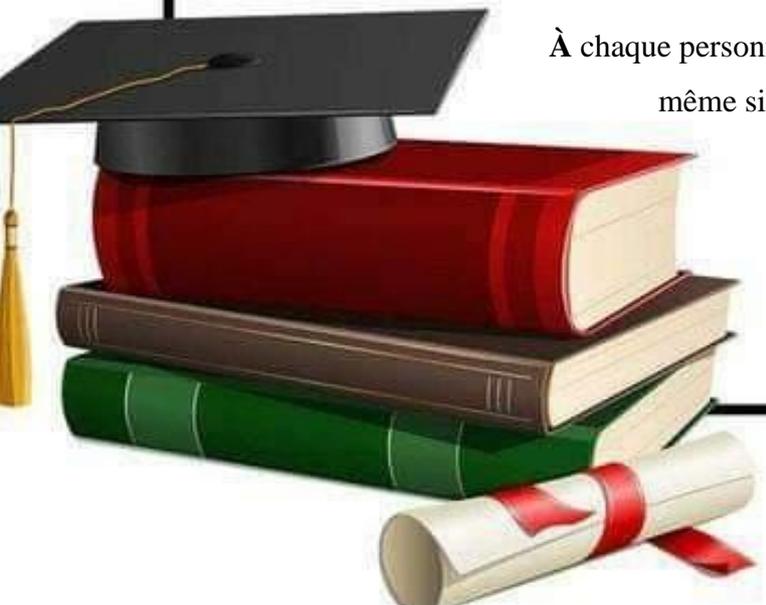
À toutes **mes familles** petites et grandes.

À mes amis **Abdellatif, Khalil, Walid, Amine, Ilyes et Samir** aussi **Abdelmoula, Zine Eddine, Chihab, Ibrahim et Rawida, Feryel, Téma** qui ont eu un grand impact pour surmonter les difficultés et les obstacles.

À mon binôme **Soufyane** et mes professeurs respectés sur tout **Dr. Medjedoub H** qui n'ont pas hésités à m'aider.

À chaque personne qui a été créditée de ma carrière et m'a aidé, même si c'était facile.

Soufyane



المخلص

المواد الطبيعية المستخلصة من النباتات لها خصائص متعددة لاستغلالها في التكنولوجيا الحيوية باستعمالها في المواد الغذائية، مستحضرات التجميل والمستحضرات الصيدلانية. تتضمن هذه المواد نسبة كبيرة من المركبات الثانوية التي يتضح استعمالها في العديد من المجالات ومنها العلاج. في هذا السياق، نقوم بالبحث عن النشاط المضاد للأوكسدة لشجرة الزيتون وهي نبات طبي تنتمي إلى عائلة الزيتونية تستخدم على نطاق واسع في العلاجات التقليدية لخصائصها البيولوجية العديدة.

خضعت أوراق هذا النبات للاستخراج بالرّد لمدة ثلاث ساعات باستخدام ثلاث مذيبات وهم ماء/أسيتون (70/30؛ ج/ج)، ماء/ميثانول (70/30؛ ج/ج) والماء المقطر. المرذود من المستخلصات الثلاث هو: 12.92%، 14.37% و 20.22%. أظهر الفحص النوعي الكيميائي الذي أجري على أوراق نبات شجرة الزيتون وجود الثانينات، التيربينويدات، السابونوسيدات والسكريات المختزلة بكميات كبيرة، كما كشف عن وجود كميات أقل من الفلافونويد والجليكوزيدات القلبية. تم إجراء التحليل الكمي لمركبات البوليفينول والفلافونويد في المستخلصات والتي أظهرت وجود كميات كبيرة من إجمالي البوليفينول والفلافونويد. مستخلص الهيدروميثانول الذي تم الحصول عليه عن طريق الاستخلاص تحت التكثيف الراجع يحتوي على أكبر كمية من هذه المكونات مقارنة بالمستخلصات الأخرى حيث بلغت نسبة هذه المحتويات (0.03 ± 192 ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ من المستخلص و 0.01 ± 253 ملغ مكافئ كاتشين/غ من المستخلص)، يليه مستخلص الهيدروأسيتون (0.05 ± 128 ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ من المستخلص و 0.08 ± 181 ملغ مكافئ كاتشين/غ من المستخلص) وأخيرا المستخلص المائي (0.01 ± 80 ملغ مكافئ حمض الغاليك/غ من المستخلص و 0.08 ± 145 ملغ مكافئ كاتشين/غ من المستخلص).

تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة لمستخلصات أوراق الزيتون بطريقتين هما: تثبيط الجذر الحر* DPPH وإرجاع الحديد FRAP.

في الطريقة الأولى، أظهرت النتائج أن مستخلص الهيدروأسيتون لأوراق الزيتون له أعلى نشاط مضاد للجذور الحرة بتركيز مثبط 50 يبلغ 0.09 ± 5.69 ميكروغرام/مل مقارنة بمستخلص الهيدروميثانول والمستخلص المائي حيث بلغت قيمة التركيز المثبط 50 للمستخلصين (0.11 ± 7.09 ميكروغرام/مل و 0.07 ± 15.18 ميكروغرام/مل على التوالي). بالنسبة للطريقة الثانية، أظهرت النتائج أن مستخلص الهيدروميثانول يملك أفضل نشاط لإرجاع الحديد حيث بلغت قيمة التركيز الفعال 50 (0.07 ± 0.42 ملغ/مل) يليه مستخلص الهيدروأسيتون والمستخلص المائي حيث بلغت قيمة التركيز الفعال 50 للمستخلصين (0.08 ± 0.52 ملغ/مل و 0.05 ± 0.54 ملغ/مل على التوالي). النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة توضح ثراء أوراق نبات الزيتون بالمواد الكيميائية وهي الثانينات، السابونوسيدات، التيربينويدات والسكريات المختزلة التي قد تمثل مصدرا جديدا للجزيئات البيولوجية النشطة المحتملة في العلاج.

الكلمات المفتاحية : *Olea europaea* ، النباتات الطبية، النشاط المضاد للأوكسدة، المستخلصات الخامة،

الفحص الكيميائي النباتي النوعي.

Résumé

Les substances naturelles issues des végétaux présentent des intérêts multiples mis à profit dans la biotechnologie tant dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Parmi ces composés on retrouve une grande partie des métabolites secondaires qui se sont illustrés dans beaucoup de domaines et même en thérapie. Dans ce contexte, nous avons recherché l'activité antioxydante d'*Olea europaea* L, une plante médicinale appartenant à la famille des Oleaceae, elle est largement utilisée dans les remèdes traditionnels pour ses nombreuses propriétés biologiques.

Les feuilles de cette plante ont été soumises à une extraction sous reflux pendant 3h en utilisant trois solvants eau/acétone (30/70 ; v/v), eau/méthanol (30/70 ; v/v), et l'eau distillée. Les rendements respectifs des trois extraits sont : 12.92%, 14.37% et 20.22%.

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les feuilles d'olivier a montré la présence des tanins, les terpénoïdes, les saponosides et les sucres réducteurs en quantité importante, il a en outre révélé des quantités plus faibles des flavonoïdes et des glycosides cardiaques.

Une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes des extraits est réalisée, montrant des teneurs importants en polyphénols totaux et en flavonoïdes. L'extrait hydrométhanolique obtenu par extraction sous reflux est plus riche en ces constituants par rapport aux autres extraits où les teneurs sont de l'ordre de (192 ± 0.03 mg Eq AG/g d'extrait et 253 ± 0.01 mg Eq C/g d'extrait), suivi par l'extrait hydroacétonique (128 ± 0.05 mg Eq AG/g d'extrait et 181 ± 0.08 mg Eq C/g d'extrait) et enfin l'extrait aqueux (80 ± 0.01 mg Eq AG/g d'extrait et 145 ± 0.06 mg Eq C/g d'extrait).

L'activité antioxydante des extraits des feuilles d'olivier a été évaluée par deux méthodes: le piégeage de radical libre DPPH[•] et la réduction du fer FRAP.

Pour la première méthode, les résultats révèlent que l'extrait hydroacétonique des feuilles d'olivier présente l'activité la plus élevée avec un CI_{50} de 5.69 ± 0.09 µg/mL par rapport à l'extrait hydrométhanolique et l'extrait aqueux où les CI_{50} sont de l'ordre de 7.09 ± 0.11 et 15.18 ± 0.07 µg/mL, respectivement.

Pour la deuxième méthode, les résultats révèlent que l'extrait hydrométhanolique a présenté le plus d'activité pour réduire le fer avec une CE_{50} de 0.42 ± 0.07 mg/mL suivi par l'extrait hydroacétonique et l'extrait aqueux où les CE_{50} sont de l'ordre de 0.52 ± 0.08 et 0.54 ± 0.05 mg/mL respectivement.

Les résultats obtenus dans cette étude, montre la richesse des feuilles d'*Olea europaea* en substances chimiques telle que les tanins, les terpénoïdes, les saponines et les sucres réducteurs qui pourraient représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives en thérapeutique.

Mots clés : *Olea europaea*, plantes médicinales, activité antioxydante, extraits bruts, screening phytochimique.

Abstract

Natural substances from plants have multiple interests exploited in the biotechnology industries both in food, cosmetic and pharmaceutical. These compounds include a large proportion of secondary metabolites which are illustrated in many areas and even in therapy. In this context, we have searched for the antioxidant activity of *Olea europaea* a medicinal plant belonging to the Oleaceae family it is widely used in traditional remedies for its many biological properties.

The leaves of this plant were subjected to extraction under reflux for 3 hours using three solvents water/acetone (30/70 ; v/v) and water/methanol (30/70 ; v/v) and distilled water. The respective yields for the three solvents are: 12.92%, 14.37% and 20.22%.

The qualitative phytochemical examination carried out on the olive leaves showed the presence of tannins, terpenoids, saponins and reducing sugars in large quantities, it also revealed lower amounts of flavonoids and cardiac glycosides.

A quantitative analysis of the polyphenols and flavonoids of the extracts is carried out, showing high levels of total polyphenols and flavonoids. The hydromethanolic extract obtained by extraction under reflux is richer in these constituents compared with other extracts where the contents are of the order of (192 ± 0.03mg Eq AG/g of extract and 253 ± 0.01mg Eq C/g of extract) , followed by the hydroacetic extract (128 ± 0.05mg Eq AG/g of extract and 181 ± 0.08 mg Eq C/g of extract) and finally the aqueous extract (80 ± 0.01mg Eq AG/g of extract and 145 ± 0.06mg Eq C/g of extract).

The antioxidant activity of olive leaf extracts was evaluated by two methods : DPPH• free radical scavenging and FRAP iron reduction.

For the first method, the results show that the hydroacetic extract of olive leaves presents the highest activity with an IC₅₀ of 5.69 ± 0.09µg/mL compared to the hydromethanolic extract and the aqueous extract where the IC₅₀ are of the order of 7.09 ± 0.11 and 15.18 ± 0.07 µg/mL respectively.

For the second method, the results show that the hydromethanolic extract presented the most activity to reduce iron with an EC₅₀ of 0.42 ± 0.07mg/mL followed by the hydroacetic extract and the aqueous extract where the EC₅₀ are of the order of 0.52 ± 0.08 and 0.54 ± 0.05 mg/mL respectively.

The results obtained in this study show the richness of leaves of *Olea europaea* such as tannins, terpenoids, saponins and reducing sugars with chemical substances and may represent a new potential source of bioactive compounds in therapy.

Keywords : *Olea europaea*, Medicinal plant, Antioxidant activity, Crude extracts, phytochemical screening.

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre 1 : L'olivier <i>Olea europaea</i> L.	5
I. Introduction :.....	5
II. Description botanique	5
III. Répartition géographique	6
1. Dans le Monde	6
2. En Algérie	7
IV. Les feuilles d'Olivier.....	8
1. Utilisation des feuilles en médecine traditionnelle.....	8
2. Composition chimiques	8
3. Intérêt des feuilles d'olivier pour la santé	10
Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydants	12
I. Les Radicaux libres	12
1. Définition	12
2. L'origine des radicaux libres.....	12
2.1. Radicaux libres externes (source exogène)	12
2.2. Radicaux libre internes (source interne).....	13
3. Les principaux radicaux libres	13
3.1. Espèce réactives dérivées de l'oxygène (ERO).....	13
3.1.1. Espèce radicalaire	14
a. Anion superoxyde (O_2^*).....	14
b. Radical hydroxyl (OH^*).....	14
3.1.2. Espèce non radicalaire	15
a. Oxygène singulet (1O_2)	15
b. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	15
3.2. Espèce réactives dérivées de l'azote (ERN).....	15
a. Monoxyde d'azote (NO^*).....	15
4. Rôles physiologiques des radicaux libres.....	15
II. Stress oxydant	16
1. Définition	16
2. Origine du stress oxydatif	16
3. Maladies liées au stress oxydatif	16
III. Les antioxydants.....	17
1. Définition	17
2. Types des antioxydantes.....	17

2.1.	Les antioxydants enzymatiques	17
2.2.	Les antioxydants non enzymatiques	17
3.	Mécanismes d'action des antioxydants	18
3.1.	Les antioxydants de type I	18
3.2.	Les antioxydants de type II	18
3.3.	Les antioxydants de type III	18
	Matériel et méthodes	21
I.	Etude phytochimique.....	21
1.	Matériel végétal	21
1.1.	Lieu et période de la récolte	21
1.2.	Préparation des extraits bruts	22
1.3.	Rendement des extraits préparés	23
II.	Tests phytochimiques	23
1.	Tests qualitatifs	23
1.1.	Alcaloïdes	23
1.2.	Flavonoïdes : Réaction à la cyanidine	24
1.3.	Tanins	24
1.4.	Coumarines	24
1.5.	Anthraquinones	24
1.6.	Stérols et triterpènes : Test de Lieberman – Burchardt	24
1.7.	Terpénoïdes : Test de Slakowski	24
1.8.	Saponosides : Test de mousse	25
1.9.	Sucres réducteurs	25
1.10.	Mucilages	25
1.11.	Glycosides cardiaques : Test Keller- Killani	25
2.	Dosages quantitatifs	25
2.1.	Dosage des composés phénoliques totaux	25
2.1.1.	Principe	25
2.2.	Dosage des flavonoïdes	26
III.	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits d' <i>Olea europaea</i>	27
1.	Piégeage du radical libre DPPH* « 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ».....	27
1.1.	Principe	27
1.2.	Mode opératoire	27
1.3.	Expression des résultats.....	28
2.	Réduction du fer ou FRAP « Ferric Reducing Antioxydant Power »	28
2.1.	Principe	28
2.2.	Mode opératoire	29

Résultats et discussion	32
I. Etude phytochimique.....	32
1. Extraction	32
II. Tests phytochimiques	33
1. Tests qualitatifs	33
2. Dosage des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes	34
III. Evaluation de l'activité antioxydante	37
1. Piégeage du radical libre DPPH'	37
2. Réduction du Fer ou FRAP	40
Conclusion générale	44
Références bibliographiques	47

