

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

**Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité
Biologique**

Mémoire de Master

Biologie

Option

Biochimie Appliquée

Présenté par

Mr Bouabdallah Adel

**Evaluation de l'activité antioxydante des
feuilles d'olivier sauvage (*Olea europea
sylvestris*)**

Jury

Mme Boucherit – Otmani Z	Professeur	Présidente	Université de Tlemcen
Mr Rahmoun N M	Maître de conférences B	Examineur	Université de Tlemcen
Mr Lahfa F B	Maître de conférences A	Promoteur	Université de Tlemcen
Mlle Mezouar D	Doctorante	Invitée	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2013 – 2014

Je dédie ce travail

À ma famille, et en particulier, à ma mère pour tout ce qu'elle a fait durant mes années d'étude que j'honneur ce succès, et à mon père pour son soutien moral.

À ma fiancée pour m'avoir encouragé dans les moments difficiles. Je la remercie pour sa patience.

À mes deux grandes mères que j'adore.

À mes cousins et cousines.

À tous mes amis de l'université et d'ailleurs.

Remerciements

Merci à Dieu de m'avoir donné la foi et de m'avoir guidé dans la prospection, pour la réalisation de ce travail.

Ce travail n'aurait pu se faire sans le soutien de mes parents que je remercie de tous cœur pour leurs encouragements.

Mes remerciements les plus profonds vont à mon promoteur Mr Lahfa F B, Maître de Conférences A, à l'Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen. Je le remercie de m'avoir accordé sa confiance et son soutien, aussi pour son sérieux et sa gentillesse.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont été mes professeurs durant mon cycle. Merci à vous Mme Bouchrit – Otmani Z, Professeur et Directrice du laboratoire LAPSAB à l'Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury. Je la remercie aussi d'avoir mis à ma disposition tous les moyens pour me faciliter le travail afin de le terminer dans de bonnes conditions.

Mes chaleureux remerciements vont à Mr Rahmoun M N, Maître de Conférences B à l'Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail, pour son assistance et son aide infaillible.

Mes remerciements à tous mes professeurs qui m'ont transmis leur savoir faire durant mon cursus universitaire.

Je ne voudrais pas omettre de remercier également Mr Boufatah Abdessalam, responsable de l'Audio visuel à l'Université Abou Bekr Belkaid, pour ces encouragements et son soutien constant.

Mes remerciements aux professeurs de l'université d'Oran pour leur aide précieuse.

Mes remerciements les plus profonds à Mlle Mezouar Dounia, Doctorante à l'université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen, tous d'abord pour m'avoir choisi dans son équipe, ainsi que pour m'avoir guidé et suivi durant toute la préparation de ce travail.

Mes remerciements vont également à Mr Hammad Ilyes, un collègue exemplaire, pour son amitié durant toutes ces années d'études et pour son aide qui m'a été bénéfique.

Je remercie Mr Sallah Mustapha, doctorant à l'université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen pour ses conseils et pour m'avoir facilité le travail au niveau du laboratoire.

Je remercie également l'ensemble du personnel qui m'a porté son soutien et leur aide : étudiants, doctorants, techniciennes, et tous ceux que je ne pourrais citer individuellement.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	5
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
Résumé.....	13
I. Plantes Médicinales :	18
1. Introduction	18
2. Métabolites secondaires :	19
a. Les composés phénoliques :	19
➤ Tanins	19
➤ Quinones	20
➤ Coumarines	21
➤ Flavonoïdes	21
b. Les composés azotés :	22
➤ Alcaloïdes	22
3. Plantes à activité antioxydante :	22
II. L'olivier sauvage (<i>Olea europea sylvestris</i>)	24
1. Introduction :	24
2. Classification :	25
3. Répartition géographique:	25
4. Description botanique:	26
5. Composition chimique :	27
5. Propriétés biologiques :	28
6. Utilisation traditionnelle :	29
III. Stress oxydatif	30
1. Radicaux libres :	30
2. Stress oxydatif :	32
3. Conséquences du stress oxydatif	33
4. Antioxydants	34
4. 1. Défenses enzymatiques	34
4.1.1 Superoxydes dismutases (SOD) :	34
4.1.2 Catalases :	34

4.1.3 Glutathion peroxydases:	35
4.2 Défenses non enzymatiques	36
4.2.1 La vitamine C :	36
4.2.2 La vitamine E :	36
4.2.3 Polyphénols :	36
4.2.4 Cuivre :	36
4.2.5 Manganèse :	36
4.2.6 Zinc:	37
4.2.7 Sélénium:	37
5. Antioxydants synthétiques :	37
I. Etude phytochimique :	40
1. Matériel végétale :	40
2. Tests phytochimiques :	40
2.1 Dosage qualitatifs :	40
2.1.1 Alcaloïdes	40
2.1.2 Substances polyphénoliques	41
✓ Flavonoïdes : Réaction à la cyanidine	41
✓ Anthocyanines (Leucoanthocyanes)	41
✓ Tanins	41
2.1.3 Coumarines	41
2.1.4 Quinones libres	41
2.1.5 Stérols et triterpènes : Test de Lieberman – Burchardt	41
2.1.6 Terpénoïdes : Test de Slakowski	42
2.1.7 Saponosides	42
2.1.8 Composés réducteurs	42
2.2 Dosages quantitatives :	42
2.2.1 Dosage des polyphénols :	42
2.2.2 Dosage des flavonoïdes :	42
II. Activité biologique :	43
1. Piégeage du radical libre DPPH :	43
2. Réduction du fer – FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power:	44
I. Etude phytochimique	47
1. Rendements des extraits bruts :	47
2. Tests phytochimiques :	47

2.1	Tests qualitatifs :	47
2.2.	Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes :.....	48
3.	Activité antioxydante :	50
3.1	Piégeage du radical libre DPPH :	50
2.2	Réduction du fer FRAP :	54

Liste des figures

Figure 1 : Les structures chimiques des principales familles de flavonoïdes.....	22
Figure 2 : Arbéquina et Cailletier commerciales	24
Figure 3 : Répartition de l'olivier dans la méditerranée : (A) olivier sauvage indiqué par les flèches rouges et (B) olivier en générale.....	26
Figure 4 : L'oléastre de la région de Tlemcen (Ourit).....	27
Figure 5 : Structure chimique de l'oleuropéine	28
Figure 6 : Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres	31
Figure 7 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène	32
Figure 8 : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant	33
Figure 9 : Réaction d'intervention du Glutathion peroxydase.....	35
Figure 10 : Structures de quelques antioxydants synthétiques	38
Figure 11 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental	45
Figure 12 : Rendements des extraits sous reflux de l'olivier sauvage	47
Figure 13: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	49
Figure 14: Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	49
Figure 15 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux.....	50
Figure 16 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique.....	50
Figure 17: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydroacétonique.....	51
Figure 18: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	51
Figure 19: Représentation des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux.....	52
Figure 20: Représentation des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique.....	53

Figure 21: Représentation des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydroacétonique.....	53
Figure 22: Représentation des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	54
Figure 23: Pouvoir réducteur des extraits aqueux, hydrométhanolique et hydroacétonique de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP.....	54

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques plantes à pouvoir antioxydant étudiées au LAPSAB	23
Tableau 2 : Résultats de l'examen phytochimique.....	48
Tableau 3 : Valeurs des CI_{50} des extraits de l'olivier sauvage.....	52
Tableau 4 : Densités optiques obtenues pour l'extrait aqueux de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP.....	75
Tableau 5 : Densités optiques obtenues pour l'extrait hydrométhanolique de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP.....	75
Tableau 6 : Densités optiques obtenues pour l'extrait hydroacétonique de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP.....	76
Tableau 7 : Densités optiques obtenues pour l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP...	76
Tableau 8 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux.....	77
Tableau 9 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique.....	77
Tableau 10 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydroacétonique.....	78

Liste des abréviations

% : Pourcentage

$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AlCl_3 : Chlorure d'aluminium

AQ : Anthraquinone

BHA : Butylhydroxyanisole

DPPH : Radical 2.2 diphényle-1-picrylhydrazyl

DXR : Doxorubicine

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

Fe^{2+} : Ions ferreux

Fe^{3+} : Ions ferriques

FeCl_3 : Chlorure de fer

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

g : Gramme

GPX : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GSHPx : Glutathion peroxydase

GSR : Glutathion réductase

GSSG : Glutathion oxydé

H_2O : Eau distillée

H_2O_2 : Le peroxyde d'hydrogène

HHDP : Hexahydroxydiphénique

$\text{HO}\cdot$: Le radical hydroxyle

HOCl : Acide hypochloreux

Kg : Kilogramme

LDL : Lipoprotéine de faible densité

Mg CEQ/100g : milligramme équivalent catéchine par 100 gramme de matière sèche

Mg GAE/100g : milligramme équivalent acide gallique par 100 gramme de matière sèche

NADPH : Nicotinamide-Adénine-Dinucleotide-Phosphate

NaNO_2 : Nitrite de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₄OH : Ammoniaque
NO : Oxyde d'azote
NO• : Monoxyde d'azote
O₂ : Oxygène moléculaire
O₂•- : Le radical superoxyde
OH : Hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
ONOO• : Peroxynitrite
RLO : Radicale libre dérivé de l'oxygène
RO : Le radical alkoxy
ROO• : Le radical peroxy
ROOH : Peroxyde alkyle
SOD : Superoxyde dismutase
TBHQ : Tertiarybutylhydroquinone
THBP : trihydroxybutyrophenone
UV : Ultra-violet
VLDL : Lipoprotéine de très faible densité
XO : Xanthine Oxydase

Résumé

Olea europea var. *sylvestris* L. est un arbre qui appartient à la famille des Oléacées. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Les feuilles de la plante ont été soumises à une extraction sous reflux dans l'eau distillée, eau/méthanol (30/70) (v/v) et eau/acétone (30/70) (v/v).

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les feuilles de l'olivier sauvage a montré la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols, des triterpènes en quantité importante, il a en outre révélé des quantités plus faibles de coumarines, de terpénoïdes, de saponosides et de quinones.

Une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes des extraits est réalisée, montrant des teneurs importants en polyphénols totaux et flavonoïdes. L'extrait hydrométhanolique s'est révélé le plus riche par rapport aux autres extraits (599.12 mg GAE/100 g de matière sèche et 99.49 mg CEQ/100g de matière sèche), suivie de l'extrait hydroacétonique (500.18 mg GAE/100 g de matière sèche et 79.23 mg CEQ/100g de matière sèche) et enfin l'extrait aqueux (333.04 mg GAE/100 g de matière sèche et 46.03 mg CEQ/100g de matière sèche).

Le pouvoir antioxydant a été évalué par la technique de piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer FRAP. L'activité antioxydante a ensuite été comparée à l'acide ascorbique. Parmi les trois extraits d'*Olea europea sylvestris*, l'extrait hydrométhanolique a montré l'activité la plus élevée avec un pourcentage d'inhibition de 90.97 % par rapport aux autres extraits. L'extrait hydroacétonique présentait une bonne activité antioxydante avec un pourcentage de piégeage des radicaux de 84.2 %, tandis que l'extrait aqueux a montré une capacité antioxydante inférieure de 62.54 %.