Liste des figures

Figure 1 : <i>Olea europaea</i> L.....	6
Figure 2 : Zones de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen.....	7
Figure 3 : Carte oléicole d'Algérie.....	8
Figure 4 : La formation des radicaux libres	12
Figure 5 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés d l'oxygène	13
Figure 6 : Mécanisme réactionnelle de la synthèse du monoxyde d'azote.	15
Figure 7 : Balance d'équilibre des espèces pro-oxydants et des systèmes de défense antioxydants	16
Figure 8 : Feuilles d'oliviers séchées et broyées.....	21
Figure 9 : Extraction sous reflux des feuilles d'olivier	22
Figure 10 : Evaporation des feuilles d'olivier au rotavapeur	22
Figure 11 : Extraits bruts des feuilles d'oliviers	23
Figure 12 : Transformation du radical DPPH• en DPPHH.....	27
Figure 13 : Mécanisme réactionnel du test FRAP.	29
Figure 14 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental	30
Figure 15 : Rendements obtenus pour les trois extraits bruts des feuilles d'olivier.....	32
Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des composés phénoliques totaux.....	35
Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	35
Figure 18 : Teneurs en composés phénoliques totaux des extraits des feuilles d'olivier.....	36
Figure 19 : Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d'olivier	36
Figure 20 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH•en fonction des concentrations de l'extrait hydroacétonique.....	37
Figure 21 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des concentrations de l'extrait hydrométhanolique	38
Figure 22 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des concentrations de l'extrait aqueux	38
Figure 23 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des concentrations de l'acide ascorbique	39
Figure 24 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles d'olivier et de l'acide ascorbique testés par la méthode FRAP	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification botanique de l'olivier cultivé.	6
Tableau 2 : Structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants dans feuilles d'olivier	9
Tableau 3 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques.	14
Tableau 4 : Différents types des antioxydants.	18
Tableau 5 : Caractéristiques des trois extraits bruts des feuilles d'olivier.....	32
Tableau 6 : Résultats du screening phytochimique.....	33
Tableau 7 : Valeurs des CI_{50} des différents extraits d' <i>Olea europaea</i> et de l'acide ascorbique	40
Tableau 8 : Valeurs des CE_{50} des extraits bruts d' <i>Olea europaea</i> et de l'acide ascorbique ...	41

Liste des abréviations

¹O₂: Oxygène singulet
AC : Absorbance du contrôle
ADN : Acide désoxyribonucléique
AE : Absorbance de l'extrait
AOX : antioxydant
CAT : Catalase
CE₅₀: Concentration effectrice à 50%
CI₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EOA : Espèces oxygénées activées
ERN : Espèces réactives d'azote
ERO : Espèces réactives d'oxygène
FRAP : Ferric reducing anti-oxidant power
GPx : Glutathion peroxydase
GRx : Glutathione réductase
H₃PMO₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique
H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique
Ha : hectare
HOO[•] : Radical hydroperoxyde
K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de potassium
LDL : lipoprotéine de basse densité
M : Molaire
mg Eq AG/g d'extrait : mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait
mg Eq C/g d'extrait : mg équivalent catéchine par gramme d'extrait
NADPH : Nicotinamide adénine di nucléotide phosphate (forme réduit)
NH₄OH : Ammoniaque
NO[•] : Monoxyde d'azote
O₂^{•-} : Anion superoxyde
OH : Hydroxyde
OH[•] : Radical hydroxyle
PI : pourcentage d'inhibition
PX : Peroxydase
R% : Rendements
RL : Radicaux libre
ROS : Reactive Oxygen Species
SH : Groupements thiol
SOD : Superoxyde Dismutase
TCA : Acide Trichloracétique
v/v : Rapport volume par volume

ذكر الله تعالى في القرآن في سورة النور بركات هذه الشجرة وفوائدها كما أقسم بها في سورة التين لقوله تعالى :

بسم الله الرحمن الرحيم

{ اللَّهُ نُورُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ مِثْلُ نُورِهِ كَمِشْكَاةٍ فِيهَا مِصْبَاحٌ الْمِصْبَاحُ فِي زُجَاجَةٍ الزُّجَاجَةُ كَأَنَّهَا كَوْكَبٌ دُرِّيٌّ يُوقَدُ مِنْ شَجَرَةٍ مُبَارَكَةٍ زَيْتُونَةٍ لَا شَرْقِيَّةٍ وَلَا غَرْبِيَّةٍ يَكَادُ زَيْتُهَا يُضِيءُ وَلَوْ أَلَمْ تَمْسَسْهُ نَارٌ نُورٌ عَلَى نُورٍ يَهْدِي اللَّهُ لِنُورِهِ مَنْ يَشَاءُ وَيَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَالَ لِلنَّاسِ وَاللَّهُ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ (35) }

صدق الله العظيم

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Les plantes médicinales représentent une source importante de médicaments pour des milliers d'années de l'histoire humaine, elles constituent la base des pratiques systématiques de médecine traditionnelle pendant plusieurs siècles à travers le monde **(Pan et al., 2009)**.

La recherche de ces deux dernières décennies, a montré que de nombreuses pathologies humaines sont causées ou favorisées par le stress oxydant **(Gutteridge, 1993)**.

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaire ou réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydant **(Camille et Mireille, 2011)**.

Le stress oxydant représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées réactives, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants **(Christelle Koechlin-Ramonatxo, 2006)**.

Etant donné qu'il existe un lien entre plusieurs pathologies et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), le rôle de la thérapie antioxydante comme défense contre plusieurs pathologies est explorée **(Chatterjee, 2016)**.

Un antioxydant (AOX) est une substance capable de prévenir ou de ralentir l'oxydation d'autres molécules **(Flora, 2009)**.

Les antioxydants agissent de plusieurs manières. Leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect, en tant que partie de la structure d'enzyme et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydants, comme dans le cas des éléments traces. Les mécanismes les plus fréquents sont l'interruption de la spirale oxydative, la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons et la réparation des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) **(Berger, 2006)**.

Olea europaea L, de la famille des oléacées, est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle de plusieurs pays, pour traiter différentes affections. Son écorce, ses fruits, ses feuilles, son bois et son huile sont utilisés sous différentes formes, seules ou parfois en combinaison avec d'autres plantes **(Haloui et al., 2010 ; Bellakhdar et al., 1991)**.

Le but de ce travail consiste à réaliser des extractions sous reflux à partir des feuilles d'*Olea europaea*, récoltés dans la région d'El Ourit, en utilisant trois systèmes de solvants : eau distillée, eau/méthanol (30/70 ; v/v) et eau/acétone (30/70 ; v/v).

L'analyse qualitative dans notre étude a porté sur la recherche des principales classes chimiques présentes dans les feuilles de l'olivier, suivie par le dosage quantitatif des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes.

Introduction générale

Par la suite, nous allons évaluer l'activité antioxydante *in vitro* de chaque extrait via les tests suivants :

- Piégeage du radical libre DPPH*
- Le pouvoir réducteur du fer (FRAP).

1^{ÈRE} PARTIE :
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :
L'OLIVIER, *OLEA EUROPAEAL.*

Chapitre 1 : L'olivier *Olea europaea* L.**I. Introduction :**

Les produits végétaux récoltés dans la nature ont une valeur de consommation, de subsistance ou commerciale. Parmi eux se trouvent des oliviers sauvage et cultivée (**Campbell et Luckert, 2002**).

La détermination de la variété d'olive est très importante surtout lorsque le produit est abondant, suivi par augmentation dans l'intérêt commercial de haute qualité. Les oliviers identifiés traditionnellement par les traits agricoles et les morphèmes. (**Trujelo et al., 1995**)

L'olivier est l'un des arbres fruitiers les plus anciennes espèces cultivées dans le bassin méditerranéen. (**Besnard et Berville, 2000**).

La famille des Oléacées est une famille de plantes médicinales dicotylédones qui comprend 900 espèces réparties en 26 genres. Ce sont des arbres et des arbustes à feuilles entières opposées, simples ou composées pennées, sans tiges selon **Shimon en 1997**.

Le terme *Olea* désigne un taxon, le genre *Olea*, c'est-à-dire un ensemble de plantes ayant des caractéristiques communes. On distingue trois sous-genres à regrouper 33 espèces et neuf sous-espèces parmi les nombreuses synonymies qui se sont établies en trois siècles de botanique et d'explorations du monde. (**Green, 2002**).

Le nom scientifique de l'olivier est *Olea europaea* L, en raison de sa région géographique, en fait *Olea* fait référence à l'olivier, tandis que le nom spécifique *europaea* fait référence à son territoire européen typique de la région méditerranéenne, avec *Olea europaea*, est la seule espèce représentée en milieu méditerranéen du genre *Olea* (**Henry, 2003**).

II. Description botanique

L'olivier est un arbre dont la taille avoisine 10 m de long. Il se reconnaît facilement à l'aspect tortueux de son tronc, à ses feuilles de forme oblongues à ovales-lancéolées et à ses fleurs regroupées en petites inflorescences en forme de grappes dressées, naissant à l'aisselle des feuilles (**Arab et al., 2013**). Les olives (fruits) de l'olivier sont des drupes ovoïdes verts, puis noir à maturité complète et avec un noyau dur fusiforme (**Ghedira, 2008**). Les oliviers nécessitent une intensité lumineuse très élevée et sont adaptés à toutes les conditions environnementales (**Claude et Françoise, 2007**).



Figure 1 : *Olea europaea* L. Ghedira (2008).

La classification actuelle de l'olivier cultivé selon **Ghedira (2008)** est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classification botanique de l'olivier cultivé (Ghedira, 2008).

Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Scrophulariales</i>
Famille	<i>Oleaceae</i>
Genre	<i>Olea</i> L.
Espèces	<i>Olea europaea</i> L.
Sous-espèces	<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i> var. <i>europaea</i>

III. Répartition géographique

1. Dans le Monde :

Cependant, environ 97% des 850 millions d'oliviers, qui couvrent une superficie de 9500000 hectares, dans le monde poussent en région méditerranéenne (**Verdier, 2003**). Le bassin méditerranéen reste une zone privilégiée par rapport au reste du monde pour la culture de l'olivier grâce à son climat adéquat tant au niveau de la température mais aussi au niveau de l'hydrométrie

Les zones de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen est représenté dans la figure 2.



Figure 2 : Zones de répartition géographique de la culture de l'olivier dans le bassin Méditerranéen (**Ghedira, 2008**).

D'après **Mahbouli (1974)**, la répartition mondiale de l'Olivier est en:

Europe Méditerranéenne : 71 % des arbres sur 60 % des surfaces;

Proche Orient : 13 % des arbres sur 11 % des surfaces;

Afrique du nord : 13 % des arbres sur 23 % des surfaces;

Amérique latine et les U.S.A : 3 % des arbres sur 2 % des surfaces

Des 800 millions d'arbres d'Olivier, 26,6 % sont cultivés en Espagne, 24,2 % en Italie, 12,3% en Grèce, 9,3 % en Turquie, 6,8 % en Tunisie et seulement 2 % en Algérie (**Maillard, 1975**).

2. En Algérie :

La superficie oléicole de l'Algérie est de 383 443 hectares (ha) avec 50 369 990 oliviers dont 44 664 333 oliviers et 5 705 657 oliviers isolés. Le nombre d'oliviers en production est de 30 527 175, soit 61% du nombre total d'oliviers plantés en Algérie (**DSASI, 2014**).

L'Oliveraie Nationale occupe 4,54% de la superficie agricole occupée (8 465 040 ha). La culture de l'olivier est concentrée dans la région centrale avec 160 515 ha, suivie de la région orientale avec 132 439 ha et de la région occidentale avec 73 032 ha, représentant respectivement 41,86%, 34,54% et 19,05% de la superficie des oliveraies. Le Sud est partie prenante du développement de l'oléiculture, ce qui a un impact sur le développement de l'oléiculture au niveau national, représentant 4,55% de la superficie de 17 457 ha (**DSASI, 2014**).

La carte oléicole d'Algérie selon **ITAFV (2008)** est représentée dans la figure 3

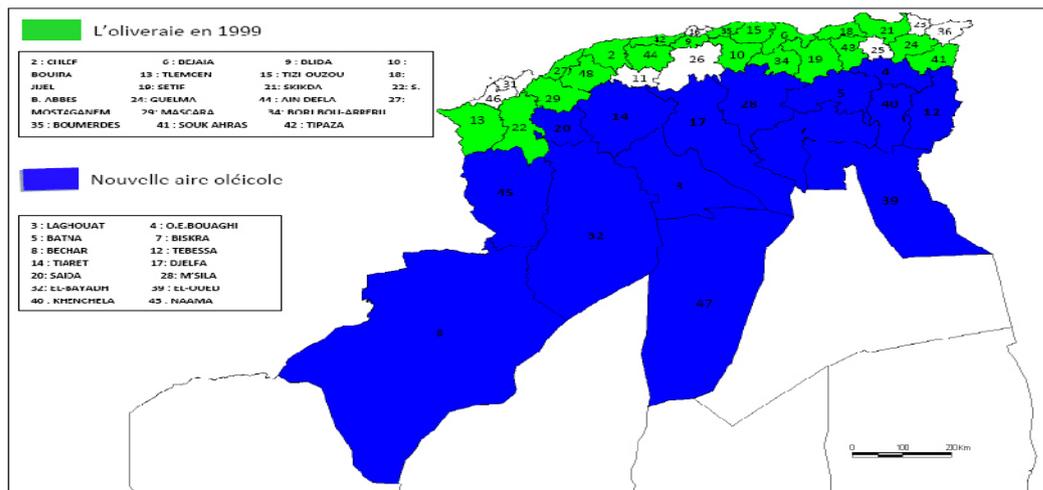


Figure 3 : Carte oléicole d'Algérie (ITAFV, 2008).

IV. Les feuilles d'Olivier

1. Utilisation des feuilles en médecine traditionnelle :

L'olivier est cultivé depuis au moins 3500 ans avant notre ère, pour la consommation des fruits et huile ce qui signifie le nom scientifique de cet arbre *Olea*. À l'antiquité, les Grecs ont employé ces feuilles pour désinfecter des blessures cutanées. Les Anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Au dix-neuvième siècle, elles servaient pour combattre le paludisme (malaria). Ces usages sont tombés en désuétude pendant un certain temps en raison de l'omniprésence des antibiotiques. Cependant, depuis quelques années, des suppléments de feuille d'olivier se trouvent sur le marché, les fabricants de ces produits vantent leurs bienfaits pour le système immunitaire et contre les infections virales, bactériennes, fongiques et à levures. (Micol et al., 2005).

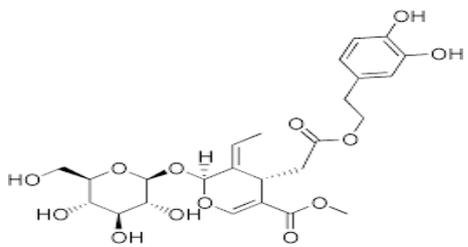
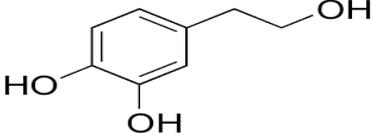
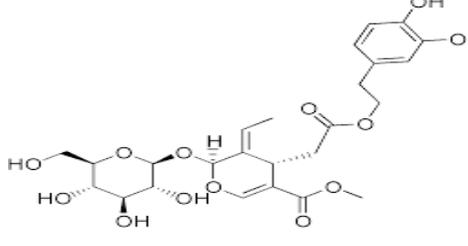
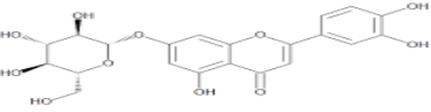
2. Composition chimiques :

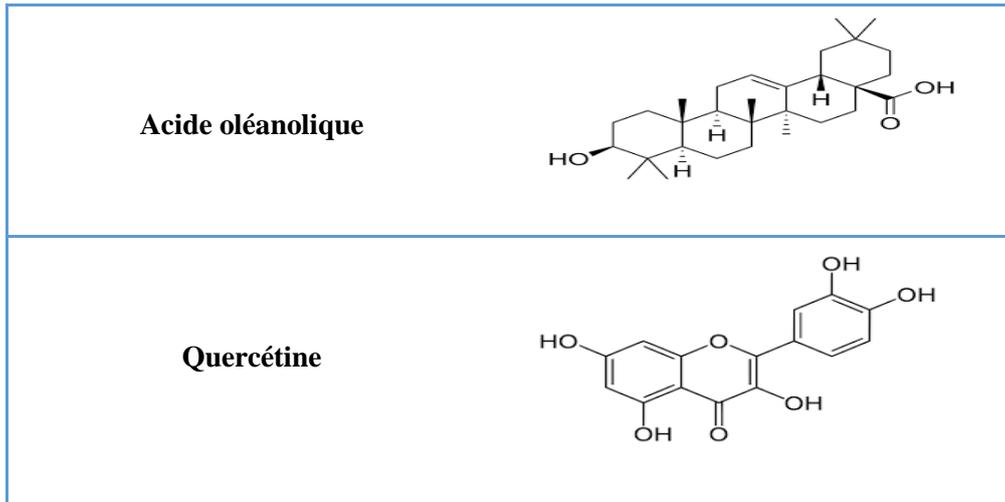
La composition chimique des feuilles varie en fonction de nombreux facteurs (variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, proportion de bois, âge des plantations, etc.). Généralement, la matière sèche des feuilles vertes se situe autour de 50 à 58%, celle des feuilles sèches autour de 90%. La teneur en matières azotées totales des feuilles varie de 9 à 13%, alors que les rameaux ne dépassent guère 5 à 6%. La solubilité de l'azote est faible, elle se situe entre 8 et 14%, selon la proportion de bois. La teneur en matières grasses est supérieure à celle des fourrages et oscille autour de 5 à 7%, mais celle des constituants pariétaux et en particulier de la lignine est constamment élevée (18 à 20%) (Civantos et al., 1983).

La feuille d'olivier est riche en triterpènes, flavonoïdes, sécoiridoïdes dont l'oleuropéside et phénols. Elle exerce des activités antioxydantes, hypotensives, spasmolytiques, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes et antiseptiques, outre les propriétés diurétiques pour lesquelles elle est utilisée sous forme de spécialité phytothérapeutique (**Zarzuolo et al., 1991 ; Gonzalez et al., 1992**).

Les phénols présents dans les feuilles d'olivier sont essentiellement l'hydroxytyrosol, Tyrosol, Catéchine, acide vanillique, vanilline, Rutine, Lutéoline-7-glucoside, Verbascoside, Apigénine-7-glucoside, Diosmétine-7-glucoside, Oleuropéine, et la Lutéoléine (**Benavente-Garcia et al., 2000**).

Tableau 2 : Structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants dans feuilles d'olivier (**Benavente-Garcia et al., 2000**)

Composé phénolique	Structure chimique
Oleuropéine	
Hydroxytyrosol	
Apigénine-7-glucoside	
Lutéoline-7-glucoside	



3. Intérêt des feuilles d'olivier pour la santé :

La feuille d'olivier est l'une des plantes les plus intéressantes pour la tension artérielle. Les résultats des expérimentations animales montrent que la feuille d'olivier a pour effet d'abaisser la tension artérielle. (Aydogan, 2008; Cherif et Rahal, 1996).

Les feuilles d'olivier contiennent également des flavonoïdes (antioxydants) qui aident à neutraliser les radicaux libres (RL) et jouent un rôle important dans la protection des parois artérielles. (Aydogan, 2008).

De plus, ils ont un effet préventif sur l'artériosclérose et les maladies coronariennes, et grâce à ces propriétés, elles abaissent le mauvais cholestérol en augmentant le bon cholestérol, ce qui en fait un complément précieux pour le traitement du diabète sucré non insulino-dépendant (Cherif et Rahal, 1996).

CHAPITRE II :
STRESS OXYDATIF
ET
ANTIOXYDANTS

Chapitre 2 : Stress oxydatif et antioxydants

I. Les Radicaux libres

1. Définition :

Les RL sont une espèce chimique libre, contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans leur orbitale atomique sur la couche électronique externe. Les électrons sont des globules chargés électriquement, par un mouvement de rotation sur eux-mêmes, induisent un champ magnétique appelé un spin, et cet état leur confère énergie et instabilité cinétique (figure 4) (Pillou, 2014).

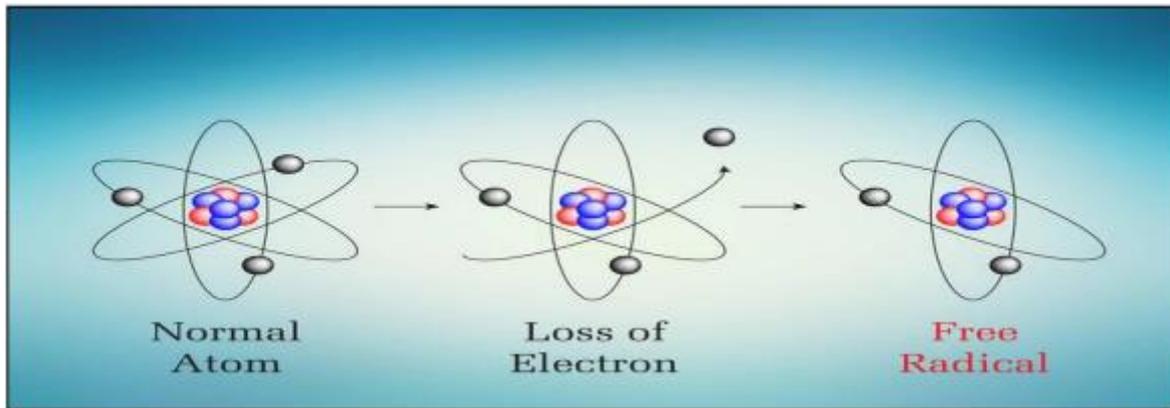


Figure 4 : La formation des radicaux libres (Pillou, 2014)

Les RL apparaissent soit lors d'une rupture de liaison covalente symétrique (fission homologue) où chaque atome conserve son électron, soit lors d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron d'un composé non radicalaire (Kochilin-Ramonatxo, 2006).

Les RL sont des substances chimiques hautement réactives avec un nombre impair d'électrons. Cette dernière peut entraîner une perturbation de la structure des protéines cellulaires, des lipides membranaires et des acides nucléiques. Ces radicaux peuvent éventuellement conduire à la mort cellulaire et à des maladies telles que : les maladies cardiaques, le cancer et la maladie d'Alzheimer. (Pincemail et al., 1999).

2. L'origine des radicaux libres :

Les RL peuvent avoir des origines externes ou internes à l'organisme

2.1.Radicaux libres externes (source exogène) :

Il provient de : pollution, tabac, ozone, métaux lourds, polluants alimentaires (engrais, additifs), graisses saturées des aliments, excès de sucres, alcool, drogues, exposition prolongée au soleil et des ultras violet (Favier, 2003).

2.2. Radicaux libres internes (source interne) :

Les RL sont formés le plus souvent à partir de l'oxygène d'où leur appellation : espèces réactives oxygénées (ERO). L'origine endogène des ERO est principalement les chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies (environ 2 % de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial sont transformés en ERO particulièrement réactionnelle), le dysfonctionnement du système enzymatique ou par manque d'antioxydants dans l'organisme et la réaction inflammatoire qui est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées, qui sont le siège d'un phénomène appelé « Explosion oxydative » consistant à l'activation du complexe NADPH oxydase (figure 5) (Puppo et Halliwell, 1988).

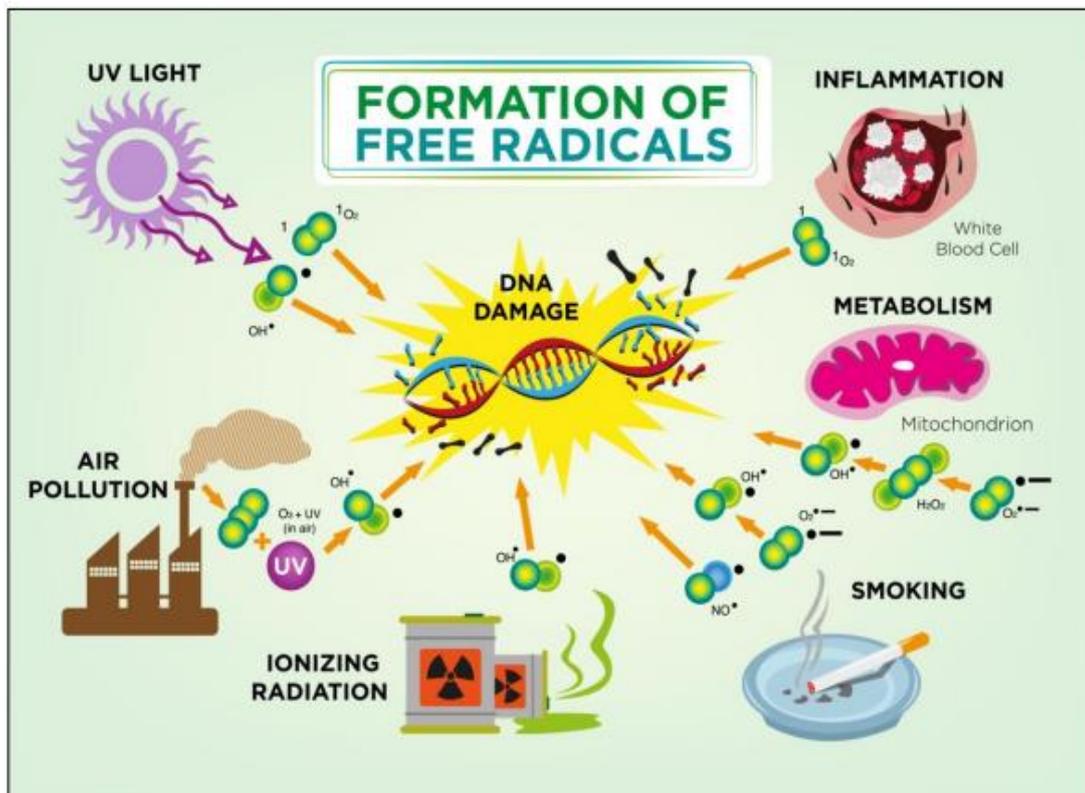


Figure 5 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés d'oxygène (Afonso et al., 2007).

3. Les principaux radicaux libres :

3.1. Espèce réactives dérivées de l'oxygène (ERO) :

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des RL issus de l'oxygène moléculaire. Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie (Valko et al., 2007).

L'appellation ERO inclut les RL de l'oxygène : anion superoxyde (O_2^*), radical hydroxyle (OH^*), mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Wu *et al.*, 2003).

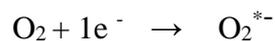
Tableau 3 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Haton, 2005).

Espèce radicalaire		Espèce non radicalaire	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	O_2^*	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^*	Radical hydroperoxyde	HOO^*
Monoxyde d'azote	NO^*	Oxygène singulet	1O_2

3.1.1. Espèce radicalaire :

a. Anion superoxyde (O_2^*) :

L'anion superoxyde (O_2^*) est formé par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire (O_2), ce radical libre est généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et physiopathologiques et est hautement réactif avec certains métaux de transition comme le fer, cuivre et le manganèse (Abreu *et al.*, 2010).



b. Radical hydroxyl (OH^*) :

Les radicaux hydroxyles sont des radicaux oxygénés instables car ils sont le plus réactif et toxique, et ont une durée de vie très courte de 9 à 10 secondes. (Gutteridge *et al.*, 1993).

Le radical hydroxyle (OH^*) est formé à partir du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 au cours de la réaction de Fenton. Le radical (OH^*) est considéré comme l'ERO la plus réactive, il provoque l'inactivation de la pyruvate déshydrogénase mitochondriale et il dépolymérise le mucus du tractus gastro-intestinal ou il induit directement des atteintes oxydatives de l'ADN (Lubec *et al.*, 1996).



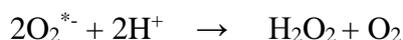
3.1.2. Espèce non radicalaire :

a. Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) :

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est produit en présence de rayonnement ultra-violet (UV) ou par les leucocytes, il est à l'origine de vieillissement cutané, de la cataracte et de la dégénérescence musculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau (Saulnier *et al.*, 1995).

b. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :

Le peroxyde d'hydrogène également appelé l'eau oxygénée (H_2O_2) est formé secondairement par dismutation de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, elle est catalysée par des ions métalliques, mais il peut être produit à partir de l'eau sous l'action de radiation ionisante qui vont fournir l'énergie nécessaire. (Orban et Mineur, 2010).



3.2. Espèce réactives dérivées de l'azote (ERN) :

a. Monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) :

Le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) est synthétiser par la NO synthétase à partir d'un atome d'azote de l'acide aminé L-arginine, de l'oxygène moléculaire (O_2) et de cofacteur NADPH (Li *et al.*, 2014).

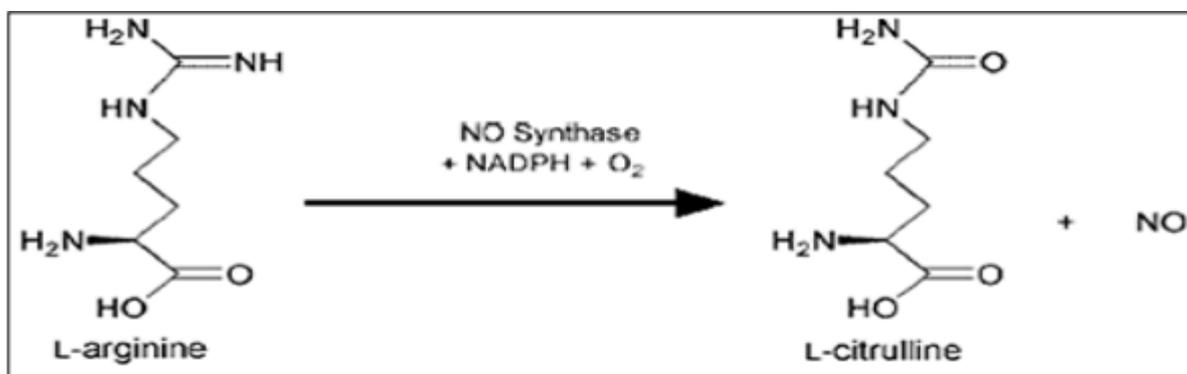


Figure 6 : Mécanisme réactionnelle de la synthèse du monoxyde d'azote (Pacher, 2007).

4. Rôles physiologiques des radicaux libres :

Les ROS jouent plusieurs rôles physiologiques importants, elles constituent l'arsenal de défense contre les agents pathogènes comme dans la phagocytose des bactéries par les cellules polynucléaire et seraient impliquées, dans la régulation des réponses de la croissance cellulaire comme seconds messagers (Deby *et al.*, 2002).

Elles sont utiles aussi dans la régulation des gènes et participent au fonctionnement de certains enzymes (Favier, 2006). La vasodilatation capillaire, le fonctionnement de certains

neurones, la fécondation de l'ovule et la destruction par apoptose des cellules tumorales qui sont des processus naturels nécessitant la présence de RL (Favier, 2003).