Mots clés : *Olea europea* var. *sylvestris*, extraits bruts, tests phytochimiques, dosages quantitatifs, activité antioxydante

Introduction Générale

Les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène sur les lipides, les protéines et les acides nucléiques peuvent déclencher diverses maladies chroniques. Plusieurs études ont montré que les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans l'étiologie de nombreuses maladies, telles que le vieillissement, le cancer, l'athérosclérose, les maladies coronariennes, le diabète, l'asthme et la rhinite [Barnham *et al.*, 2004; Eberhardt *et al.*, 2000; Finkel et Holbrook., 2000]. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène.

Les antioxydants agissent de plusieurs manières. Leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect, en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydantes, comme dans le cas des éléments traces. Les mécanismes les plus fréquents sont l'interruption de la spirale oxydative (vitamines C et E, NADPH, glutathion), la prévention des dégâts par la mise à disposition d'électrons (céruoplasmine, vitamine C, superoxyde dismutase, GSHPx), et la réparation des molécules d'ADN (Zn, acide folique, niacine) [Berger., 2006].

Les plantes médicinales sont une autre source importante pour une grande variété d'antioxydants naturels. Les plantes médicinales ont été utilisées pour traiter les maladies humaines pour des milliers d'années. Les gens sont de plus en plus intéressés par les plantes médicinales en raison de leur bonne performance thérapeutique et une faible toxicité.

Au cours des dernières années, des études sur les activités antioxydantes des plantes médicinales ont augmenté de façon remarquable due à un intérêt accru pour leur potentiel d'être utilisé en tant que source d'antioxydants riche et naturel. Parmi ces plantes : *Citrullus colocynthis*, *Limoniastrum feei*, *Pistacia lentiscus* et bien d'autres [Atmani *et al.*, 2009; El Haci *et al.*, 2012; Benariba *et al.*, 2013].

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à rechercher l'activité antioxydante de l'olivier sauvage de la famille des oléacées. Cet arbre qui couvre une superficie de 9 500 000 hectares dans le monde, poussent surtout 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 qu'au niveau de l'hydrométrie [Ghedira., 2008].

Dans notre étude, nous allons évaluer l'activité biologique de l'espèce *Olea europea sylvestris*. Ainsi, l'analyse de cette espèce portera sur la recherche des principaux groupes chimiques et le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes et sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de l'olivier sauvage.

Synthèse Bibliographique

I. Plantes Médicinales :

1. Introduction

Ces dix dernières années, le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité. Non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans les systèmes de santé [OMS., 2003].

Le manque de médicaments essentiels, l'insuffisance des soins de santé, le coût élevé des médicaments et les habitudes socioculturelles des populations expliquent le recours aux pratiques traditionnelles à base de plantes médicinales [Sanogo., 2006].

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments [Maurice., 1997].

Face à l'insatisfaction constatée des remèdes modernes, les pistes phytothérapeutiques traditionnelles semblent renforcer un potentiel intéressant, dont le processus de mise en valeur, de la plante au phyto-médicament, à travers des procédés scientifiques adéquats, pourrait offrir une alternative crédible, en faveur des communautés [Koane *et al.*, 2012].

Pendant des milliers d'années, les plantes ont été utilisées non seulement pour aromatiser les aliments, mais aussi en tant que médicaments. Récemment, elles ont été reconnues comme une source précieuse de composés antioxydants, y compris les substances phénoliques [Roberta et Benvenuto., 2014]. Ces composés sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, telles que les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres [Dugas *et al.*, 2000].

Les plantes médicinales représentent une opportunité pour les communautés rurales d'Afrique. En effet, de nombreux produits sont d'ores et déjà exportés, et connaissent un succès lié à la multiplicité de leurs usages médicaments génériques, huiles essentielles ou cosmétiques... Une partie de la production est transformée sur place, et une partie est vendue de manière informelle sur les marchés locaux par des herboristes [Centre Technique Agricole., 2007].

Aussi, les plantes médicinales contiennent des molécules qui représentent des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, cosmétique, en dermopharmacie, et

agroalimentaire. Parmi ces composés, les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés dans le domaine thérapeutique [Anderson et Markham., 2006].

2. Métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des molécules nécessaires à la défense de la plante contre les agressions extérieures. Ils sont produits en très faible quantité, et présentent une grande variété structurale (plus de 200 000 structures définies) [Hartmann., 2007]. Les produits naturels sont les principales sources de molécules bioactives [Priva et Aparna., 2012].

Parmi les métabolites secondaires bioactifs présents dans les plantes :

- Les composés phénoliques : tanins, quinones, coumarines, flavonoïdes
- Les composés azotés : alcaloïdes
- Les terpènes

a. Les composés phénoliques :

Durant ces dernières années, plusieurs chercheurs se sont intéressés aux composants phénoliques à cause de leur pouvoir à piéger les radicaux libres et les bienfaits potentiels de leur consommation sur la santé humaine [Manach *et al.*, 2004].

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent tous un point en commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH [Hennebelle *et al.*, 2004].

Les composés phénoliques diffèrent dans leur structure selon le nombre et la position des hydroxylations et méthylations du cycle aromatique [Bourgou *et al.*, 2008]. On les retrouve dans de nombreux fruits, légumes, le café, les prunes, les myrtilles, le raisin et les pommes. Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique [Bossokpi., 2002].

➤ Tanins

Les tanins sont un groupe diversifié de métabolites secondaires des plantes qui ont deux caractéristiques communes : tous sont des polyphénols et tous ont la capacité de fixer les protéines. Cependant, l'étude des effets nutritionnels des tanins est complexe parce que les

plantes contiennent une grande diversité de tanins. Certains tanins produisent des effets toxiques tandis que d'autres bénéficient de la santé et de la nutrition [Harvey., 2006]. Les tanins, sont des constituants naturels du thé vert, vin rouge, et d'autres produits végétaux [Keil *et al.*, 2004]

Les tanins inhibent la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes mais aussi l'oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate. Lors de la peroxydation les tanins donnent des protons face aux radicaux libres, et ainsi, des radicaux taniques stables sont formés. Ce qui permet de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique. Les effets bénéfiques du thé vert ne sont plus à prouver. Le thé par ces polyphénols en particulier le gallate d'épigallocatechine, possède des propriétés antioxydantes et capte les radicaux libres. Les polyphénols du thé vert ont en plus des propriétés antimutagènes ; des propriétés anticancéreuses qui ont été démontrées [Ekoumou., 2003].

Chez les végétaux supérieurs, il y'a deux groupes de tanins qui diffèrent par leur structure et leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [Biaye., 2002].

a) tanins hydrolysables : Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins éllagiques [Bruneton., 1999].

b) tanins condensés : Ce sont des polymères ou oligomères flavaniques, constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités [Khanbaba et Ree., 2001].

Aussi, les tanins ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénols. Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois efficaces que les phénols simples [Peronny., 2005].

➤ **Quinones**

Les quinones sont des composés intéressants qui ont des caractéristiques uniques et plusieurs rôles importants. Ils sont largement distribués dans la nature, y compris dans les tissus animale et végétale. Ils ont un rôle important dans la chaîne de transport d'électrons pour maintenir les fonctions biologiques des plantes et des animaux. En plus de ces rôles biologiques, les quinones ont été utilisées dans une grande variété de pratique clinique.

Par exemple, la doxorubicine(DXR) est une anthraquinone(AQ) antibiotique qui a été utilisé cliniquement dans le traitement des tumeurs malignes [Naoya et Naotaka., 2014].

Les quinones sont attachées aux composés phénoliques simples. Certaines quinones plus complexes, où la partie aromatique est liée à une chaîne latérale isoprénique, assurent souvent des fonctions biologiques essentielles chez les êtres vivants, en particulier, le transfert des électrons dans les mitochondries et les chloroplastes [Macheix *et al.*, 2005].

➤ **Coumarines**

Les coumarines et leurs dérivés sont des produits naturels qui sont largement utilisés pour des fins pharmaceutiques, agricoles et cosmétiques [Moussaoui et Bensalem., 2007]. Ils ont des activités anti-thrombotiques, anti-inflammatoires et vasodilatatrices [Cowan., 1999]. Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires [Anderson *et al.*, 1996].

➤ **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus large des composés polyphénoliques. Ils sont classés en flavonols, flavones, flavanones, chalcones, flavanes, isoflavones, flavanols et anthocyanes **fig. 1** [Derbel et Ghedira., 2005]. Du fait de leurs propriétés antioxydantes, liées à leur structure polyphénolique, les flavonoïdes ingérés avec nos aliments sont réputés pour protéger l'organisme contre les effets délétères des apports environnementaux oxydants [Stoclet et Schini-Kerth., 2011].

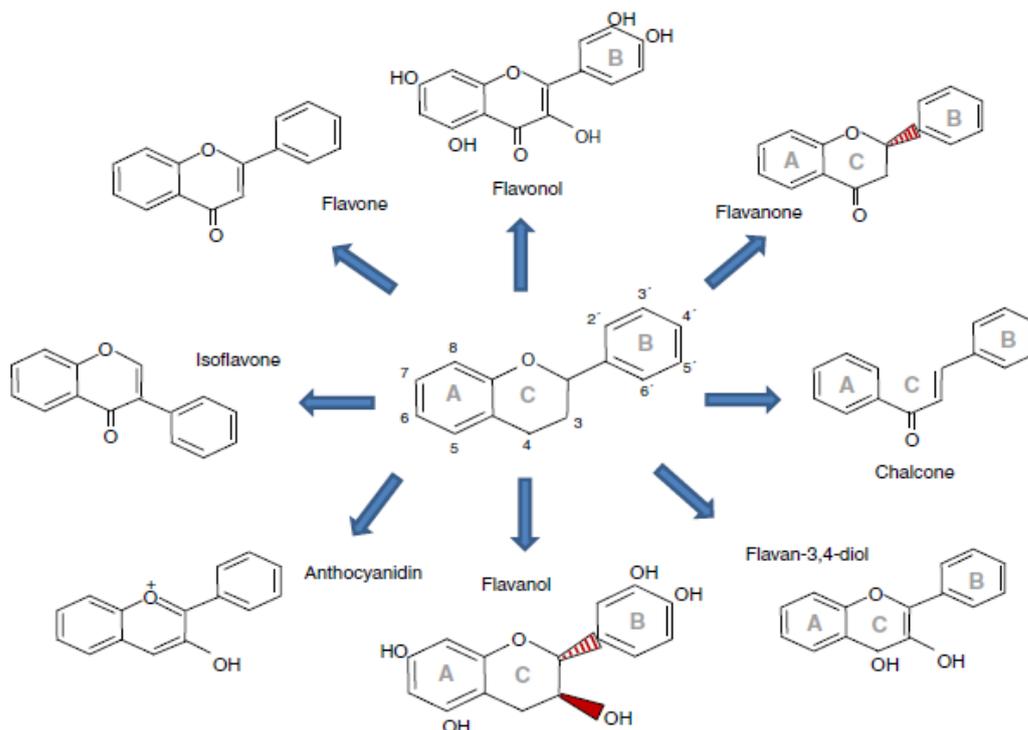


Figure 1: Les structures chimiques des principales familles de flavonoïdes
[Fraga et Oteiza., 2011].

b. Les composés azotés :

➤ Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, azotées et à caractère alcalin. Bien que beaucoup d'entre eux soient toxiques (comme la strychnine ou l'aconitine), ils représentent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. Ils ont joué un rôle important dans la découverte des médicaments (morphines, quinine cocaïne, atropine...) et dans le développement de l'industrie pharmaceutique [Omulokoli *et al.*, 1997]. L'étude de leur mécanisme d'action a conduit à les employer comme réactifs biologiques en neurochimie et en chimiothérapie. Ils sont dotés aussi d'un pouvoir antioxydant [Roué., 2011].

3. Plantes à activité antioxydante :

Notre laboratoire LAPSAB (Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique) a engagé depuis plusieurs années une recherche de nouvelles molécules bioactives qui présentent des activités biologiques.

Parmi ces activités étudiées, l'activité antioxydante de certaines plantes locales (tableau 1) utilisées traditionnellement en Algérie.

Tableau 1 : Quelques plantes à pouvoir antioxydant étudiées au LAPSAB

Non scientifique	Non vernaculaire	Partie utilisée	Références
<i>Berberis vulgaris</i>	Ghriss	Ecorce des racines	Mezouar Dounia , 2013
<i>Echium vulgare</i>	Vipérine	Feuilles, Tiges et Racines	Gheffour Kamila , 2012
<i>Ceratonia siliqua</i>	Kharoub	Fruits	Billami Fatiha, 2011
<i>Helichrysum stoechas</i>	Zeheureddaime	Fleurs, Tiges feuillés	Berrahi fatima zohra, 2013
<i>Citrullus colocynthis</i>	Handal	Graines	Benariba Nabila <i>et al.</i> , 2013

Il existe aussi dans la région de Tlemcen, l'olivier sauvage *Olea europea* subsp *europea* var. *sylvestris* qui est utilisée traditionnellement pour traiter le diabète sucré et autres affections. Pour cela, nous nous sommes intéressés à rechercher l'activité antioxydante des feuilles de l'olivier sauvage qui représente une nouvelle source pour la recherche de nouvelles molécules bioactives.

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

1. Introduction :

Les produits végétaux sauvages récoltés ont généralement une valeur soit de consommation, de subsistance ou commerciale. Parmi eux, on retrouve les arbres d'oliviers sauvages, connus sous le nom oléastres (*Olea europaea* subsp *europaea* var *sylvestris*) [Campbell et Luckert., 2002].

Les populations d'oliviers sauvages sont distribuées dans différents environnements, avec des altitudes différentes et des sols qui peuvent être une source très importante de sa résistance aux stress abiotiques tels que la sécheresse, le sel, le vent et la baisse de température [Aranda *et al.*, 2011].

Pour les botanistes, l'olivier normal est appelé *Olea europaea* subsp *europaea* var *europaea*, alors que l'oléastre est de variété *sylvestris*. L'olivier est cultivé tandis que l'oléastre est sauvage. L'olivier peut s'échapper des cultures et revenir à un état apparemment sauvage. Dans la plupart des pays, certains cultivars portent des fruits de petite taille, comme, «Arbequina» en Espagne, ou «Cailletier» en France **fig. 2** [Breton *et al.*, 2008].



Figure 2 : Arbequina et Cailletier commerciales

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

L'olivier sauvage africain *Olea europaea* ssp. *Cuspidata* est un arbre précieux de la forêt afro-montagnarde sec, capable de se régénérer naturellement [Aerts *et al.*, 2006]. Les formes sauvages de l'olivier (oléastres), sont toujours membres du maquis naturel [Green., 2002].

L'utilisation de la population d'oliviers sauvages peut être également une autre alternative pour la reproduction d'olive [Guerin *et al.*, 2003].

2. Classification :

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé "*Olea*" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce cultivée en Méditerranée est "*Olea europaea*", dans laquelle on trouve l'oléastre ou l'olivier sauvage, et l'olivier cultivé.

La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon [Ghedira., 2008] est la suivante :

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre: *Olea* L.

Espèces: *Olea europea* L.

Sous-espèces : *Olea europaea* L. ssp. *Oleaster* Hoffm. et Link (= *O. europea* L. ssp. *Sylvestris* Miller).

3. Répartition géographique:

L'olivier (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) est l'une des plus anciennes cultures d'arbres agricoles dans le bassin méditerranéen avec une importance culturelle et économique remarquable. En fait, à ce jour, plusieurs travaux se sont concentrés sur l'évaluation de la distribution et de la variabilité entre les olives cultivées et sauvages [Lavee., 2013].

Plusieurs centaines de divers cultivars d'oliviers géographiquement existent dans le bassin méditerranéen. Ils se distinguent par la morphologie des feuilles, la forme de drupe et la couleur, la composition de l'huile et de la phénologie (adaptation avec les climats) [Breton *et al.*, 2008]. Les populations d'olivier sauvage sont limitées à quelques secteurs isolés des forêts

natales de la Méditerranée **fig. 3(A)**, où le pollen peut être distribué par le vent et les oiseaux [Lumaret *et al.*, 2004].

La sélection de nouveaux cultivars de la population de l'olivier sauvage devient problématique, même dans les régions où l'olivier est très réponsus, dus à la diminution graduellement à cause de l'augmentation des oliviers domestiques dans les vergers **fig. 3(B)**. D'autre part, la pollinisation croisée entre les oliviers sauvages restants et les cultivars domestiqués plantés pourraient conduire à une augmentation des olives sauvages [Lavee., 2013].

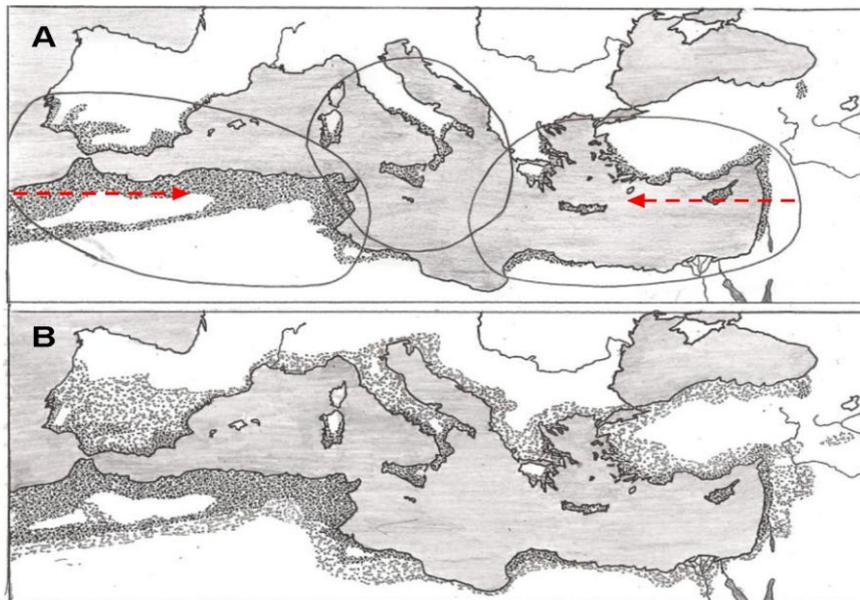


Figure 3: Répartition de l'olivier dans la méditerranée : (A) olivier sauvage indiqué par les flèches rouges et (B) olivier en générale.

4. Description botanique:

L'olivier est sempervirens, c'est-à-dire qu'il est toujours verts, ses feuilles sont lancéolées, vert grisâtres. Ses fleurs s'épanouissent en petites grappes blanches, chaque grappe donnera un seul fruit. Son fruit ovoïde (drupe), il a un noyau fusiforme. Son bois très dur est imputrescible et est utilisé en ébénisterie [Artaud., 2008].

L'oléastre diffère de l'olivier cultivé par la présence des pousses courtes et épineuses, des fruits de petite taille, une faible teneur en huile [Terral et Arnold-Simard., 1996]. Les feuilles de l'olivier sauvage sont de courte longueur, de largeur moyenne. Les fruits de la plupart des oliviers sauvages en une forme elliptique, et avec un faible poids **fig. 4**. Une corrélation

élevée et significative des dimensions du fruit et la teneur en huile a été observée. Cela pourrait être d'intérêt pour l'utilisation des oliviers sauvages. En dépit de cela, il convient de mentionner que les oliviers sauvages avec des poids de fruits 1,3 g et le pourcentage d'huile d'olive dans la matière sèche 33,8 % est comparable aux valeurs mentionnées pour certains cultivars d'oliviers [Hannachi *et al.*, 2008].



Figure 4 : L'oléastre de la station de l'Ourit de la région de Tlemcen.

5. Composition chimique :

Des études récentes ont montré que les olives contiennent des antioxydants en abondance (jusqu'à 16g/kg), représentés par les actéosides, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et les acides phénylpropioniques ainsi que d'autres composés [Owen *et al.*, 2004].

L'huile d'olive se caractérise par son parfum délicat et unique. Cet arôme très particulier est dû à toute une gamme de composants présents en très faibles quantités tels que les alcools, les composés polyphénoliques, la chlorophylle, les caroténoïdes, les stérols, les tocophérols et les flavonoïdes. Certains de ces composés dont les tocophérols et les phénols, jouent un rôle important comme antioxydants naturels qui piègent les radicaux libres de l'oxygène et préservent la qualité et la stabilité de l'huile durant des périodes prolongées de conservation, ainsi ils contribuent à la qualité organoleptique comme le goût, la saveur et la valeur nutritive [Doveri et Baldoni., 2007]. Elle a aussi d'excellentes propriétés nutritionnelles, sensorielles et fonctionnelles et est un produit agricole avec une importance économique majeure dans la région méditerranéenne. L'huile d'olive vierge est particulièrement appréciée pour sa grande stabilité par rapport aux autres huiles végétales et de sa teneur élevée en constituants tels que les acides gras monoinsaturés (AGMI) et les composés phénoliques [Bendini *et al.*, 2006].

Les acides gras dominants sont les acides gras monoinsaturés (AGMI) dont l'acide oléique (C 18:1), et les acides gras polyinsaturés (AGPI) dont l'acide linoléique (C 18 : 2) et l'acide linoléique (C 18:3) [Salas *et al.*, 2000].

Les fruits de l'olivier (*Olea europaea* L.) et ses produits dérivés représentent une source connue de plusieurs composants naturels d'une bioactivité importante [Bouaziz *et al.*, 2005], tels que les antioxydants dont les caroténoïdes, les tocophérols, les flavonoïdes et les composants phénoliques, parmi lesquels les plus abondants sont les secoiridoïdes comme l'oleuropéine **fig. 5** et le diméthyleoleuropéine [Bianco et Uccella., 2000].

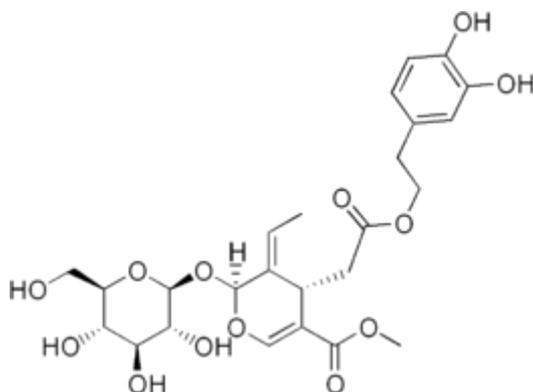


Figure 5: Structure chimique de l'oleuropéine

Les feuilles de l'arbre contiennent des quantités variables d'oligo-éléments en fonction de plusieurs facteurs: de la physiologie végétale, les conditions environnementales (principalement, les éléments disponibles dans le sol) et l'âge de la feuille [Perrinjaquet-Mocetti *et al.*, 2008].