II. Stress oxydant

1. Définition :

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre les espèces prooxydantes et le système de défense antioxydant (Thorin-Trecases et al., 2010). Il peut se produire en raison de la surproduction d'oxydants, la diminution de la défense antioxydante ou une combinaison de ces deux facteurs (Ece et al., 2007; Sergent et al., 2001) ce qui conduit à des dégâts cellulaires importants via le déclenchement de cassures et de mutations au sein de l'ADN, l'inactivation de diverses enzymes, la modification de structure des protéines, l'oxydation des sucres et l'induction de peroxydation des lipides (Foret et al., 2009).

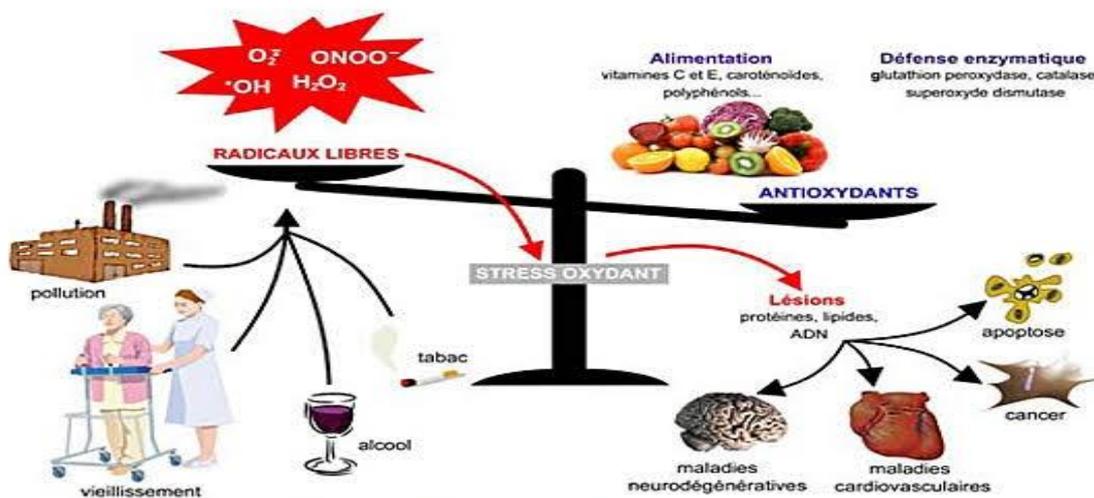


Figure 7 : Balance d'équilibre des espèces pro-oxydantes et des systèmes de défense antioxydants (Favier, 2006).

2. Origine du stress oxydatif :

Le stress oxydatif peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Magder, 2006).

3. Maladies liées au stress oxydatif :

Le stress oxydant est le facteur déclenchant originel de nombreuses maladies actuelles telles que le cancer, les pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire) et les maladies neurodégénératives (ataxies, sclérose latérale, maladie d'Alzheimer) (Favier, 2006).

Le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires c'est le cas de maladies infectieuses comme le

SIDA ou le choc septique, le diabète, la maladie de parkinson ou l'insuffisance rénale (Favier, 2006).

III. Les antioxydants

1. Définition :

Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes comme la glutathion peroxydase, des vitamines telles que la vitamine A, C et E, des oligoéléments comme le sélénium et des protéines comme la ferritine. En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ERO (Pincemail et al., 2002).

Les antioxydants sont des substances qui retardent, préviennent ou réparent les dommages oxydatifs d'une molécule cible. Ce sont aussi des molécules produites naturellement par l'organisme ou par l'alimentation pour lutter contre les effets toxiques des radicaux pendant le stress oxydatif (Halliwell et Gutteridge, 2008).

2. Types des antioxydants :

Les antioxydants peuvent être classés selon leur origine en deux catégories : antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Delattre et al., 2005).

2.1. Les antioxydants enzymatiques :

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces puisque les enzymes ont la propriété de pouvoir réaliser un travail de façon permanente. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase (CAT), et de peroxydase (PX) (glutathion et ascorbate) (Lehucher-Michel et al., 2001).

2.2. Les antioxydants non enzymatiques :

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

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposées. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques, elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (Kohen et Nyska, 2002).

Les antioxydants naturels ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être approvisionnés par l'alimentation (Gardès-Albert et al., 2003). Ce système utilise des molécules non enzymatiques comme les vitamines antioxydantes comme la vitamine C (acide

ascorbique) et la vitamine E (tocophérol) (Fabre et al., 2015), les oligo-éléments comme le zinc (Zn), le cuivre (Cu) et le sélénium (Se) (Haleng et al., 2007), et les antioxydants d'origine végétale tels que les caroténoïdes, les tannis et composés phénoliques (Xu et al., 2009).

Tableau 4 : Différents types des antioxydants (Haleng et al., 2007).

Les antioxydants enzymatiques	Les antioxydants non enzymatiques
La catalase (CAT)	Vitamine C
Superoxyde dismutase (SOD)	Vitamine E
La glutathione peroxydase (GPx)	Caroténoïdes
La glutathione réductase (GRx)	Composés phénoliques

3. Mécanismes d'action des antioxydants :

Les antioxydants sont classés en trois catégories en fonction de leur mécanisme d'action :

3.1. Les antioxydants de type I :

L'action des ces antioxydants repose sur leur capacité pour l'inactivation des RL. Ils inhibent la propagation des réactions radicalaires en donnant de l'hydrogène aux radicaux. (Belaïche, 1979).

3.2. Les antioxydants de type II :

Ce type d'antioxydant prévient la formation des RL et peut intervenir par différents mécanismes. Certains chélatent les ions métalliques réduisant l'effet pro-oxydant des ions. C'est le cas des acides phosphorique et citrique, lécithines (Gunstone et al., 1983).

Les flavonoïdes, un potentiel antioxydant naturel, appartiennent à cette classe d'antioxydants. Ils agissent en piégeant les RL et en complexant les métaux pro-oxydants (Roeding-Penman et al., 1998).

3.3. Les antioxydants de type III :

Ils comprennent des facteurs environnementaux qui ont des effets antioxydants en agissant sur le potentiel redox du milieu.

L'efficacité des antioxydants peut être augmentée en utilisant un mélange d'antioxydants de type I et de type II. La combinaison de ces deux types d'antioxydants peut inhiber les phases d'initiation et de propagation de l'oxydation des lipides (Frankel, 1998).

2^{ÉME} PARTIE :
PARTIE EXPÉRIMENTALE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel et méthodes

Cette étude expérimentale est réalisée au sein du laboratoire pédagogique du pôle de Biochimie n°2, département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen.

Elle comporte trois parties :

- **1^{ère} partie** : Préparation et extraction du matériel végétal à partir des feuilles de l'olivier.
- **2^{ème} partie** : Tests phytochimiques qualitatifs et dosages quantitatifs des polyphénols totaux et des flavonoïdes.
- **3^{ème} partie** : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits obtenus par deux méthodes :
 - ✓ Piégeage du radical libre DPPH* « 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl » ;
 - ✓ Réduction du fer FRAP « Ferric Reducing Antioxydant Power ».

I. Etude phytochimique

1. Matériel végétal :

1.1.Lieu et période de la récolte :

Les feuilles de l'olivier sont récoltées durant le mois de Décembre 2021, à la station de l'Ourit – Tlemcen. Puis, elles sont séchées à l'air libre à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité. Une fois séchée, les feuilles sont broyées finement le jour de l'expérimentation à l'aide d'un mortier ou d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.



Figure 8 : Feuilles d'oliviers séchées et broyées

1.2.Préparation des extraits bruts :

Les feuilles de cette plante ont été soumises à une extraction sous reflux pendant 3h en utilisant trois systèmes de solvants : eau distillée, eau/méthanol (30/70 ; v/v) et eau/acétone (30/70 ; v/v). La poudre des feuilles d'olivier (20 g) est mise en contact avec 200 mL d'un des systèmes de solvants cités précédemment.

Les extraits bruts obtenus sont filtrés sur papier filtre et les filtrats récupérés, sont ensuite, évaporés à l'aide d'un rotavapeur à 60 °C pour éliminer les phases organiques. Les phases aqueuses de chaque extrait sont laissées séchées dans des boîtes Pétri en verre dans une étuve à 35 °C. Les résidus obtenus sont conservés à + 4°C.



Figure 9 : Extraction sous reflux des feuilles d'olivier



Figure 10 : Evaporation des feuilles d'olivier au rotavapeur

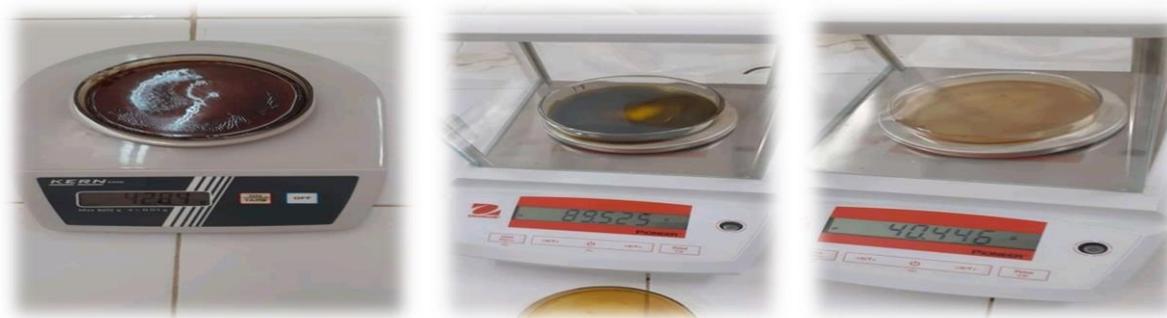


Figure 11 : Extraits bruts des feuilles d'oliviers

1.3. Rendement des extraits préparés

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant. Il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Le rendement d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = (M_{\text{ext}} / M_{\text{éch}}) \times 100$$

Avec :

R (%) : Le rendement en pourcentage % ;

M_{ext} : La masse de l'extrait après évaporation du solvant en gramme (g) ;

M_{éch} : La masse de la matière sèche végétale en gramme (g).

II. Tests phytochimiques

1. Tests qualitatifs :

L'étude phytochimique qualitative permet de détecter les différentes classes chimiques présentes dans la plante par des réactions de coloration et de précipitation, ainsi que, des observations sous lumière ultra- violette.

1.1. Alcaloïdes :

Un volume de 2,5 mL d'acide chlorhydrique (HCL) (1%) est ajouté à 0,5 mL de chaque extrait. Le mélange obtenu est chauffé au bain marie pendant 10 min. Ensuite, la solution obtenue est divisée en deux volumes égaux. Un volume est traité par le réactif de Mayer, l'autre volume est traité par le réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc (réactif de Mayer) ou brun (réactif de Wagner) révèle la présence des alcaloïdes (**Majob, 2003**).

1.2.Flavonoïdes : Réaction à la cyanidine :

Un volume de 1 mL de chaque extrait est mélangé avec quelques gouttes de l'HCl concentré et quelques milligrammes de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge, rose ou orange (N'Guessan *et al.*, 2009).

- ✓ **Rose orangé** : flavones ;
- ✓ **rose violacé** : flavonones ;
- ✓ **rouge** : flavonols, flavanonols.

1.3.Tanins :

La détection des tanins est réalisée par l'ajout de 2 à 3 gouttes de la solution de chlorure ferrique (FeCl₃) (1%) à 1 mL de chaque extrait. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques et la couleur bleu-noirâtre indique la présence des tanins galliques (Karumi *et al.*, 2004).

1.4.Coumarines :

Un volume de 5 mL de chaque extrait est évaporé à sec. Le résidu est dissout dans 2 mL de l'eau distillée chaude. La solution obtenue est partagée dans deux tubes. Un des tubes est mélangé avec 0,5 mL d'ammoniaque (NH₄OH) à 25% et l'autre tube est considéré comme témoin. Une goutte de chaque tube est prélevée, puis, déposée sur un papier filtre et une observation est réalisée sous UV à 366 nm (Bruneton, 1999). Une fluorescence intense est observée pour le tube contenant le NH₄OH.

1.5.Anthraquinones :

À 10 mL de chaque extrait, sont ajoutés 5 mL de NH₄OH (10%).Après agitation, leur présence est indiquée par une coloration violette dans la phase ammoniacale (Oloyede, 2005).

1.6.Stérols et triterpènes : Test de Lieberman – Burchardt :

Un volume de 250 µL d'anhydride acétique et 250 µL d'acide sulfurique sont mélangés avec 1 mL de chaque extrait. Après incubation de 15 minutes à température ambiante, l'apparition d'une couleur mauve, verte ou violette indique leur présence (Edeoga *et al.*, 2005).

1.7.Terpénoïdes : Test de Slakowski :

Un volume de 5 mL de chaque extrait est ajouté à 2 mL de chloroforme et 3 mL d'acide sulfurique(H₂SO₄) concentré.

La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes (Khan *et al.*, 2011).

1.8.Saponosides : Test de mousse :

Dans des tubes à essai, 2 mL de chaque extrait sont mélangés avec 2 mL d'eau distillée. Ces tubes sont ensuite agités vigoureusement pendant 15 secondes. Après repos pendant quelques minutes, la hauteur de la mousse produite dans chaque tube est mesurée. Une hauteur de mousse persistante, supérieur à 1 cm indique la présence des saponosides (N'Guessan *et al.*, 2009).

1.9.Sucres réducteurs :

A 1 mL de chaque extrait, 1 mL de la liqueur de Fehling est ajouté (0,5 mL du réactif A et 0,5 mL du réactif B). Après une incubation pendant 8 minutes dans un bain marie bouillant, la présence des sucres réducteurs est indiqué par l'apparition d'un précipité rouge brique (Cai *et al.*, 2011).

1.10. Mucilages :

Un volume de 1 mL de chaque extrait est ajouté à 5 mL d'éthanol absolu. L'apparition d'un précipité floconneux indique la présence des mucilages.

1.11. Glycosides cardiaques : Test Keller- Killani :

Un volume de 5 mL de chaque extrait est mélangé avec 2 mL d'acide acétique glacial contenant une goutte de (FeCl₃). A ce mélange est additionné un volume de 1 mL d'HCL concentré (Khan *et al.*, 2011). La formation d'un anneau marron, violet ou vert à l'interphase indique leur présence.

2. Dosages quantitatifs :

2.1.Dosage des composés phénoliques totaux :

2.1.1. Principe :

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé selon la méthode décrite par Vermerris et Nicholson en 2006.

Le réactif de Folin-Ciocalteu est utilisé. C'est un mélange de l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et de l'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Elle entraîne

la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 725 nm.

Un volume de 0,1 mL de chaque extrait des feuilles de l'olivier est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2% fraîchement préparée. Après une incubation de 5 minutes, 100 μL du réactif de Folin-Ciocalteu à 0,2 N sont ajoutés au mélange précédent. Le tout est agité, puis, incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

La lecture est effectuée contre un blanc au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 700 nm.

Ce dosage est réalisé en parallèle pour l'acide gallique, utilisé comme témoin positif dans les mêmes conditions opératoires à des concentrations croissantes allant de 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,6 jusqu'à 0,8 mg/mL. Une courbe d'étalonnage de l'acide gallique est tracée et les résultats obtenus pour chaque extrait sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg Eq AG/g d'extrait).

2.2.Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par la méthode colorimétrique selon le protocole décrite par (Zhishen *et al.*, 1999).

Un volume de 500 μL de chaque extrait brut est mélangé avec 2 mL d'eau distillée et 150 μL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15%. Après une incubation de 6 minutes, 150 μL de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à (10%) sont ajoutés au mélange précédent, puis, les tubes sont incubés pendant 6 minutes à température ambiante.

Ensuite, 2 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% sont ajoutés aux différents tubes. Le volume final est complété par l'eau distillée à 5mL, immédiatement. Après agitation et incubation pendant 15 minutes, la lecture est réalisée à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une gamme d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0.6 jusqu'à 0,8 mg/mL).

Une courbe d'étalonnage de la catéchine est tracée et les résultats obtenus pour chaque extrait sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg Eq C/g d'extrait).

III. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Olea europaea*

1. Piégeage du radical libre DPPH• « 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl »

1.1.Principe :

C'est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante. Le radical DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables.

La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violet foncé de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction de ces radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution.

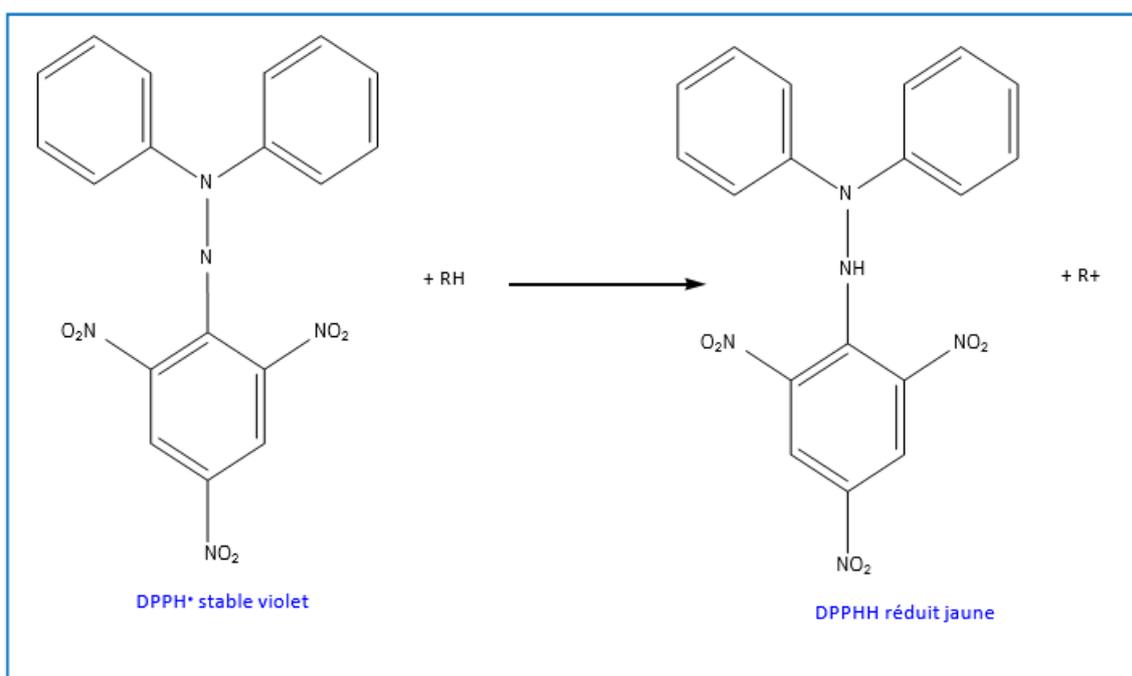


Figure 12 : Transformation du radical DPPH• en DPPHH (Brand-Williams *et al.*, 1995).

1.2.Mode opératoire :

L'évaluation de la capacité antioxydante est réalisée selon le protocole décrit par (Atoui *et al.*, 2005).

A un volume de 1950 μL d'une solution méthanolique de DPPH à $6,34 \times 10^{-5}$ M, est ajouté 50 μL des extraits bruts des feuilles d'*Olea europaea* à différentes concentrations (0,78 ; 1,56 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 et 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou 50 μL l'acide ascorbique, utilisé comme molécule de référence. Après une incubation pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante, les absorbances sont mesurées par spectrophotométrie à 517 nm.

Le blanc de chaque concentration des extraits ou de l'acide ascorbique est préparé en mélangeant 50 μL de chacun d'eux avec 1950 μL de méthanol. Le contrôle négatif est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 μL de méthanol avec 1950 μL de la solution méthanolique de DPPH à $6,34 \times 10^{-5}$ M.

Ce test a été réalisé en triplicate pour chaque extrait brut ainsi que pour l'acide ascorbique.

1.3.Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition **PI** est calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI (\%)} = \left(\frac{\text{AC} - \text{AE}}{\text{AC}} \right) \times 100$$

Avec :

PI (%) : Pourcentage d'inhibition ;

Ac : Absorbance du contrôle négatif ;

Ae : Absorbance de l'extrait.

La concentration inhibitrice CI_{50} a été calculée pour chaque extrait, ainsi que pour l'acide ascorbique, en utilisant la formule obtenue à partir des courbes de régressions logarithmiques tracées sur Excel.

La concentration inhibitrice CI_{50} : C'est la concentration nécessaire pour inhibé 50 % des radicaux libres de DPPH.

2. Réduction du fer ou FRAP « Ferric Reducing Antioxydant Power »

2.1.Principe :

Le pouvoir réducteur d'une molécule est relatif à sa capacité de transfert des électrons et peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydant. Cette méthode est basée sur la capacité des extraits (des molécules antioxydantes) testés à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) présent dans le complexe de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{+2}).

La réaction est révélée par le changement de la couleur jaune du fer ferrique en couleur bleue verte du fer ferreux. L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm par spectrophotométrie.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Zovko Cončić et al., 2010).

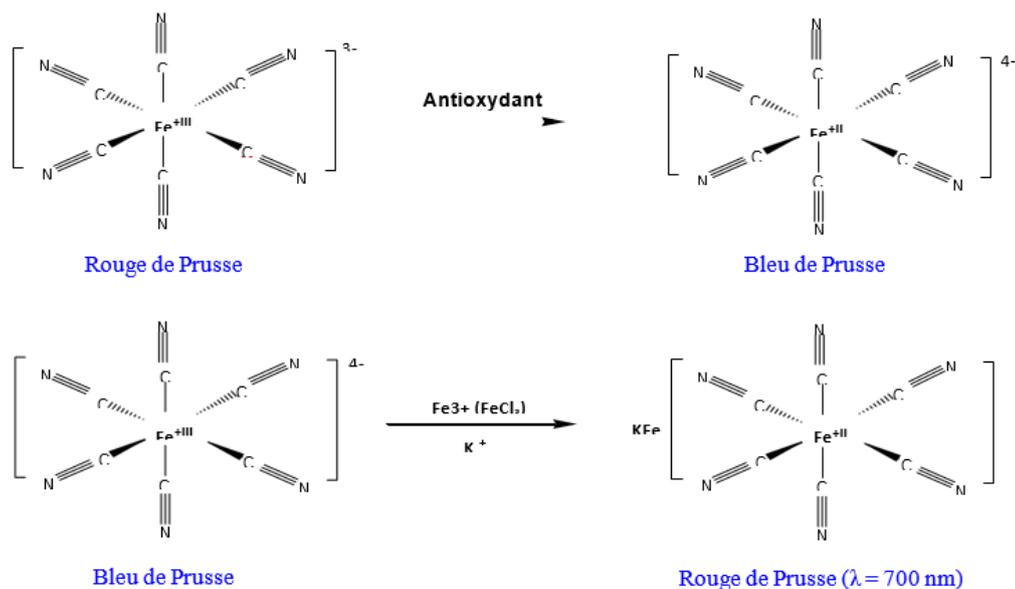


Figure 13 : Mécanisme réactionnel du test FRAP (Chou et *al.*, 2003).

2.2.Mode opératoire :

La méthode de FRAP est réalisée selon le protocole décrit par (Yen et Chen, 1995).

Un volume de 1 mL des extraits bruts des feuilles de l'olivier, ainsi que, l'acide ascorbique (molécule de référence) à différents concentrations (0,03125 ; 0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 et 1mg/mL), et mélangé avec 2,5mL de tampon phosphate à 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%. Les tubes sont incubés à 50° C pendant 20 minutes.

Après incubation, 2,5 mL de l'acide trichloracétique TCA à 10% sont ajouté pour stopper la réaction. Ensuite, les solutions sont centrifugées à 3000 rpm pendant 10 minutes.

Par la suite, 2,5 mL du surnageant des différents tubes précédents sont ajoutés à 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de la solution de chlorure ferrique (FeCl₃) à 0,1%.Les absorbances sont mesurées contre un blanc par un spectrophotomètre à 700 nm.

Cette technique a été réalisée en triplicata pour l'acide ascorbique et les trois extraits bruts.

La concentration efficace CE₅₀ a été calculée pour chaque extrait, ainsi que pour l'acide ascorbique, en utilisant la formule obtenue à partir des courbes de régressions linéaires tracées sur Excel.

La concentration efficace CE₅₀ : C'est la concentration la quelle l'absorbance égal a 0,5

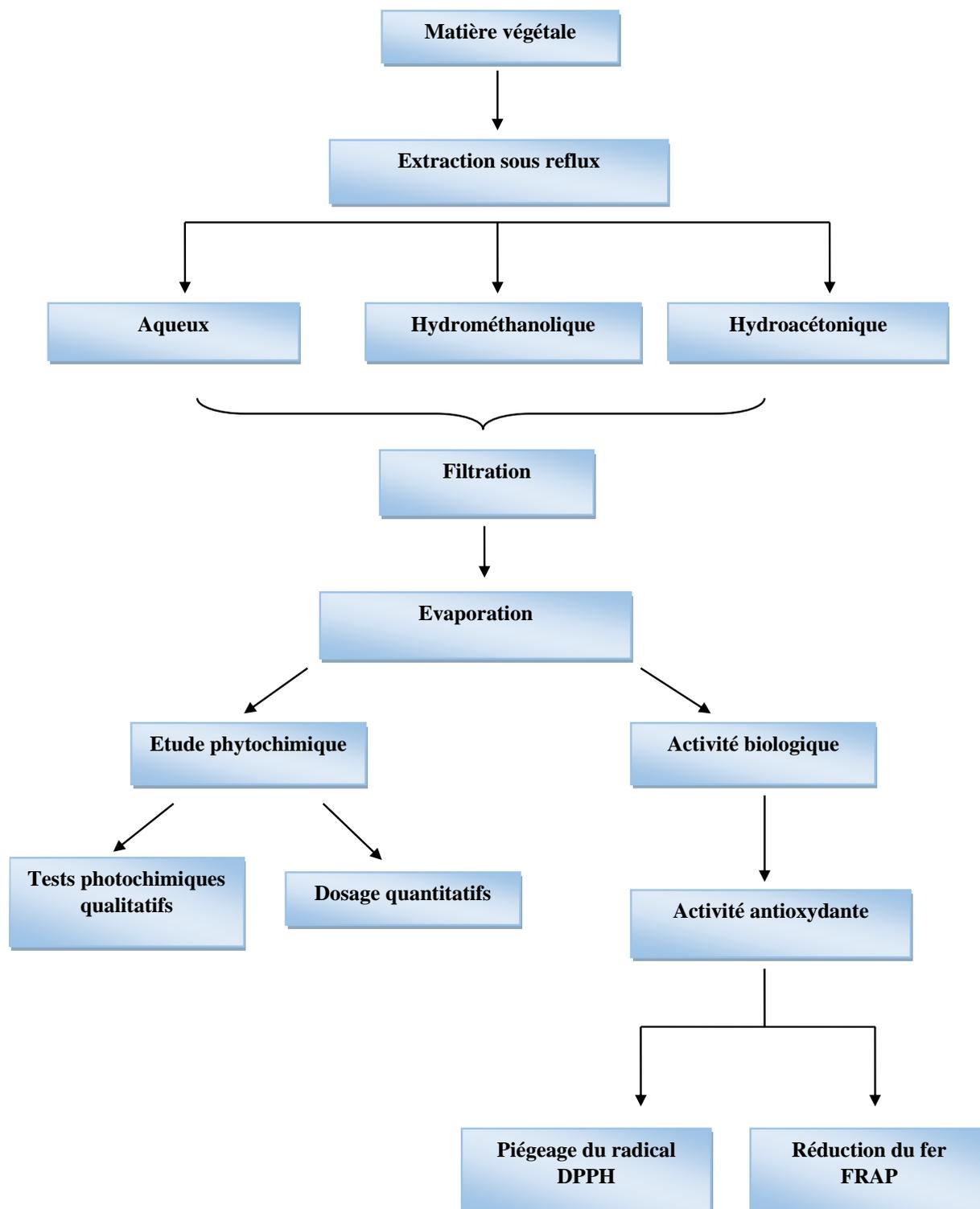


Figure 14 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

I. Etude phytochimique

1. Extraction :

Dans notre étude, nous avons réalisé une extraction sous reflux à partir des feuilles d'*Olea europaea* pendant 3 heures, en utilisant trois systèmes de solvants : eau distillée, eau/méthanol (30/70 ; v/v) et eau/acétone (30/70 ; v/v).

Selon les résultats obtenus, l'extrait aqueux obtenu par extraction sous reflux donne un rendement très élevé par rapport aux extraits hydrométhanolique et hydroacétonique.

Le tableau ci-dessous résume les différentes caractéristiques des extraits bruts, ainsi que les rendements obtenus.

Tableau 5 : Caractéristiques des trois extraits bruts des feuilles d'olivier

Extraits	Aspect	Couleur	Solubilité	Poids de matériel végétal (g)	Masse d'extrait (g)	Rendement %
Eau/acétone		Marron foncé	Eau distillée		2,584 g	12,92 %
Eau/méthanol	Cristallisé	Marron foncé	Eau distillée	20 g	2,874 g	14,37 %
Eau distillée		Marron claire	Eau distillée		4,045 g	20,22 %

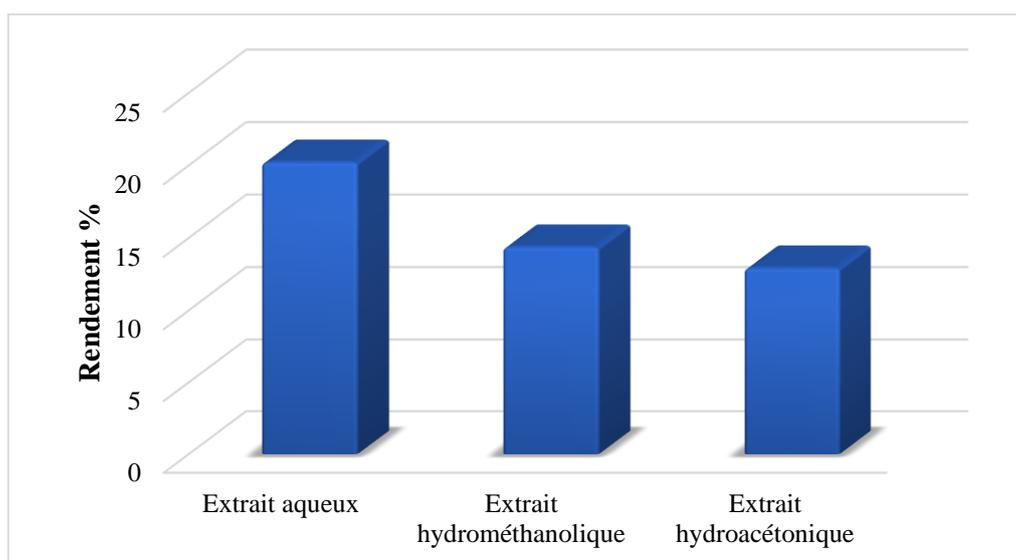


Figure 15 : Rendements obtenus pour les trois extraits bruts des feuilles d'olivier

D'après la figure 15, nous remarquons que l'eau distillée a présenté un rendement plus élevé par rapport aux autres extraits, les rendements respectives des trois extraits sont : 20,22% (p/p), 14,37% (p/p) et 12,92% (p/p).