5. Propriétés biologiques :

L'olivier et ses dérivés peuvent être considérés comme une source potentielle d'antioxydants naturels et qui peut être utilisé dans l'industrie pharmaceutique [Savarese *et al.*, 2007].

Les feuilles d'olivier et l'huile d'olive diminuent l'incidence des maladies du cœur [Cook et Samman., 1996]. De nombreuses activités ont été attribuées à la plus part des composants phénoliques de l'olivier ; ils agissent comme des agents antioxydants, anti-inflammatoires, anti-viraux et anti-cancérogènes [Visioli *et al.*, 2002]. Cependant, seule les extraits de feuilles d'olivier et l'huile d'olive extra vierge (acidité <1%) sont considérés comme une source importante de ces composants [Visioli et Galli., 2002]. Les polyphénols de l'olivier ont une énorme capacité à piéger les radicaux libres et montrent un comportement synergique lorsqu'ils sont combinés, ce qui se déroule naturellement dans les feuilles d'olivier et donc

dans leurs extraits [Polzonetti *et al.*, 2004]. Parmi ces polyphénols, l'hydroxytyrosol et tyrosol qui contribuent au goût amer, astringence, et à la résistance à l'oxydation [Visioli et Galli., 2002].

Les feuilles d'olivier possèdent la plus forte capacité à piéger les radicaux libres par rapport aux différentes parties de l'arbre d'olivier, ils présentent aussi une concentration importante en composants à haute valeur [Savournin *et al.*, 2001]. Il est mentionné par certains auteurs que l'extrait de feuille d'olivier réduit la pression artérielle et le cholestérol du plasma chez les rats [Perrinjaquet-Moccetti *et al.*, 2008]. De plus, les acides gras mono-insaturés disponibles dans les feuilles d'olivier tels que l'acide oléique, diminuent les lipides du plasma dont les LDL et VLDL et préviennent des maladies cardio-vasculaires [Huang *et al.*, 2010].

L'extrait de feuilles d'olivier peut contenir des traces d'éléments vitaux tels que le sélénium, le fer, le zinc, la vitamine C, la β -carotène et une grande partie d'acides aminées [Polzonetti *et al.*, 2004].

Les feuilles contiennent aussi du cinchonidine, un alcaloïde quinoléiqueaux propriétés antipaludiques. Les feuilles, l'écorce et les fruits contiennent l'oleuropéine qui possède des activités antioxydantes, hypotensives, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiantes et antiseptiques [Ghedira., 2008].

6. Utilisation traditionnelle :

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

Les feuilles d'olivier sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle modérée. L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète (au cours de la grossesse ou en cas d'obésité) [Ghedira., 2008].

Les feuilles aussi, ont été largement utilisées en tant que remède pour le traitement de la fièvre et d'autres maladies comme le paludisme. Ils ont été consommé sous forme d'un extrait, d'un ensemble de poudre de herbor ou tisane. Ces propriétés comme : antioxydantes, anti-hypertensive, anti-inflammatoire, hypoglycémique et hypocholestérolémiantes. Les feuilles possèdent également des propriétés antimicrobiennes contre certains micro-organismes tels que des bactéries, des champignons et mycoplasmes [Ghanbari *et al.*, 2012].

III. Stress oxydatif

1. Radicaux libres :

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet, des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition [Ekoumou., 2003]. Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont, l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical superoxyde O_2^- , les peroxydes alkyles ROOH et les radicaux hydroxyles OH , les peroxydes ROO et alkoxydes RO [Cavina., 1999].

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) **fig.6**. Dans certaines conditions pathologiques, ces RLO ainsi que leurs dérivés sont produits de façon excessive. Parmi les RLO, l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) joue un rôle clé dans l'inflammation en général, et dans les maladies rhumatismales en particulier. L'anion superoxyde constitue la première forme radicalaire capable d'agresser les composantes cellulaires et matricielles. Il est également un précurseur d'autres espèces radicalaires plus réactives comme le radical HO^{\bullet} formé par l'interaction de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ avec les ions métalliques libres (fer ou cuivre). Les RLO possèdent une forte réactivité et une courte demi-vie [Afonso *et al.*, 2007].

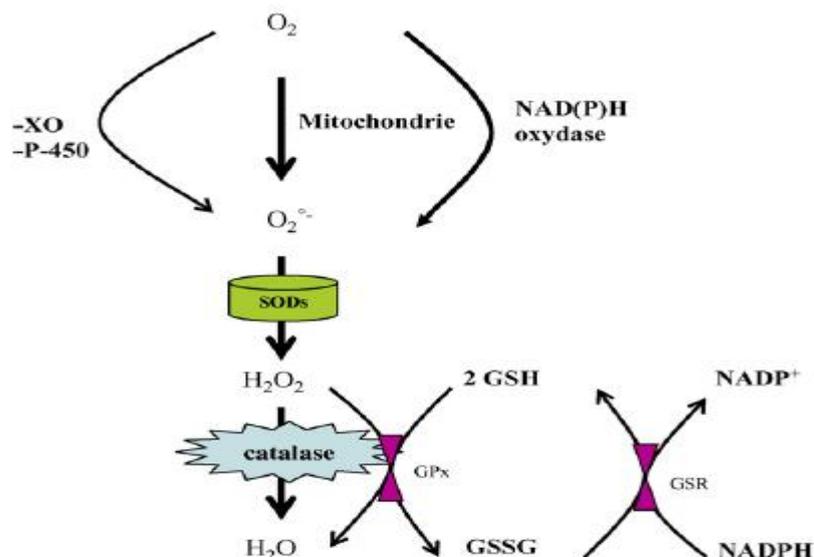


Figure 6: Sources métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres
[Afonso *et al.*, 2007].

Un grand nombre de réactions métaboliques sélectives impliquent des intermédiaires réactionnels radicalaires [Fontecave et Pierre., 2001]. Certains radicaux libres sont utilisés par l'organisme comme médiateurs régulant les fonctions cellulaires comme la prolifération et la mort cellulaire programmée (apoptose), impliquant des modifications des voies de signalisation intracellulaires associées à une modulation de l'expression génique [Haddad., 2002].

L'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou le nitro peroxyde $ONOO$ ne sont pas des radicaux libres mais peuvent en être des précurseurs. L'ensemble des radicaux libres et leurs précurseurs sont appelés espèces réactives de l'oxygène **fig.7** [Hazout *et al.*, 2008].

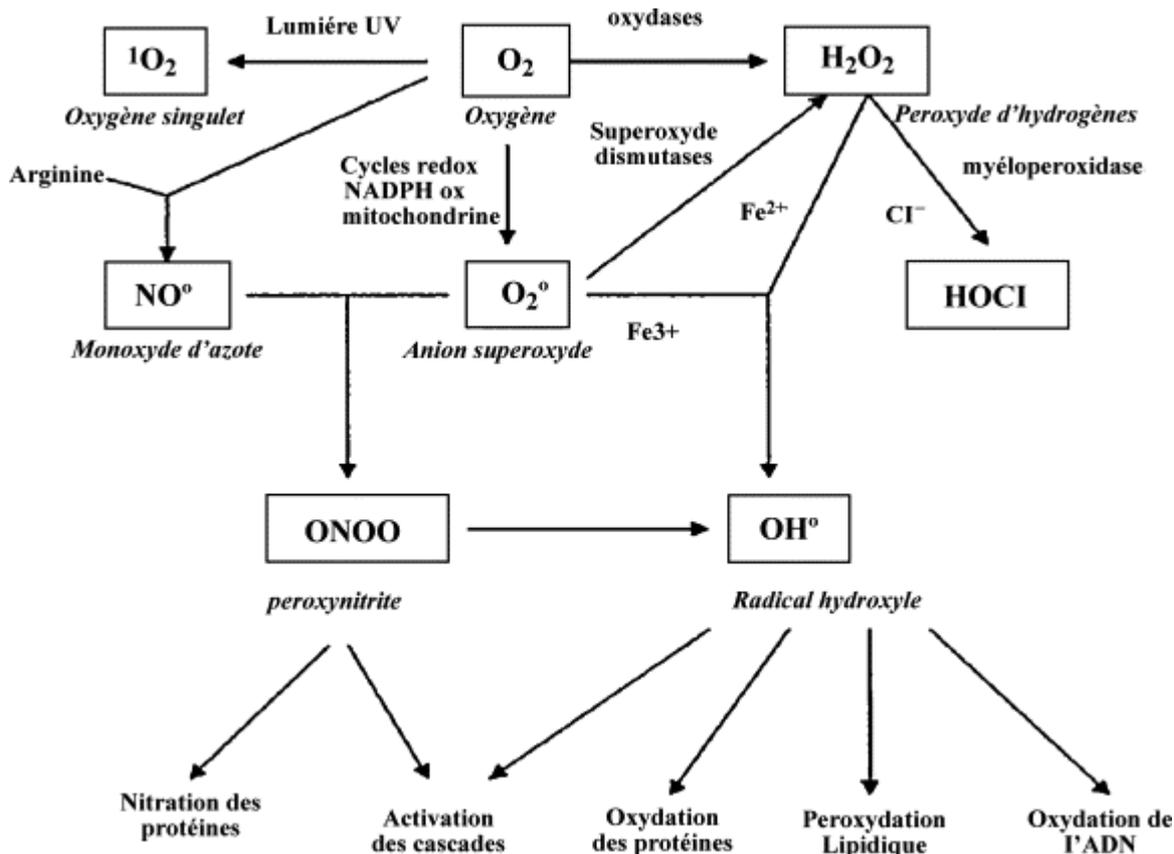


Figure 7: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène [Hazout *et al.*, 2008]

2. Stress oxydatif :

Le stress oxydatif est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à un déséquilibre entre la production des radicaux libres ou pro-oxydants et les systèmes de défenses antioxydantes **fig. 8**, ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires [Gammoudi *et al.*, 2013]. Comme exemple, l'exposition chronique au stress oxydatif peut favoriser l'apparition de cancers et maladies cardiovasculaires [Favier., 2006 ; Nkhili., 2009].