En comparant nos rendements obtenus avec d'autres travaux, nous observons que nos valeurs de rendement sont légèrement inférieures à celles obtenues par **Meddour** et **Soualem** en **2021**, ont obtenu un rendement de 37,65% pour l'extrait éthanolique préparé par macération, suivi par l'extrait acétonique avec un rendement de 36,98%, et enfin, l'extrait méthanolique avec un rendement de 35% des feuilles d'oliviers sauvages.

Addab et **ses collaborateurs** en **2020** ont réalisés une étude de l'évaluation comparative de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles d'*Olea europaea* L. de l'Est Algérie du quatre variétés Batna, Skikda, Mila et Biskra et les rendements sont : 35,89%, 30,60%, 27,91% et 25,28% respectivement.

Ces résultats montrent que l'efficacité d'extraction peut être influencé par différents paramètre tell que : la nature chimique des molécules dans la plante, la méthode d'extraction choisi et le solvant utilisé (**Stalikas, 2007**).

II. Tests phytochimiques

1. Tests qualitatifs :

Les résultats du screening phytochimique est représenté dans le tableau 6

Tableau 6 : Résultats du screening phytochimique

Classes chimiques	Extraits		
	Hydroacétonique	Hydrométhanolique	Aqueux
Alcaloïdes	Test de Mayer	-	-
	Test de Wagner	-	-
Flavonoïdes	+	+	++
Tanins	+++	+++	+++
Coumarines	-	-	-
Anthraquinones	-	-	-
Stérolsetriterpènes	-	-	-
Terpénoïdes	+++	++	+
Saponosides	+	+++	++
Sucres réducteurs	+++	+	++
Mucilages	-	-	-

Glycosides cardiaques	-	+	-
-----------------------	---	---	---

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

Les résultats du screening phytochimique révèlent que il ya la présence des quantités plus faible en flavonoïdes dans les trois extraits des feuilles d'olivier et des glycosides cardiaques seulement sur l'extrait hydrométhanolique.

Nous observons aussi que il ya la présence des quantités très importants en tanins, terpénoïdes, saponines et des sucres réducteurs dans tout les extraits.

De même, il ya l'absence totale des alcaloïdes, des coumarines, des anthraquinones, des stérols et des triterpènes et du mucilage.

Nous résultats obtenu pour le screening phytochimique qualitatifs sont similaires à celle trouvé par **Mezouar et al., (2022)**, qui ont montré la présence des flavonoïdes, tanins, stérols et triterpènes, terpénoïdes et de saponines et avec l'absence total des alcaloïdes, des coumarines et des anthraquinones dans les deux extraits hydrométhanolique et hydroacétonique des feuilles d'olivier cultivé (**Mezouar et al., 2022**).

De même nos résultats sont en accord avec celle enregistré par **Lahmadi et al., (2019)**, ils ont montrés que il ya la présences des flavonoïdes, coumarins, terpénoïdes, alcaloïdes et tannins et l'absence des saponosides et anthraquinones dans l'extrait méthanolique des feuilles d'olivier cultivé. (**Lahmadi et al., 2019**).

2. Dosage des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes :

L'analyse quantitative des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes a été effectuée par des méthodes de dosages colorimétriques et spectrophotométriques.

La détermination des teneurs en composés phénoliques totaux se fait par la méthode de Folin-Ciocalteu, à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme témoin (Figure 16). Elles ont été exprimées en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait (mg Eq AG/g d'extrait).

La quantification des teneurs en flavonoïdes se fait par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) utilisant la catéchine comme témoin (Figure 17). Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg Eq C/g d'extrait).

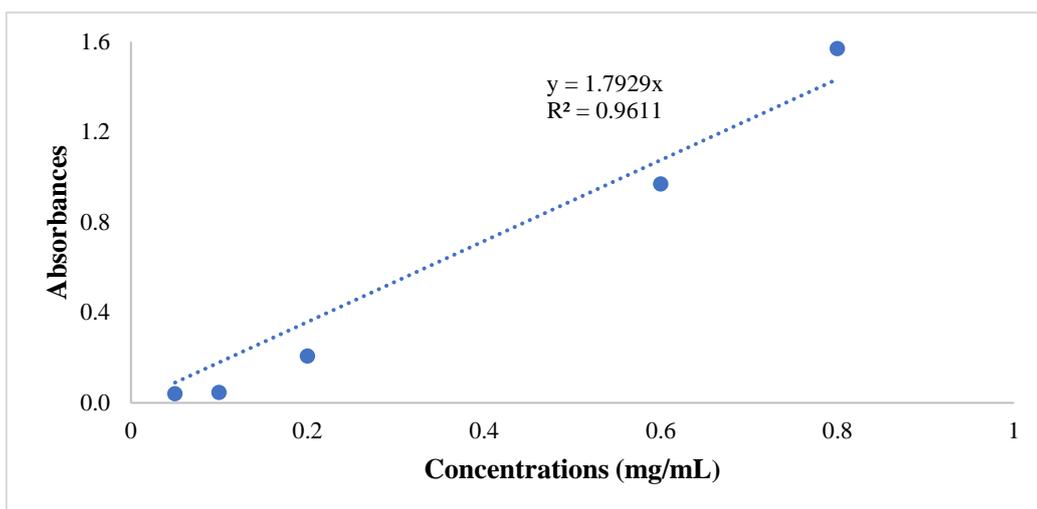


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des composés phénoliques totaux

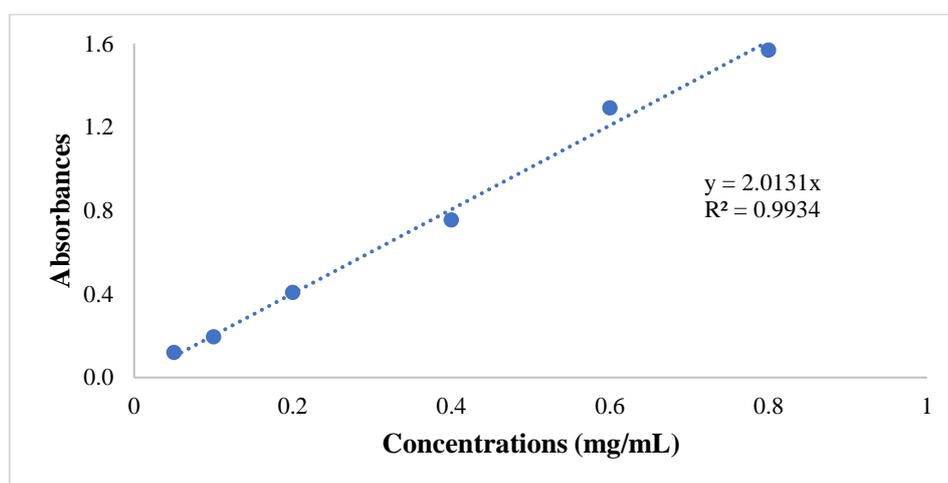


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

Selon les résultats obtenus, tous les extraits des feuilles d'olivier présentent des teneurs variables en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes.

L'extrait hydrométhanolique obtenu par extraction sous reflux présente une concentration plus élevée en composés phénoliques totaux, avec un teneur de $192 \pm 0,03$ mg Eq AG/g d'extrait. Suivi par les deux extraits hydroacétonique et aqueux, où les concentrations sont de l'ordre de $128 \pm 0,05$ mg Eq AG/g d'extrait et $80 \pm 0,01$ mg Eq AG/g d'extrait, respectivement. De même, nous avons constaté que le même extrait hydrométhanolique contient une concentration élevée en flavonoïdes, de l'ordre de $253 \pm 0,01$ mg Eq C/g d'extrait par rapport aux extraits hydroacétonique et aqueux, où les concentrations sont de l'ordre de $181 \pm 0,08$ mg Eq C/g d'extrait et $145 \pm 0,06$ mg Eq C/g d'extrait, respectivement.

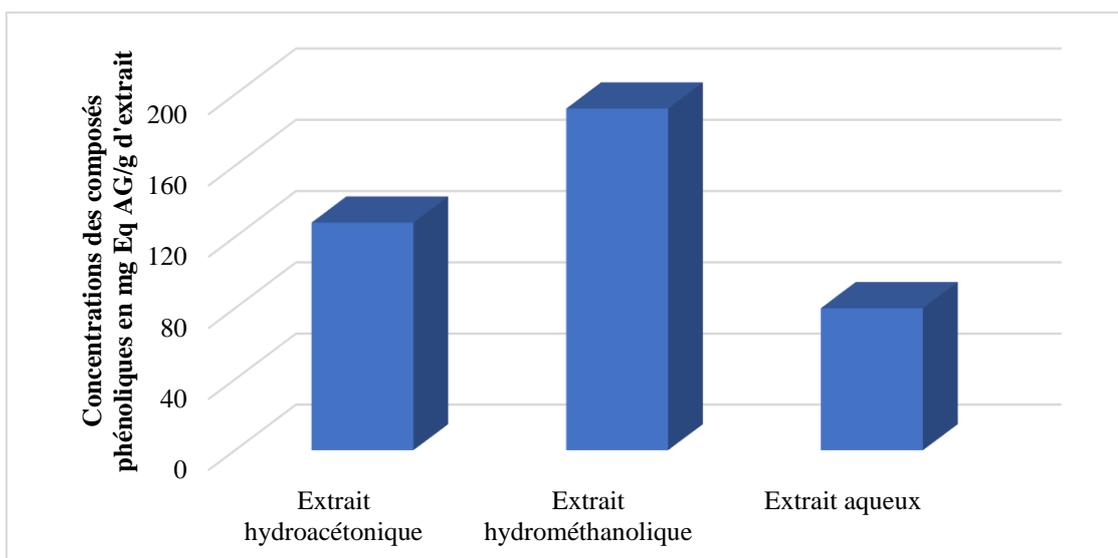


Figure 18 : Teneurs en composés phénoliques totaux des extraits des feuilles d'olivier

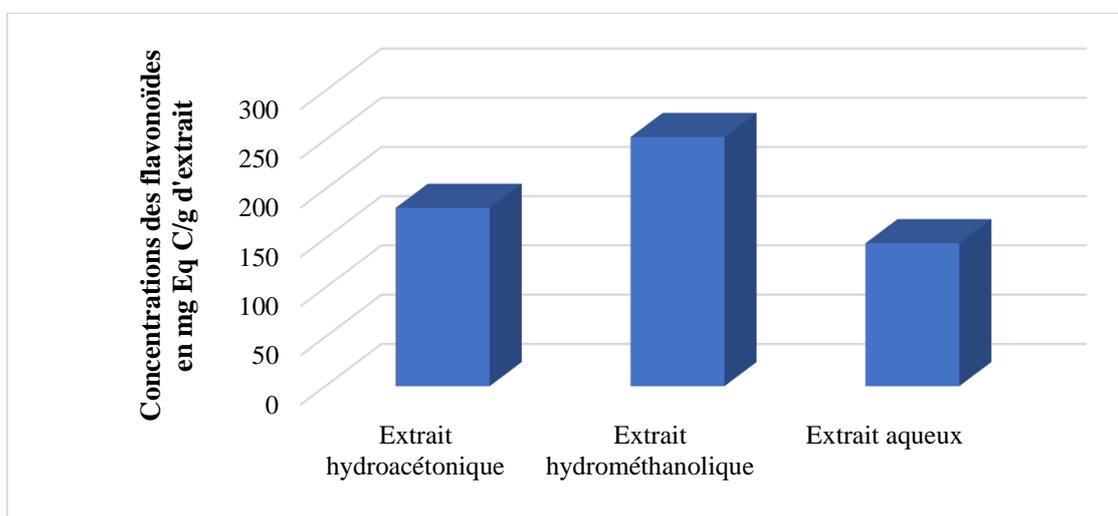


Figure 19 : Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d'olivier

Ces valeurs sont similaires à celles obtenues par **Djenane et al., (2019)**, qui ont trouvé une concentration de $198,7 \pm 3,6$ mg Eq AG/g d'extrait en composé phénolique totaux des extraits des feuilles d'olivier sauvage de région de Kabylie- Algérie ces auteurs ont utilisé du méthanol 80% comme système de solvant d'extraction (**Djenane et al., 2019**).

De même, nos résultats sont largement inférieurs à ceux enregistrés par **Zaïri et al., (2020)**, qui ont obtenus une concentration variant entre $480,34 \pm 1,36$ et $546,06 \pm 2,55$ mg Eq AG/g d'extrait en composés phénoliques totaux et entre $506,4 \pm 1,91$ et $605,25 \pm 3,17$ mg Eq C/g d'extrait en flavonoïdes dans les feuilles d'olivier des régions Meski et Chemlali en Tunisie ces auteurs utilisent de l'eau distillée comme système de solvant d'extraction pour préparer des extraits d'infusion (**Zaïri et al., 2020**).

La variation des quantités de composés phénoliques dans les feuilles d'olivier selon la littérature dépend des conditions climatiques et agronomiques, de la composition du sol, du moment de la récolte de l'échantillon de feuille et de l'âge des arbres (Djenane et al., 2019).

III. Evaluation de l'activité antioxydante

1. Piégeage du radical libre DPPH• :

Les résultats obtenus dans notre travail, sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations des extraits des feuilles d'*Olea europaea* et de l'acide ascorbique.