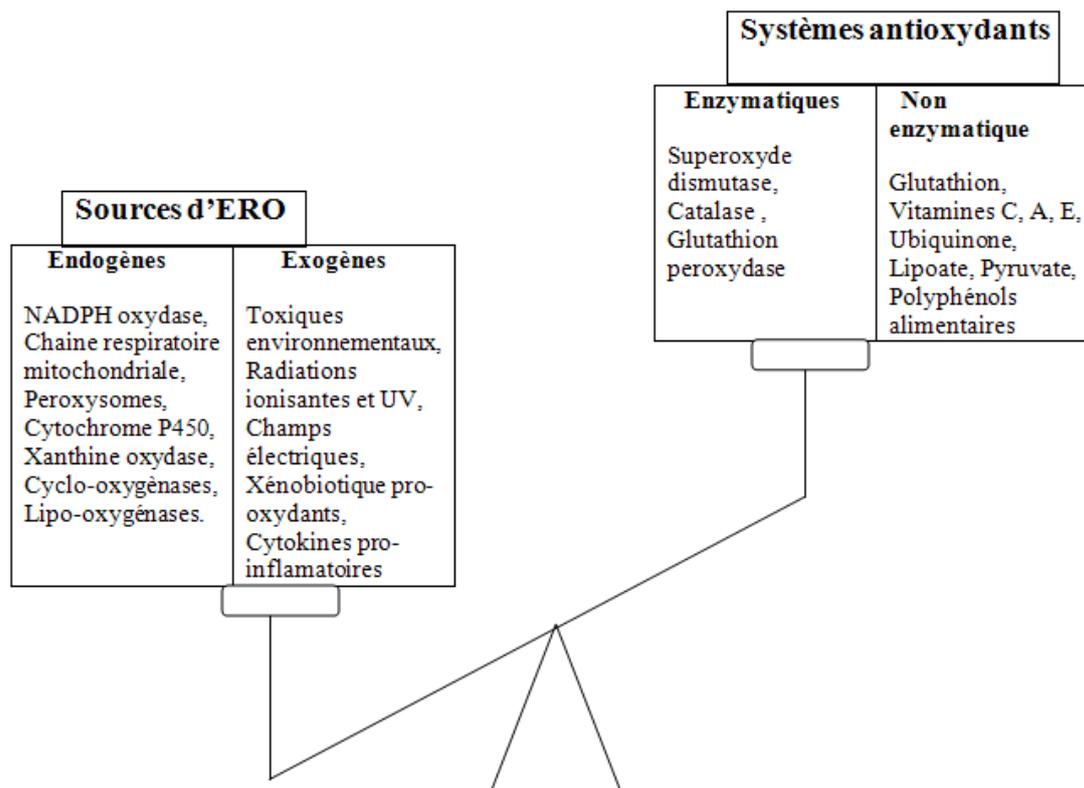


Figure 8: Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant [Nkhili., 2009].

3. Conséquences du stress oxydatif

Les conséquences biologiques du stress oxydatif seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion ; des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydatif : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, et immunosuppression [Favier., 2003].

Dans plusieurs maladies graves, notamment celles liées au vieillissement, le stress oxydatif est le facteur déclenchant originel. C'est le cas des cancers, des pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire), des maladies neurodégénératives (ataxies, sclérose latérale, maladie d'Alzheimer). La sclérose latérale amyotrophique familiale est l'exemple le plus démonstratif, puisque cette maladie génétique est due à un défaut sur le gène de l'enzyme

antioxydant superoxyde dismutase. Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydatif 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].

4. Antioxydants

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

Les défenses antioxydantes reposent sur des systèmes enzymatiques : superoxyde dismutases SOD, catalases et glutathion peroxydases ; et non enzymatiques comme les vitamines C et E, les polyphénols,...etc [Leverve., 2009]. Aussi, le maintien de ces systèmes enzymatiques nécessite la présence d'un certain nombre d'oligoéléments : cuivre, manganèse, zinc et sélénium en particulier [Jacotot., 1994].

4. 1. Défenses enzymatiques

4.1.1 Superoxydes dismutases (SOD) :

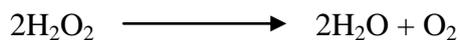
La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ en dioxygène et H_2O_2 selon la réaction :



Chez l'homme, trois isoformes compartimentées de l'enzyme SOD ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire. La Cu/Zn-SOD ou SOD₁cytosolique, et la EC-SOD ou SOD₃ extracellulaire, qui utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique, alors que la SOD₂ mitochondriale utilise le manganèse [Afonso *et al.*, 2007].

4.1.2 Catalases :

La catalase est l'une des principales enzymes du système antioxydant biologique. Elle joue un rôle important dans les voies de défense antioxydantes. Le site actif de la catalase est l'hémoglobine, et il agit en tant que catalyseur dans la décomposition de H_2O_2 en eau et oxygène moléculaire [Arockiaraj *et al.*, 2012].



4.1.3 Glutathion peroxydases:

Les GSHPx, enzymes antioxydantes, constituent l'une des principales lignes de défense contre les agressions produites par les radicaux libres de l'oxygène. Les glutathions peroxydases sont chimiquement différentes mais partagent le même rôle de détoxifiant des espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène et hydroperoxydes organiques). Leur activité enzymatique est directement proportionnelle à l'apport en sélénium et il existe donc un lien étroit entre la carence en sélénium et le stress oxydatif [Ducros et Favier., 2004].

Les GSHPx réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) **fig.9** [Goudable et Favier., 1997].

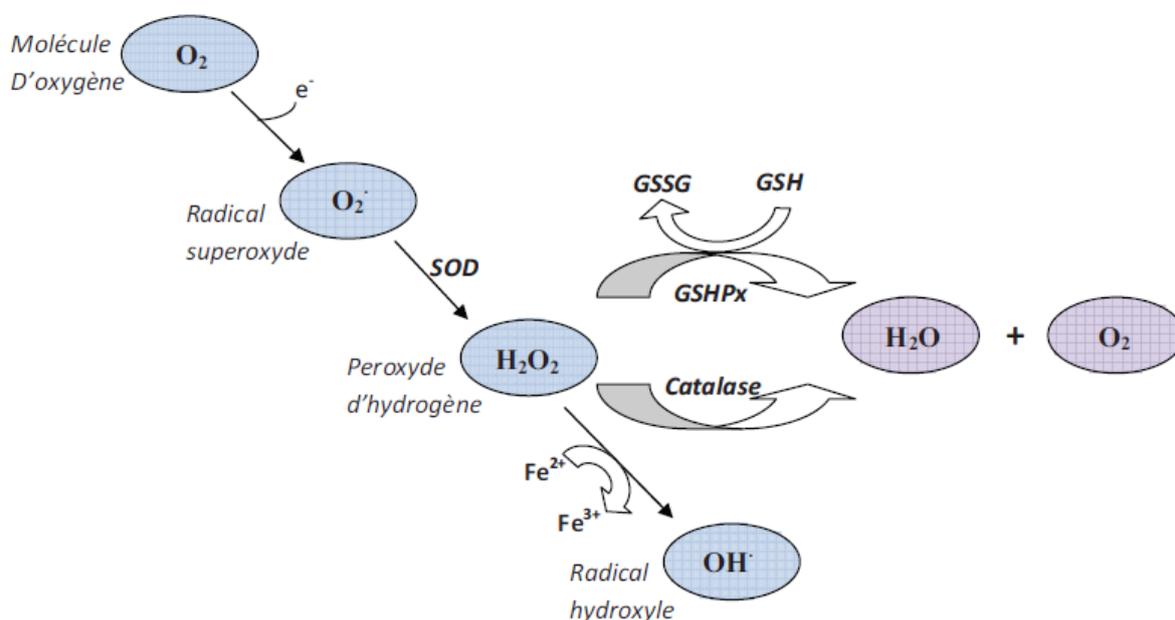


Figure 9 : Réaction d'intervention du Glutathion peroxydase [Goudable et favier., 1997].

4.2 Défenses non enzymatiques

4.2.1 La vitamine C :

La vitamine C est impliquée dans un certain nombre de processus métaboliques dans le corps humain, y compris ceux qui peuvent être importantes pour le fonctionnement optimal du système d'énergie à l'oxygène. De plus, elle présente un pouvoir antioxydant élevé, aidant à prévenir des dommages cellulaires et des troubles du système immunitaire vis-à-vis des radicaux libres générés au cours d'un exercice intense [Cholewa *et al.*, 2008].

4.2.2 La vitamine E :

Antioxydant puissant, la vitamine E circule dans le sang liée aux lipoprotéines LDL. Elle est donc vectorisée sur les sites d'oxydation des lipoprotéines et elle est particulièrement intéressante. De plus, l'administration régulière de la vitamine E ne comporte pas d'inconvénient et il n'y a pas de risque de surdosage [Jacotot., 1994].

4.2.3 Polyphénols :

Les polyphénols sont des antioxydants complexes avec une importance croissante de la santé publique, en particulier dans les domaines de la nutrition, et de l'épidémiologie. En fonction de leur structure et les caractéristiques physico-chimiques, leurs effets bénéfiques (par exemple, anti-oxydante, anti-inflammatoire et anti-tumoraux) peuvent varier [Bruneton., 1993].

4.2.4 Cuivre :

Le cuivre est un oligo-élément indispensable, essentiel dans de nombreuses réactions enzymatiques et dans la synthèse de neurotransmetteurs. Son manque ou son excès a des conséquences sur de nombreux organes, en particulier sur le foie et le cerveau [Trocello *et al.*, 2010].

4.2.5 Manganèse :

Manganèse est un oligo-élément essentiel, et est nécessaire pour de nombreuses réactions enzymatiques ubiquitaires [Dobson *et al.*, 2004].

4.2.6 Zinc:

Le zinc intervient en tant que cofacteur enzymatique au niveau de la plupart des métabolismes. Antioxydant, il contribue à la stabilisation des membranes lipidiques, les tissus en formation étant particulièrement sensibles au stress oxydatif du fait de l'importance de leurs besoins en oxygène et de la fuite inévitable d'anions superoxydes lors de la production d'énergie par la chaîne respiratoire mitochondriale [Favier et Hininger-Favier., 2005].

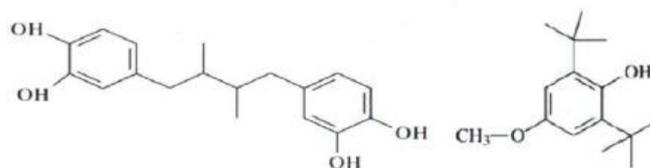
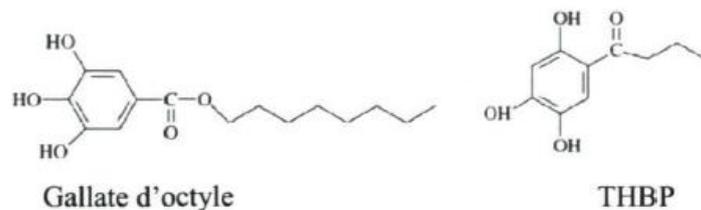
4.2.7 Sélénium:

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases séléno-dépendantes, et à l'activité biologique antiradicalaire des sélénoprotéines [Neve *et al.*, 1989].

5. Antioxydants synthétiques :

Plusieurs antioxydants synthétiques sont utilisés en cosmétiques et dans les huiles végétales **fig. 10** comme exemple : le butylhydroxyanisole (BHA), le tertiarybutylhydroquinone (TBHQ), le 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP), le di-tertbutyl-4-hydroxyméthylphénol (IONOX-100), le gallate de propyle (PG), le gallate d'octyle (OG), l'acide nordihydroguaiaretique (NDGA) et le 4-hexylresorcinol (4HR) [Guo *et al.*, 2006].

Le gallate de propyle et le butylhydroxyanisole **fig. 10** sont des antioxydants phénoliques synthétiques hautement actifs qui agissent en inhibant la chaîne de réactions d'initiation et en réduisant de la peroxydation des acides gras insaturés [Xiang *et al.*, 2007]. Malgré leur grand pouvoir antioxydant, l'excès de ces antioxydants synthétiques peut être toxique, responsable de mutagénicité et peut même présenter un danger sur la santé humaine [Williams., 1994].



Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) Di-tertbutyl-4-hydroxymethylphenol (IONOX-100)

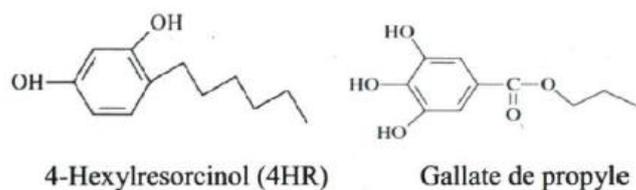


Figure 10: Structures de quelques antioxydants synthétiques

Matériel et méthodes

Cette étude expérimentale est réalisée au sein du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico- Chimie, Synthèse et Activités Biologiques. Elle se divise en deux parties :

La 1^{ère} partie : Tests phytochimiques qualitatifs et dosages quantitatifs des polyphénols totaux et des flavonoïdes.

La 2^e partie : évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits en utilisant deux techniques : la réduction du fer FRAP et le piégeage du radical libre DPPH.

I. Etude phytochimique :

1. Matériel végétale :

Les feuilles de l'olivier sauvage sont récoltées à la station de l'Ourit - Tlemcen durant le mois de Décembre 2013. Ensuite, elles sont séchées à l'abri de la lumière et de l'humidité et à température ambiante.

Une fois séchée, la matière végétale a été réduite en poudre à l'aide d'un mortier, puis extraite sous reflux en utilisant trois solvants selon le protocole suivant : 20g de la poudre végétale a été mélangé avec 200 ml d'un de ces solvants : eau, eau/ méthanol (30 :70) (v/v), eau/acétone (30 :70) (v/v).

Les extraits obtenus sont filtrés sur papier filtre, puis évaporés dans une étuve à 35 °C. Les résidus obtenus sont conservés à 4° C.

2. Tests phytochimiques :

2.1 Dosage qualitatifs :

L'étude phytochimique qualitative permet de détecter les différentes familles chimiques présentes dans les feuilles de l'olivier sauvage par des réactions de coloration et de précipitation et des observations sous lumière ultra- violette.

2.1.1 Alcaloïdes

10 ml de l'extrait est évaporé à sec. Le résidu obtenu est repris dans 1.5 ml d'acide chlorhydrique 2 % sous agitation au bain marie à chaud. Après refroidissement et filtration. Le filtrat est divisé en 2 volumes égaux : le tube 1 est traité par le réactif de Mayer et le tube 2 est traité par quelques gouttes du réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc et marron respectivement indique la présence des alcaloïdes [Majob, 2003].

2.1.2 Substances polyphénoliques

✓ Flavonoïdes : Réaction à la cyanidine

1 ml de chaque extrait est ajouté à 100 µl de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition de la couleur rouge ou orange [Karumi *et al.*, 2004].

✓ Anthocyanines (Leucoanthocyanes)

A 1 ml de l'extrait est ajouté 1 ml d'alcool chlorhydrique et 1 ml d'alcool iso-amylique. Le mélange est chauffé pendant 15 min.

Coloration :

Rouge- cerise violacée : leucoanthocyanes ;

brun- rouge : catéchols.

✓ Tanins

À 1 ml de l'extrait est ajouté 200 µl de FeCl₃ 1 %. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu- noir [Karumi *et al.*, 2004].

2.1.3 Coumarines

Le résidu de chaque extrait est dissout dans 2 ml d'eau chaude. Le mélange est partagé dans deux tubes. On ajoute à un des tubes 0.5 ml de NH₄OH 25 %, ensuite, une goutte de chaque tube est prélevée puis déposée sur un papier filtre qui sera observé sous U.V. à 366 nm [Bruneton, 1999]. Une fluorescence intense est observée pour le tube contenant le NH₄OH.

2.1.4 Quinones libres

Sur un volume de chacun de nos extraits, on ajoute quelques gouttes de NaOH 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres [Oloyde, 2005].

2.1.5 Stérols et triterpènes : Test de Lieberman – Burchardt

Le résidu de chaque extrait est dissout dans 1 ml d'anhydride acétique et 0.5 ml d'acide sulfurique concentré.

L'apparition à l'interphase d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu ou au vert indique leurs présences [Edeoga *et al.*, 2005].

2.1.6 Terpénoïdes : Test de Slakowski

5 ml de l'extrait est ajouté à 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron - rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes [Khan *et al*, 2011].

2.1.7 Saponosides

10 ml de l'extrait est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min.

Une hauteur de mousse persistante, supérieur à 1 cm indique la présence de saponosides

[N' Guessan *et al*, 2009].

2.1.8 Composés réducteurs

1 ml de l'extrait est chauffé dans un bain marie, puis 200 µl de réactif de Fehling est ajouté à l'extrait. Un test positif est obtenu par la présence d'un précipité rouge brique [Cai *et al*, 2011].

2.2 Dosages quantitatives :

2.2.1 Dosage des polyphénols :

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par Vermerius et Nicholson, 2006.

0.1 ml de chaque extrait est mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée, le tout est agité par un vortex. Après 5 min, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu 1 N sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 min à la température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 100 gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/100g).

2.2.2 Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes de nos extraits est réalisé par la méthode colorimétrique décrite par Zhishen *et al*, 1999.

500 µl de chaque extrait est mélangé avec 2 ml d'eau distillée et 150 µl d'une solution de nitrite de sodium NaNO_2 à 15%. Après 6 min, 150 µl de chlorure d'aluminium $\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ à 10% est ajouté au mélange, le tout est laissé pendant 6 min. Ensuite, 2 ml d'hydroxyde de sodium à 4% est ajouté aux tubes et le volume final est complété à 5 ml.

Après 15 min, la lecture est faite à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par 100 gramme de la matière végétale sèche (mg CEQ/100g).

II. Activité antioxydante :

1. Piégeage du radical libre DPPH :

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

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

L'évaluation de la capacité antioxydante est réalisée comme suit : à 975 µl d'une solution méthanolique de DPPH à $6.34 \times 10^{-5}\text{M}$, est ajouté 25 µl des extraits à différentes concentrations (0.05 – 1 mg/ml). Le contrôle négatif est préparé, en parallèle, en mélangeant 25 µl de méthanol avec 975 µl de la solution méthanolique de DPPH.

Après incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm [Atoui *et al.*, 2005].

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

$$\text{PI \%} = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100$$

Avec : A_C : absorbance du contrôle ;

A_E : absorbance de l'extrait.

2. Réduction du fer – FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power:

Le pouvoir réducteur d'une molécule est relatif à sa capacité de transfert des électrons et peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante.

Dans cette technique, la couleur jaune de la solution change au vert et bleu selon le pouvoir réducteur de l'échantillon testé. Et, une absorbance élevée à 700 nm indique un pouvoir réducteur élevé [Zovko Končić *et al.*, 2010].

La méthode FRAP est réalisée selon le protocole de Yen et Chen., 1995.

Les extraits des feuilles de l'olivier sauvage (0.025 – 1 mg) sont dissout dans 1 ml d'eau distillée et mélangés avec 2.5 ml de tampon phosphate 2 M (pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium 1 %. Le mélange est incubé à 50° C pendant 20 min.

Après incubation, 2.5 ml d'acide trichloroacétique 10 % est ajouté pour stopper la réaction. Ensuite, les solutions sont centrifugées pendant 10 min. 2.5 ml du surnageant est ajouté à 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de la solution de chlorure de fer 0.1 %. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 700 nm.

L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif avec les mêmes concentrations et dans les mêmes conditions expérimentales.

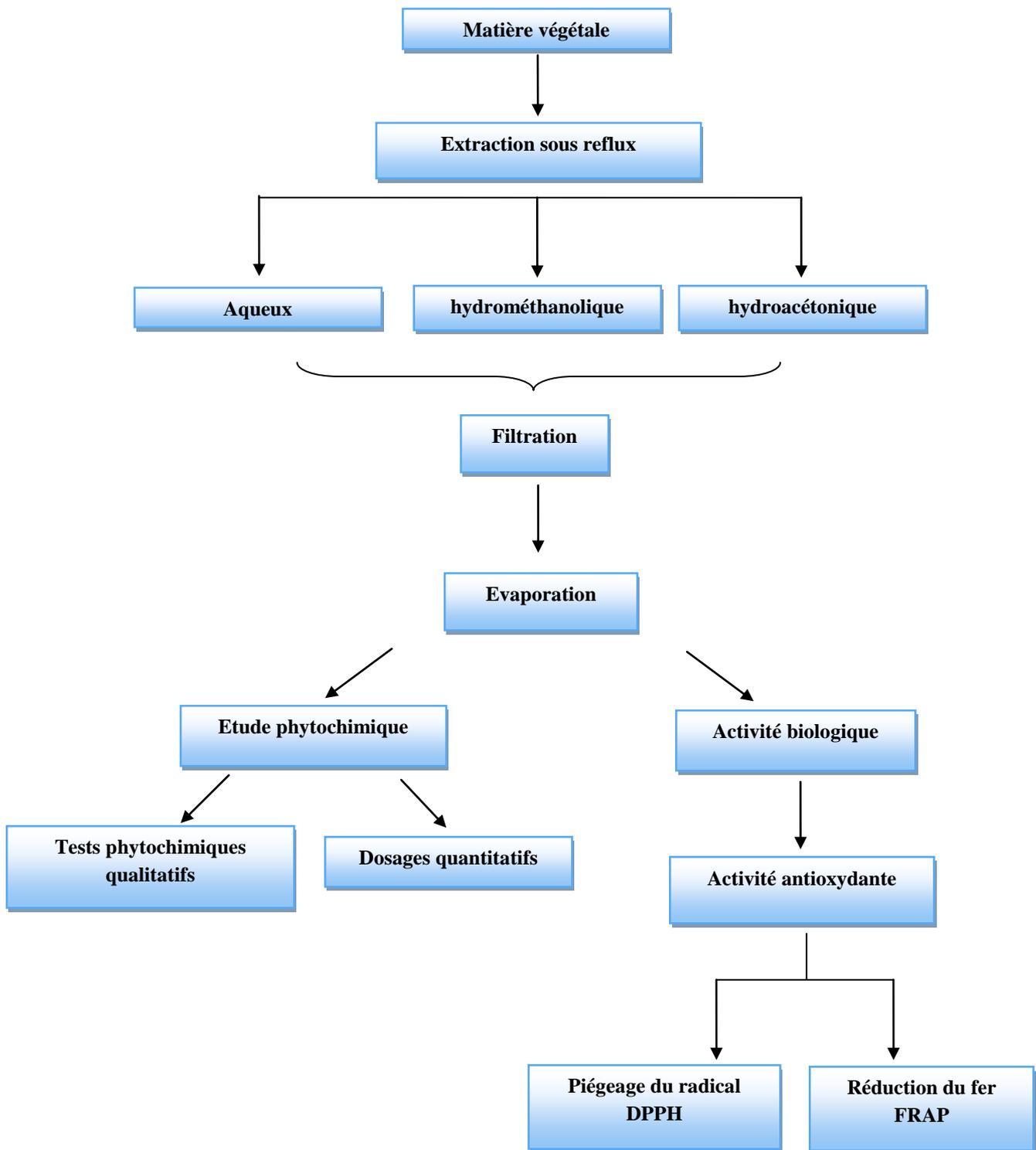


Figure 11 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental

Résultats et interprétations

I. Etude phytochimique

1. Rendements des extraits bruts :

L'extraction sous reflux des feuilles de l'olivier sauvage *Olea europea* var. *sylvestris* est réalisée pendant 3 h avec les solvants suivants : eau distillée, eau/méthanol et eau/acétone.