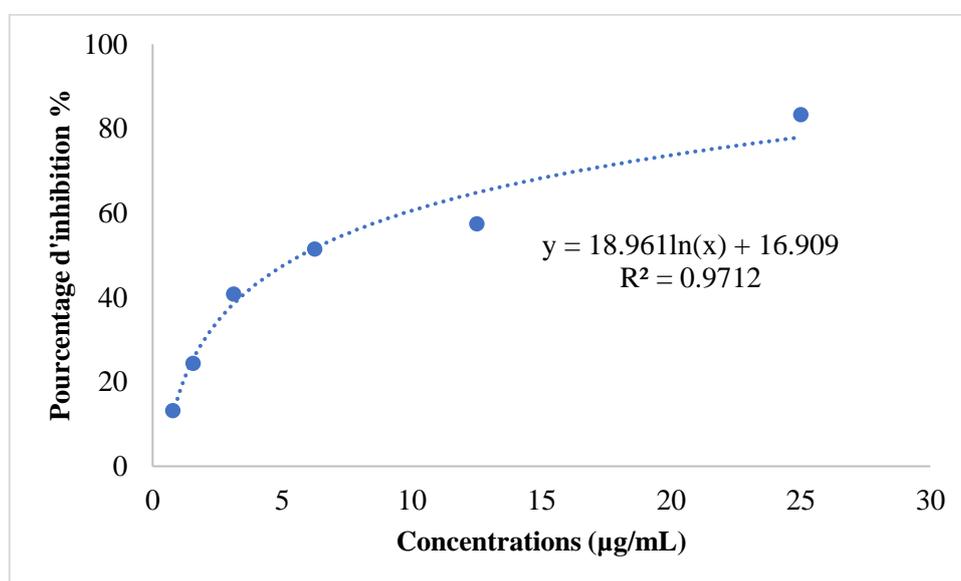


Figure 20 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des concentrations de l'extrait hydroacétonique

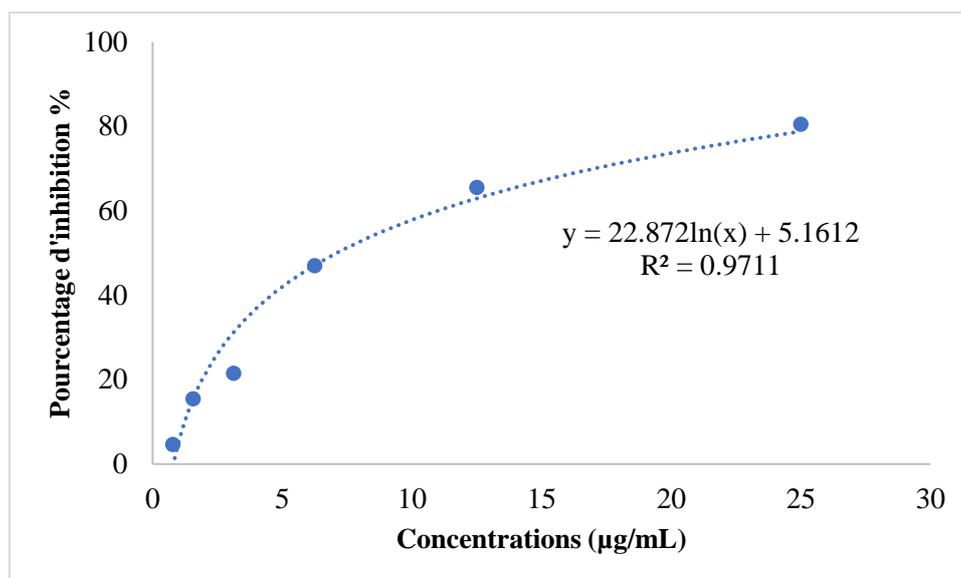


Figure 21 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des concentrations de l'extrait hydrométhanolique

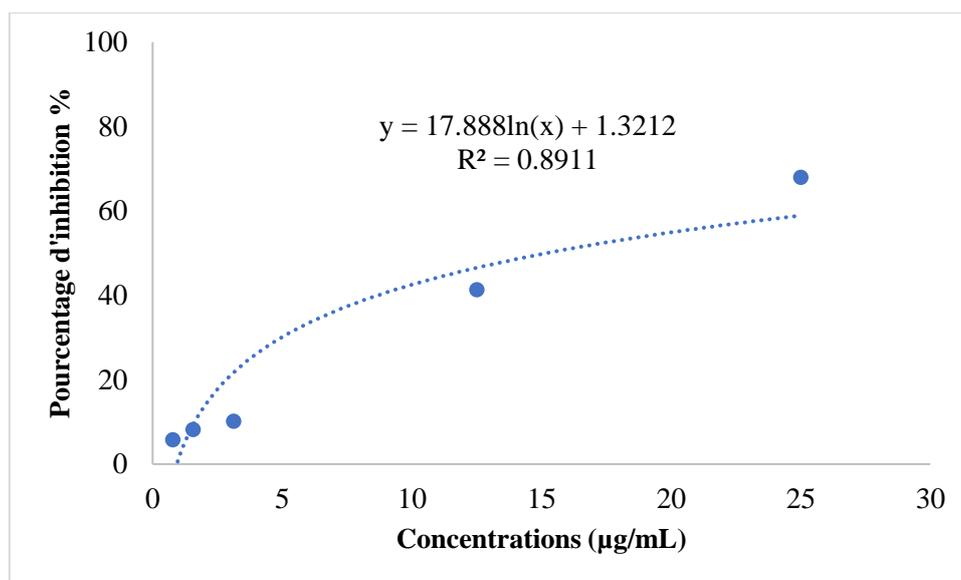


Figure 22 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des concentrations de l'extrait aqueux

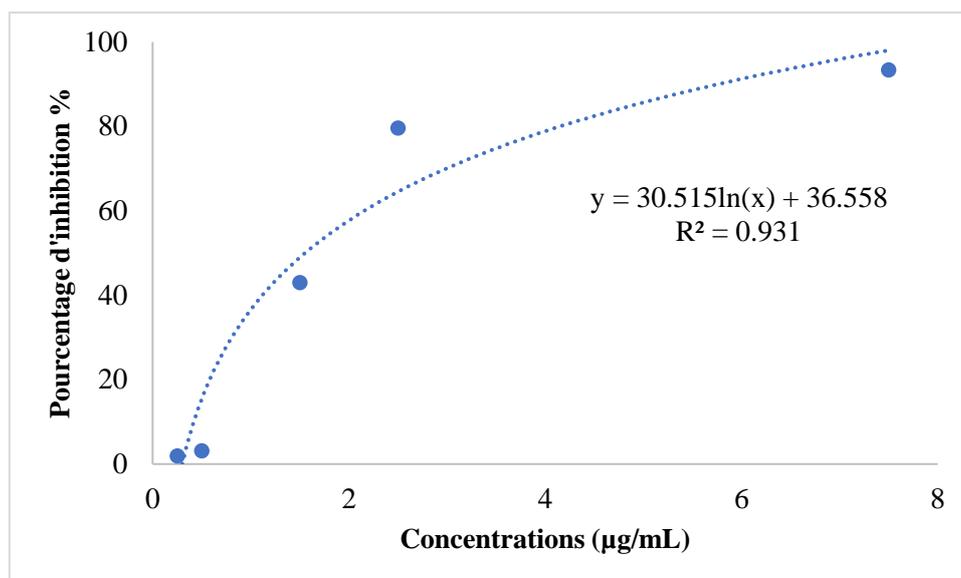


Figure 23 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des concentrations de l'acide ascorbique

L'extrait hydroacétonique a montré des pourcentages d'inhibition élevés avec de faibles concentrations par rapport aux autres extraits bruts. À une concentration de 25µg/mL, l'extrait a produit un pourcentage d'inhibition de 83,27% ± 0,090. À cette même concentration, l'extrait hydrométhanolique a produit un pourcentage d'inhibition de 80,56% ± 0,04, suivi par l'extrait aqueux où le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 67,94% ± 0,14.

Dans ce test on utilise l'acide ascorbique comme une molécule de référence, il a montré une activité antiradicalaire très élevée avec de faibles concentrations par rapport aux trois extraits testés des feuilles d'olivier. À une concentration de 7,5µg/mL, l'acide ascorbique a produit un pourcentage d'inhibition de 93,44% ± 0,035.

Par la suite nous avons déterminé pour chaque extrait les concentrations nécessaires pour réduire 50% du radical libre DPPH• ou CI₅₀. Plus la valeur de CI₅₀ est faible plus l'extrait est considéré comme un meilleur antioxydant puissant. Les valeurs des CI₅₀ sont représentées dans le tableau 07.

D'après les valeurs obtenues, l'extrait hydroacétonique présente la plus faible CI₅₀ et donc une meilleure activité antioxydante suivi par les extraits hydrométhanolique et aqueux.

La CI₅₀ de l'acide ascorbique est inférieure à celles des extraits, donc il possède une activité antioradicalaire la plus élevée.

Tableau 7 : Valeurs des CI_{50} des différents extraits d'*Olea europaea* et de l'acide ascorbique

	Extraits			Acide ascorbique
	Aqueux	Hydrométhanolique	Hydroacétonique	
CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$15,18 \pm 0,05$	$7,09 \pm 0,07$	$5,69 \pm 0,09$	$1,55 \pm 0,05$

Ces résultats sont inférieurs à celle enregistrée par **Mezouar et al., (2021)**, ces auteurs ont obtenus une CI_{50} de $7,95 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait hydroacétonique des feuilles d'olivier sauvage et $13,14 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait hydrométhanolique des feuilles d'olivier sauvage (**Mezouar et al., 2021**).

De même ces résultats sont supérieurs à celle trouvée par **Zaïri et al., (2020)**, ils ont obtenus une CI_{50} de $0,19 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait aqueux des feuilles d'olivier cultivé. (**Zaïri et al., 2020**).

Selon nos résultats obtenus, nous pouvons suggérer que l'activité antioxydante des extraits est relativement dépendante de la teneur en composés phénoliques ainsi qu'en flavonoïdes.

2. Réduction du Fer ou FRAP :

Les résultats obtenus pour cette technique sont présentés sous forme de graphes représentant les absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits et de l'acide ascorbique (molécule de référence).

D'après la figure 24, nous remarquons que l'extrait hydrométhanolique a présenté le plus d'activité pour réduire le fer par rapport aux autres extraits bruts de l'olivier. À une concentration de 1mg/mL , l'extrait hydrométhanolique présente une absorbance de $1,13 \pm 0,15$ et à cette même concentration, les deux extraits hydroacétonique et aqueux présentent des absorbances de $0,98 \pm 0,16$ et $0,89 \pm 0,09$, respectivement.

L'acide ascorbique, l'antioxydant de référence utilisé dans ce test, a présenté l'activité la plus élevée pour réduire le fer par rapport aux extraits de l'olivier, aux mêmes concentrations testées.

De même, nous remarquons que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.

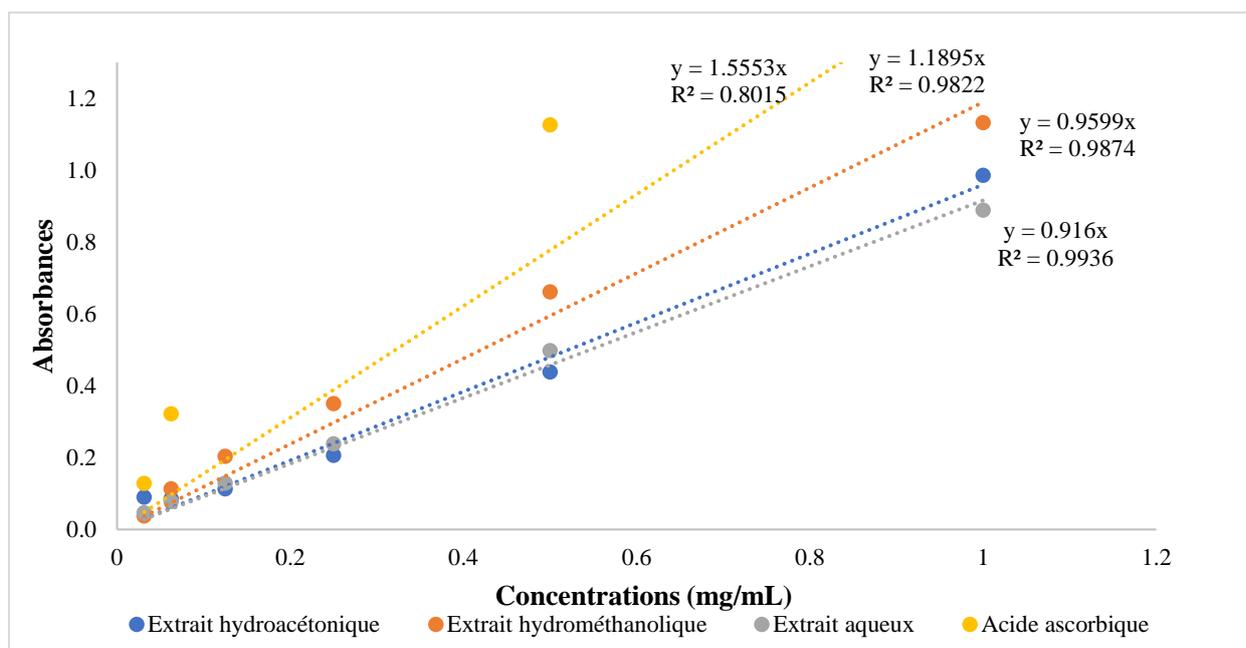


Figure 24 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles d'olivier et de l'acide ascorbique testés par la méthode FRAP

À partir des équations des régressions linéaires des graphes représentés dans la figure 24, nous avons déterminés pour chaque extrait, les concentrations à laquelle l'absorbance est égal à 0,5 ou CE₅₀ (concentration efficace pour réduire le fer). Les valeurs des CE₅₀ sont représentées dans le tableau 08.

Tableau 8 : Valeurs des CE₅₀ des extraits bruts d'*Olea europaea* et de l'acide ascorbique

CE ₅₀ (mg/mL)	Extraits			Acide ascorbique
	Aqueux	Hydrométhanolique	Hydroacétonique	
	0,54 ± 0,05	0,42 ± 0,07	0,52 ± 0,08	0,32 ± 0,11

Les résultats révèlent que l'extrait hydrométhanolique, avec une CE₅₀ de 0,42 ± 0,07, possède un pouvoir réducteur supérieur à celui des extraits hydroacétonique et aqueux, qui ont exhibés des CE₅₀ de l'ordre de 0,52 ± 0,08 et 0,54 ± 0,05 mg/mL, respectivement. Ces valeurs restent relativement inférieures à celle de l'acide ascorbique qui est de l'ordre de 0,32 ± 0,1 mg/mL.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Mezouar et al., (2021)**, qui ont montré que l'extrait hydrométhanolique des feuilles d'olivier sauvage a le pouvoir le plus élevée pour réduire le fer, suivi par l'extrait hydroacétonique, où les CE₅₀ sont de l'ordre de 0,29 ± 0,64 mg/mL et 0,37 ± 0,66 mg/mL, respectivement. (**Mezouar et al., 2021**).

Aussi notre résultat est inférieur a celle trouvé par **Lahmadi et al., en 2019** qui obtenu une CE₅₀ de $89,44 \pm 0,22$ µg/ml de l'extrait méthanolique des feuilles *d'Olea europeae* L. (**Lahmadi et al., 2019**)

La capacité réductrice d'un composé peut servir donc, comme indicateur de l'activité du potentiel antioxydant (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Le présent travail a pour objectif, l'étude phytochimique et l'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits des feuilles de l'olivier cultivé (*Olea europaea* L).

L'extraction sous reflux des feuilles d'olivier cultivé a montré que l'extrait aqueux donne le meilleur rendement, suivi par l'extrait hydrométhanolique et l'extrait hydroacétonique.

L'analyse phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des quantités très importantes en tanins, terpénoïdes, saponosides et des sucres réducteurs dans les trois extraits des feuilles d'olivier et des quantités plus faibles en flavonoïdes et des glycosides cardiaques dans l'extrait hydrométhanolique.

L'analyse quantitative des extraits a montré des résultats importants en polyphénols totaux et en flavonoïdes. L'extrait hydrométhanolique obtenu par extraction sous reflux présente des taux plus élevés en ces constituants par rapport aux autres extraits où les teneurs sont de l'ordre de ($192 \pm 0,03$ mg Eq AG/g d'extrait et $253 \pm 0,01$ mg Eq C/g d'extrait), suivi par l'extrait hydroacétonique ($128 \pm 0,05$ mg Eq AG/g d'extrait et $181 \pm 0,08$ mg Eq C/g d'extrait) et enfin l'extrait aqueux ($80 \pm 0,01$ mg Eq AG/g d'extrait et $145 \pm 0,06$ mg Eq C/g d'extrait).

L'activité antioxydante de nos extraits a été évaluée en utilisant deux méthodes : piégeage de radical libre DPPH[•] et la réduction du fer FRAP.