D'après la figure 12, nous remarquons que l'eau/acétone aux proportions (30/70) (v/v) a permis d'obtenir le meilleur rendement 15 % (p/p), suivis du solvant eau/méthanol (30/70) (v/v) avec un rendement de 24% (p/p) et enfin l'eau distillée avec 15 % (p/p).

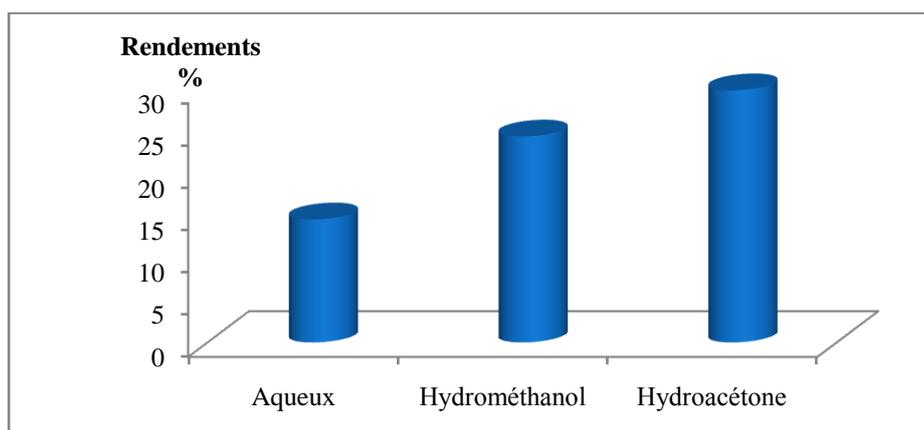


Figure 12 : Rendements des extraits sous reflux de l'olivier sauvage

2. Tests phytochimiques :

2.1 Tests qualitatifs :

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur les trois extraits aqueux, hydrométhanolique et hydroacétonique sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 2 : Résultats des tests phytochimique

Familles chimiques		Extraits		
		Aqueux	Hydrométhanolique	Hydroacétonique
Alcaloïdes	Mayer	-	-	-
	Wagner	-	-	-
Substances polyphénoliques	Flavonoïdes	+	++	+++
	Tanins	++	++	+++
	Coumarines	+	+	+
	Quinones libres	+	+	++
	Anthraquinones	-	-	-
Stérols et triterpènes		++	++	+++
Terpénoïdes		++	-	-
Saponosides		+	-	+++
Composés réducteurs		+	+	+

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

D'après les résultats obtenus, nous remarquons la présence des flavonoïdes, des tanins et des stérols et triterpènes en quantités importantes. Et la présence des coumarines, des quinones libres, des terpénoïdes, des saponosides et des composés réducteurs. Le solvant eau/acétone a extrait une quantité meilleure en familles chimiques par rapport aux autres solvants. Nous observons aussi l'absence des alcaloïdes et des anthraquinones dans nos extraits.

2.2. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes :

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 100 gramme de matière sèche (mg GAE/100g), et mg équivalent catéchine par 100 gramme de matière sèche (mg CEQ/100g) respectivement.

Les extraits aqueux, hydrométhanolique et hydroacétonique ont montré respectivement les concentrations suivantes : 338.04 mg CEQ/100 g, 599.12 mg CEQ/100 g, 500.18 mg CEQ/100 g en polyphénols totaux et 46.03 mg CEQ/100 g, 99.49 mg CEQ/100 g, 79.23 mg CEQ/100 g en

flavonoïdes. Ceci nous laisse à penser que les polyphénols sont représentés surtout par la famille des tanins qui a donné une coloration verte foncée dans l'examen phytochimique.

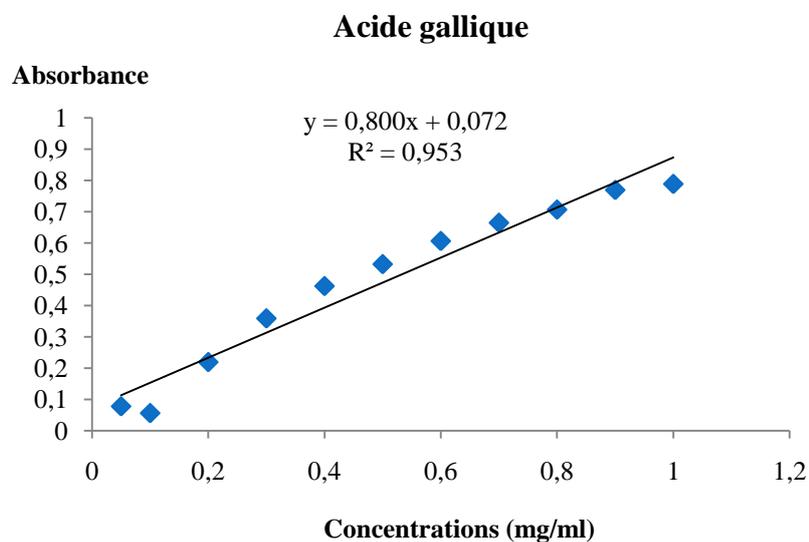


Figure 13: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

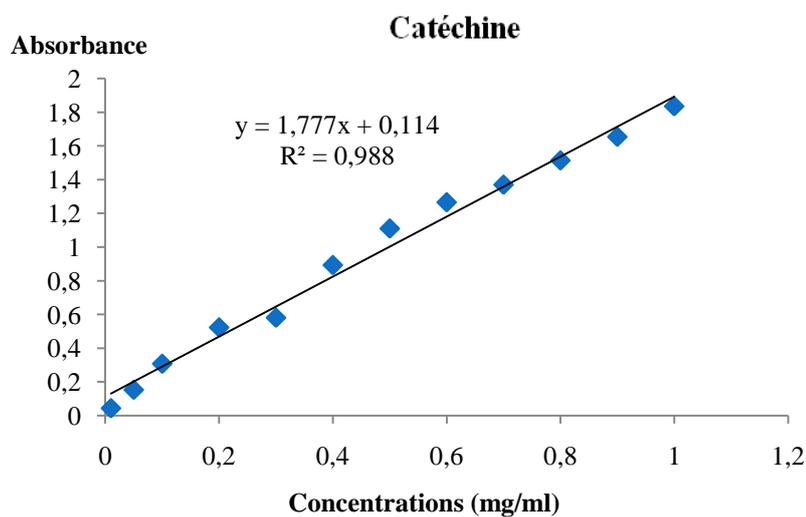


Figure 14: Courbe d'étalonnage de la catéchine

3. Activité antioxydante :

3.1 Piégeage du radical libre DPPH :

Le radical DPPH est généralement l'un des composés le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse [Bozin et *al.*, 2008].

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits.