Pour le test de piégeage de radical libre DPPH[•], l'extrait hydroacétonique des feuilles d'olivier a montré une activité antioxydante la plus élevée avec un CI_{50} de l'ordre de $5,69 \pm 0,09$ µg/mL, suivi par les extraits hydrométhanolique et aqueux où les CI_{50} obtenus sont de l'ordre de $7,09 \pm 0,11$ et $15,18 \pm 0,07$ µg/mL, respectivement.

Les résultats de test FRAP révèlent que l'extrait hydrométhanolique des feuilles d'olivier présente l'activité la plus élevée pour réduire le fer avec un CE_{50} de l'ordre de $0,42 \pm 0,07$ mg/mL, suivi par les extraits hydroacétonique et aqueux où les CE_{50} obtenus sont de l'ordre de $0,52 \pm 0,08$ et $0,54 \pm 0,05$ mg/mL respectivement.

Perspective :

- ✓ Réaliser d'autres méthodes d'extraction par changement du solvant et le temps d'extraction ;
- ✓ L'étude *in vivo* de l'activité antioxydante ;
- ✓ L'isolement et l'identification des principes actifs responsables de l'activité antioxydante en utilisant des techniques chromatographiques et spectrales ;
- ✓ Évaluation d'autres activités biologiques comme l'activité hémolytique, l'activité antidiabétique et l'activité antimicrobienne ;

- ✓ L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante par d'autre méthode : ABTS (Activité du Piégeage du Cation Radical), CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), CAT (Total Antioxidant Capacity).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- **Abreu, I. A., & Cabelli, D. E., (2010).** Superoxide dismutase-a review of the metal associated mechanistic variations. *Biochimica Biophysica Acta*. 1804: 263-274.
- **Addab, N., Fetni, S., Hamlaoui, F., Zerguine, A., & Mahloul, K. (2020).** Evaluation comparative de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles d'*Olea europaea* L. de l'Est Algérien 4 : 579 584
- **Afonso, V., Champy, R., & Lomri, A. (2007).** « Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : Rôle dans les maladies rhumatismales», *Revue du Rhumatisme*, n°74, p. 636-643
- **Arab, K., Bouchenak, O., & Yahiaoui, K. (2013).** Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. *Afrique Science*, 9 : 159-166.
- **Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005).** Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* 89: 27–36.
- **Aydogan, C. (2008).** *Phytotherapy Research*, 9:1239 – 1242

B

- **Belaïche, B. (1979).** « L'aromatogramme » : traité de phytothérapie et l'aromathérapie, Tome1.M.S.A. Editeur, Paris, 204p.
- **Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., & Younos, C. (1991).** Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *Journal of ethnopharmacology*, 35 (2) : 123 – 143.
- **Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., & Del Rio, J. A. (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chemistry*, 457-462
- **Berger, M. M. (2006).** *Manipulations nutritionnelles du stress oxydant* : état des connaissances. *Nutr Clin Meta* 20: 48–53.
- **Besnard, G., & Berville, A. (2000).** Multiple origins of the Mediterranean Olive deduced from mitochondrial DNA polymorphisms. *C. R. Acad. SCI., Série III* 323: 173–181.
- **Bougandoura, N., & Bebdimerad, N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *nepeta* (L.) Briq. *Nature et Technologie*, 9, 14-15.

- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} éd. France : Tech & Doc – Lavoisier.

C

- **Cai, L. Y., Shi, F. X., & Gao, X. (2011).** Preliminary phytochemical analysis of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. *J Med Plants Res*.5 (17): 4059 – 4064.
- **Camille, M., & Mireille, S. (2011).** Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Médecine Sciences*. 27(4), 405-412.
- **Campbell, B. M., & Luckert, M. (2002).** Uncovering the hidden harvest: Valuation methods for woodland and forest resources. London: Earthscan,
- **Chatterjee, S. (2016).** Chaptertwo – Oxidative stress, inflammation and disease. *In* : Dziubla T, Butterfield A (Editeurs). *Oxidative stress and biomaterials*. Academic Press, Elsevier, Pp 35.
- **Cherif, S., Rahal, N., & Pharm Belg, J. (1996).** A clinical trial of a titrated *Olea* extract in the treatment of essential arterial hypertension, 69-71.
- **Chou, S. T., Chao, W. W., & Chung, Y. C. (2003).** Antioxidative activity and safety of 50% ethanolic red bean extract (*Phaseolus radiatus* L. var. *aurea*). *Journal of food science*, 68(1), 21-25.
- **Christelle Koechlin-Ramonatxo, (2006).** Oxygène, stress oxydant et suplementations antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20(4), 165-177.
- **Civantos, L. (1983).** Valorisation des sous-produits de l’olivier, Réunion du comité technique (FAO) 143-145.
- **Claude, M. M., & Françoise, D. (2007).** Herbar méditerranéen. Paris, P : 9.

D

- **Dacosta, Y. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. *Ed yves dacosta. Paris*. 317p.
- **Deby-Dupont, G., Deby, C., & Lamy, M. (2002).** « Données actuelles sur la toxicité de l’oxygène », Réanimation éditions scientifiques et médicales, n°11, pp 28-39.
- **Delattre, J., Beaudeau, J., Bonnefont, L., & Rousselot, D. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques, 87-108 p.

- **Djenane, D., Gómez, D., Yangüela, J., Roncalés, P., & Ariño, A. (2019).** Olive leaves extract from Algerian Oleaster (*Olea europaea* var. *sylvestris*) on microbiological safety and shelf-life stability of raw halal minced beef during display. *Foods* 8 (1) : 10.
- **DSASI, (2014).** Série B, direction des statistiques agricoles et des systèmes d'information. Ministère de l'Agriculture, de Développement Rural.

E

- **Ece, A., Gürkan, F., Celik, F., Boşnak, M., Yel, S., Balik, H. & Erel, O. (2007).** Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. *Clinical Biochemistry*, 40(9-10), 634-9.
- **Edeoga, H. O., Okwu, D. E., & Mbaebie, B. O. (2005).** *Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants.* *Afric J Biotech.* 4: 685 – 688.

F

- **Fabre, G., Bayach, I., Berka, K., Palonciová, M., Starok, M., Rossi, C. & al., (2015).** « Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes », *ChemCommun*, vol. 51, n° 36, p. 7713-6
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108p.
- **Favier, A. (2006).** «Stress oxydant et pathologies humaines», *Annales Pharmaceutiques Françaises*, n°64, p. 390-396.
- **Flora, S. J. S. (2009).** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxi Med Cel Long* 2: 191–206.
- **Foret, R., Brack, M., & Garrel, C. (2009).** Evaluation et correction du stress oxydatif du porcelet en post-sevrage. *Journées Recherche Porcine*, 41(1),173-178. En ligne <http://journées-recherche-porcine.com/texte/2009/sante/s02.pdf>.
- **Frankel, E. N. (1998).** *Lipid Oxidation : The Oily Press.*Ed. Dundie, Scotland. 303p.

G

- **Gardès-Albert, M., Bonne font-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?, *L'actualité chimique* ; 91-95.
- **Ghedira, K. (2008).** L'olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83-89

- **Gonzalez, M., Zarzuelo. A., Gamez. J. M., Utrilla, M. P., Jimenez, J., & Osuna, I. (1992).** Hypoglycemic activity of olive leaf, *Planta Med* 58 : 513–515.
- **Green, P. S. (2002).** *A revision of Olea L.* Kew Bull. vol. 57 : p. 91–140.
- **Gunstone, F., & Norris, F. (1983).** In : *Lipids in Food-Chemistry. Biochemistry and Technology* Pergamon Press, p.p. 161-165.
- **Gutteridge, J. M .C & Halliwell, P. B. (1993).** « Invited Review Free Radicals in Disease Processes: A Compilation of Cause and Consequence », *Free Radic Res Commun*, n°193, p.141-58

H

- **Haleng , J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., & Chapelle J. P. (2007).** « Les stress oxydant ». *Rev Med Liege*, n°62, p. 628-638.
- **Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2008).** *Free Radicals in Biology and Medicine.* Fourth Edition. Oxford University Press. Citer dans la Thèse de Doctorat (2015): Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : revue bibliographique, 44-61 p.
- **Haloui, E., Marzouk, Z., Marzouk, B., Bouftira, I., Bouraoui, A., & Fenina, N. (2010).** Pharmacological activities and chemical composition of the *Olea europaea L.* leaf essential oils from Tunisia. *Journal of food, agriculture and environment*, 8 (2): 204 – 208.
- **Haton, C. (2005).** « Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale». Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, 2005, pp. 43.
- **Henry, S. (2003).** L'huile d'olive: Son intérêt nutritionnel, ses utilisations en pharmacie et en cosmétique. 128.
- **ITAFV, (2008).** L'oléiculture en Algérie "Situation actuelle de l'oléiculture en Algérie".

K

- **Karumi, Y., Onyeyili, P. A., & Ogugb uaja, V. O. (2004).** *Identification of active principales of M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Scien.* 4: 179 – 182.
- **Khan, A. M., Qureshi, R. A., Ullah, F., Gilani, S. A., Nosheen, A., Sahreen, S., & al. (2011).** Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *J Med Plants Res.* 5 (25) : 6017 – 6023.

- **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 165-177.
- **Kohen, R., & Nyska, A. (2002).** Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *toxicolo pathol*, 30, 620-650.

L

- **Lahmadi, A., Filali, H., Samaki, H., Zaid, A., & Aboudkhal, S. (2019)** Phytochemical screening, antioxidant activity and inhibitory potential of *Ficus carica* and *Olea europaea* leaves 15(3): 226-232
- **Lehucher-Michel M. P., Lesgards J. F., Delubac O. Stocker, P., Durand, P., & Proste, M. (2001).** Stress oxydatif et pathologies humaines. *Press med*, 30(21), 1076-1081.
- **Li, H., Horke, S., & Förstermann, U. (2014).** Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 237, 208-219.
- **Lubec, G. (1996).** The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *Journal of*
- MADR-DSASI, (2014) Répartition Régionale du Potentiel oléicole

M

- **Magder, S. (2006).** Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life ?. *Critical care*, 10(1), 208.
- **Mahbouli, A. (1974).** L'économie oléicole dans le Bassin méditerranéen. L'olivier. Paris : CIHEAM, p. 39-43.
- **Maillard, P. (1975)** L'olivier. Comité technique de l'olivier section spécialisée de l'INVFLEC. Paris, 137 p.
- **Majob, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., & Vahidipour, H. R. (2003).** *Phytochemical screening of some species of Iranian plants.* *Iranian J Pharma Res.* 77 – 82.
- **Meddour, E., & Soualem, M. (2021).** Contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation des propriétés antioxydante d'*Olea europaea*. Mémoire de Master en Biologie. Département de Biologie. Faculté SNV-STU, Université de Bordj Bou Arreridj.

- **Mezouar, D., Aissaoui, M., Benmessaoud, A., & Lahfa F. B. (2022).** Phytochemical analysis and alpha-amylase inhibitory property of olive (*Olea europaea* L.) leaves extracts. *Journal of Natural Product Research and Applications (JNPRA)*, 1 (3) : 56-67.
- **Mezouar, D., Azzi, R., Abbou, F., Mouderas, F., Aissaoui, M., & Lahfa F. B. (2021).** Alpha-amylase inhibitory activity and antioxidant effect of *Olea* var. *europaea sylvestris* leaves extracts. *Genet. Biodiv. J, Special issue (Aromatic and Medicinal Plants)*, 146-158.
- **Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Más V., Pérez, V., & Estepa, A. (2005).** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV), *Antiviral Research*, 129-136

N

- **N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sci Nat.* 6 (1): 1 – 15.

O

- **Oloyede, O. I. (2005).** Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pak J Nutr.* 4: 379 – 381.
- **Orban, J., & Mineur, C. (2010).** Oxygène, stress oxydant. *Désordres métaboliques et réanimation.* Springer, 427-437.

P

- **Pacher, P. (2007).** « Nitric and peroxynitrite in Health and disease », *Inphysiologie review*, vol. 87, n°13, p. 15_424
- **Pan, L., Carcache, EJ. de Blanco & Kinghorn, A. D. (2009).** Plant-Derived Natural Products as Leads for Drug Discovery. In : Osbourn AE et Lanzotti V, éditeurs. *Plant-derived Natural Products ; Synthesis, Function, and Application.* London New York : Springer p. 547 – 551.
- **Pillou, F. (2014).** « Radicaux libres – Définition », *Journal des Femmes.*
- **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, 233-239.

- **Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraigne, J. (1999).** "Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer." *Medi-Sphere*, 97, 29-33.
- **Puppo, A. & Halliwell, B. (1988).** «formation for hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological fenton reagent? », *J Biochemistry*, n°249, p. 90-185

R

- **Roeding-Penman, A., & Gordon, M. H. (1998).** Antioxidant Properties of Myricetin and Quercetin in Oil and emulsions. *Journal of American Oil Chemist's Society*. Vol (75), 169-180.

S

- **Saulnier, L., Vigouroux J., & Thibault, J. F. (1995).** Isolation and caractérisation *Andrade Investigative Medicine*. 44: 324-346.
- **Sergent, O., Griffon, B., Cillard, P., & Cillard, J. (2001).** Alcool et stress oxydatif. *Pathologie Biologie*, 49(9), 689-95.
- **Shimon, L. (1997).** Biologie et physiologie de l'olivier. *Encyclopédie mondiale de l'olivier* pp: 61-105.
- **Stalikas, S. D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30 (18), 3268 – 95. [https://doi: 10.1002/jssc.200700261](https://doi.org/10.1002/jssc.200700261)

T

- **Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Farhat, N., Drouin, A., Gendron, M., & Thorin É. (2010).** Âge et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *Med Sci*, 26(10), 875–880.
- **Trujillo, I., Rallo, L., & Arus, P. (1995).** Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 318–324

V

- **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., TD Cronin, M., Mazur, M., & Josué, T. (2007).** « Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease », In *Biochem Cell Biol*, n°39, p. 44-84
- **Verdier, E. (2003).** L'Huile d'olive : son intérêt nutritionnel, ses utilisations en pharmacie et en cosmétique. (Thèse de doctorat). Université Henri Poincaré-Nancy 1.
- **Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006).** *Isolation and Identification of Phenolic Compounds*, *Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht : Springer.

W

- **Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., & al., (2003).** «Mechanisms control mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic activator PGC-1. Yu BP». Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction, n°98, p. 115-124.

X

- **Xu, J., Lian, L., Wu, C., Wang, X., Fu, W. Y., & Xu, L. H. (2009).** Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of Bax and Bcl-2 expressions in mice. Food and chemical toxicology, 46: 1488–1494.

Y

- **Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995).** Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 43: 27 – 37.

Z

- **Zaïri, A., Nour, S., Zarrouk, A., Haddad, H., Khélifa, A., & Achour, L. (2020).** Phytochemical profile, cytotoxic, antioxidant, and allelopathic potentials of aqueous leaf extracts of *Olea europaea*. *Food science and nutrition*, 8 (9), 4805 – 4813.
- **Zarzuelo, A., Duarte, J., Jimenez, J., Gonzalez, M., & Utrilla, M. P. (1991)** Vasodilator effect of olive leaf, *Planta Med* 57: 417–419.
- **Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999).** *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.* Food Chem. 64 : 555 – 559.
- **Zovko Cončić, M., Kremer, D., Karlović, K., & Kosalec, I. (2010).** Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol.* 48 : 2176 – 2180.