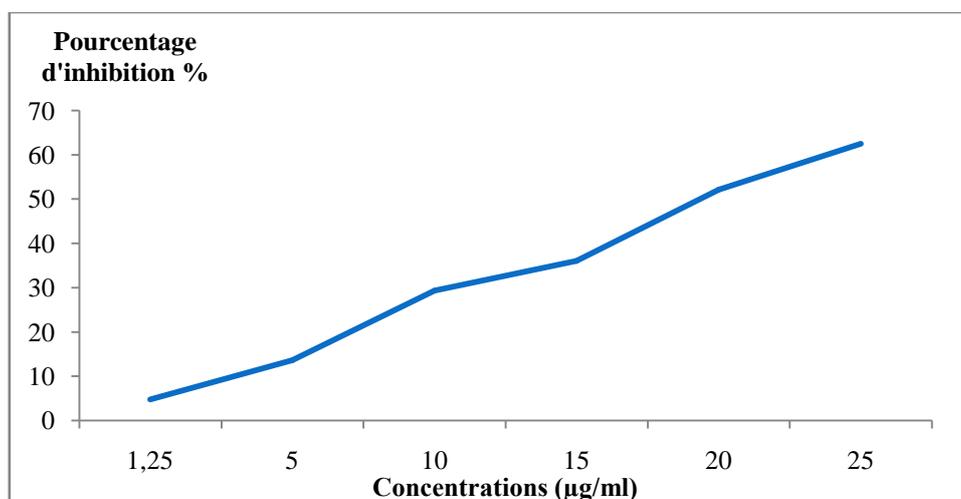


Figure 15 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux

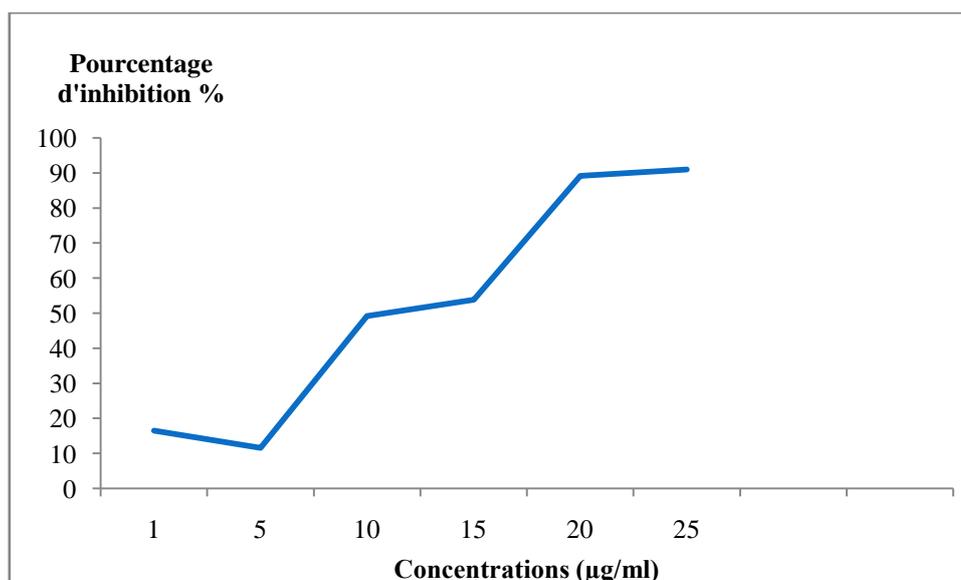


Figure 16 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique

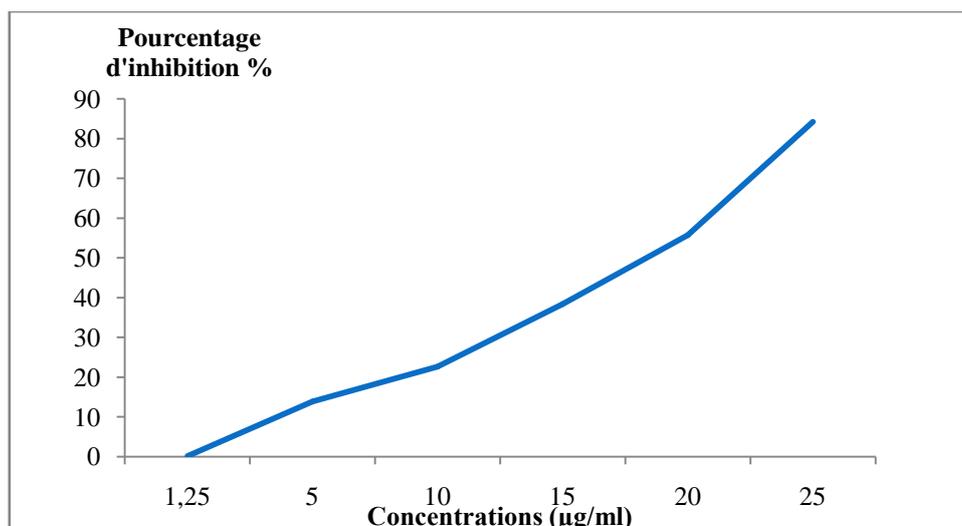


Figure 17: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydroacétonique

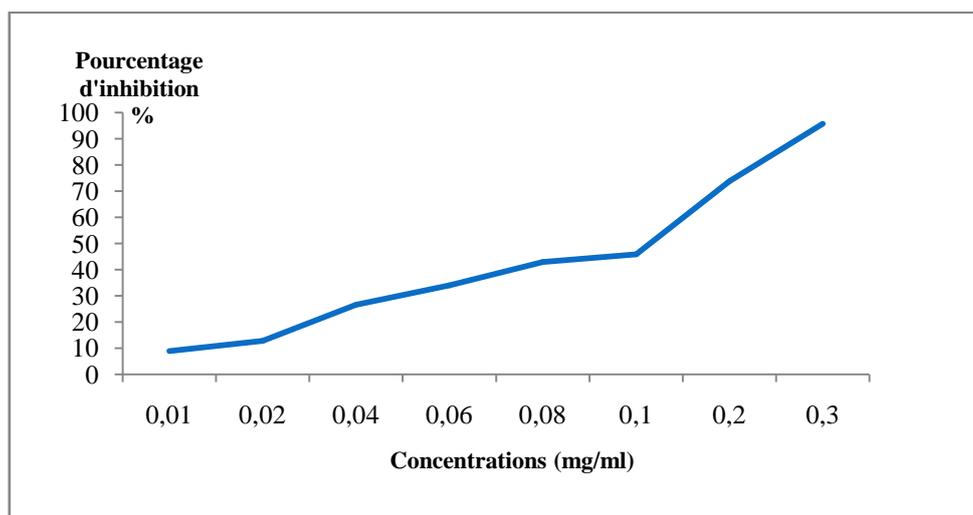


Figure 18: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique

L'extrait hydrométhanolique a montré l'activité la plus élevée avec de faibles concentrations par rapport aux autres extraits. Pour 25 µg/ml, l'extrait hydrométhanolique a atteint un pourcentage d'inhibition de 90.97%. À cette même concentration, l'extrait hydroacétonique produit un pourcentage d'inhibition de 84.2%, alors que l'extrait aqueux a présenté le plus faible pourcentage d'inhibition de 62.54%.

L'acide ascorbique a présenté la meilleure activité antioxydante par rapport aux extraits des feuilles de l'olivier sauvage avec de faibles concentrations, où la concentration de 0.3 mg/ml a produit un pourcentage d'inhibition de 95.73% (figure 18).

Ensuite, nous avons déterminé les CI_{50} des extraits à partir des équations des régressions linéaires des graphes représentés dans les figures. CI_{50} est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Les valeurs inférieures de CI_{50} indiquent l'efficacité de l'extrait et ainsi un pouvoir antioxydant plus fort.

Tableau 3 : Valeurs des CI_{50} des extraits de l'olivier sauvage

	Aqueux	Hydrométhanolique	Hydroacétonique	Acide ascorbique
CI_{50} exprimée en $\mu\text{g/ml}$	19.5	12	16.96	3.15

D'après les valeurs obtenues, l'extrait hydrométhanolique présente une CI_{50} inférieure à ceux des extraits hydroacétonique et aqueux, et donc une activité meilleure.

Les CI_{50} obtenu pour l'acide ascorbique, utilisé comme molécule de référence, est bien plus inférieur à ceux des extraits, est donc, l'acide ascorbique possède une activité antioxydante très élevé.

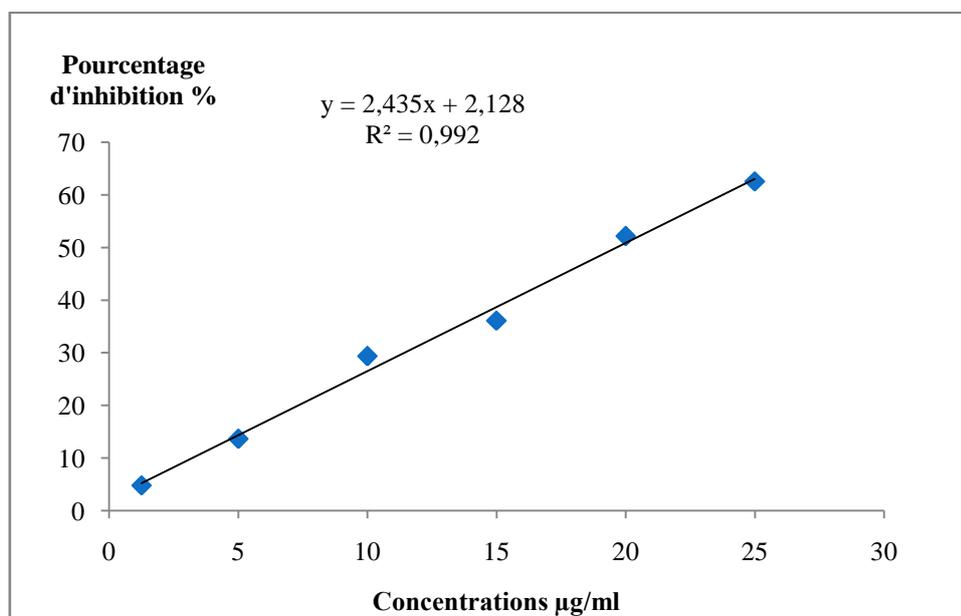


Figure 19: Représentation des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux

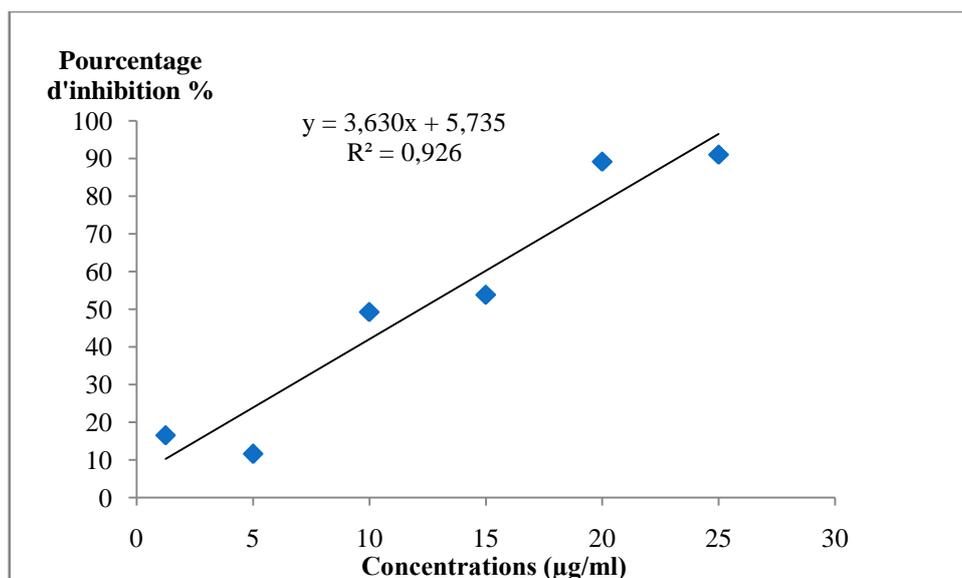


Figure 20: Représentation des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique

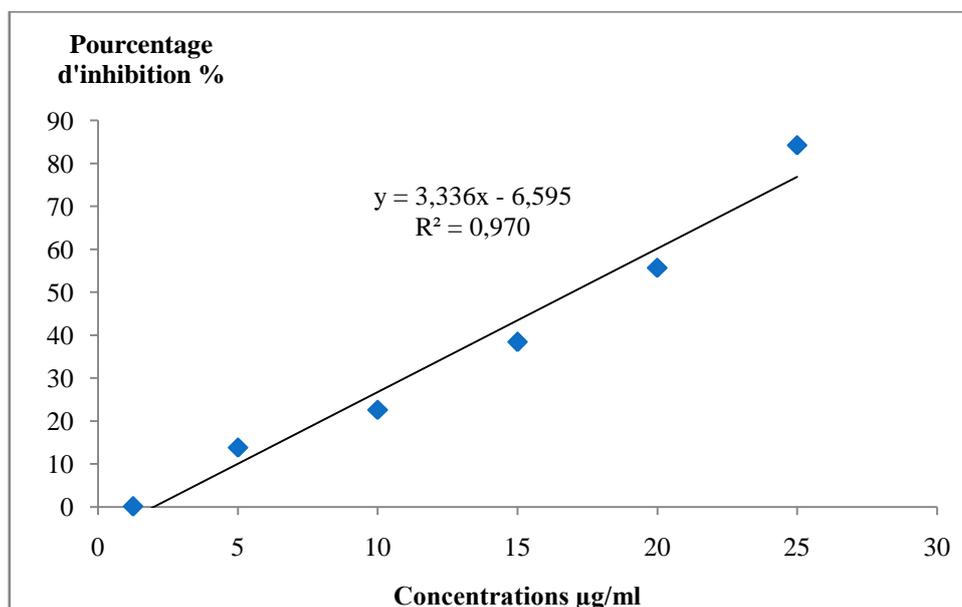


Figure 21: Représentation des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydroacétonique

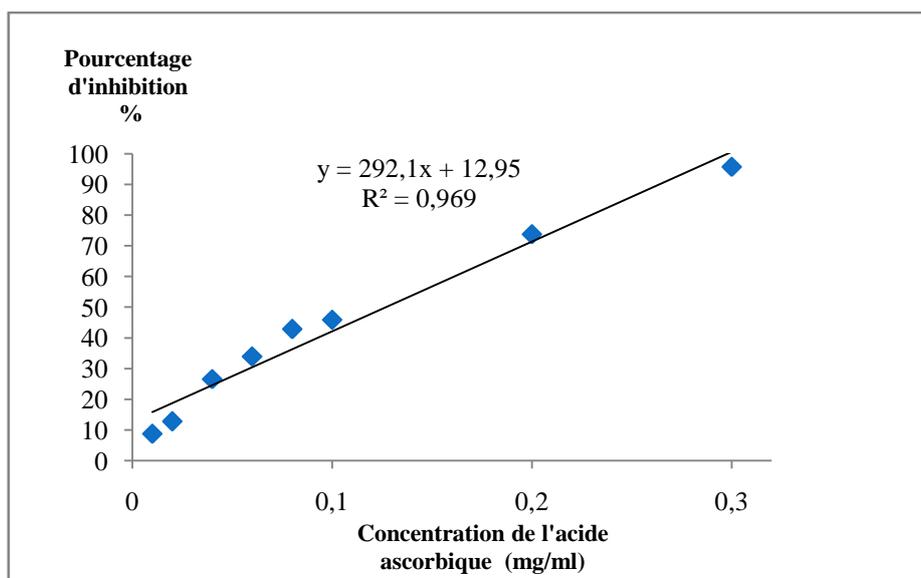


Figure 22: Représentation des régressions linéaires des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique

2.2 Réduction du fer FRAP :

L'analyse du pouvoir réducteur consiste en la mesure de l'augmentation de l'absorbance des ions ferrique (Fe^{3+}) formé par l'oxydation des ions ferreux (Fe^{2+}).

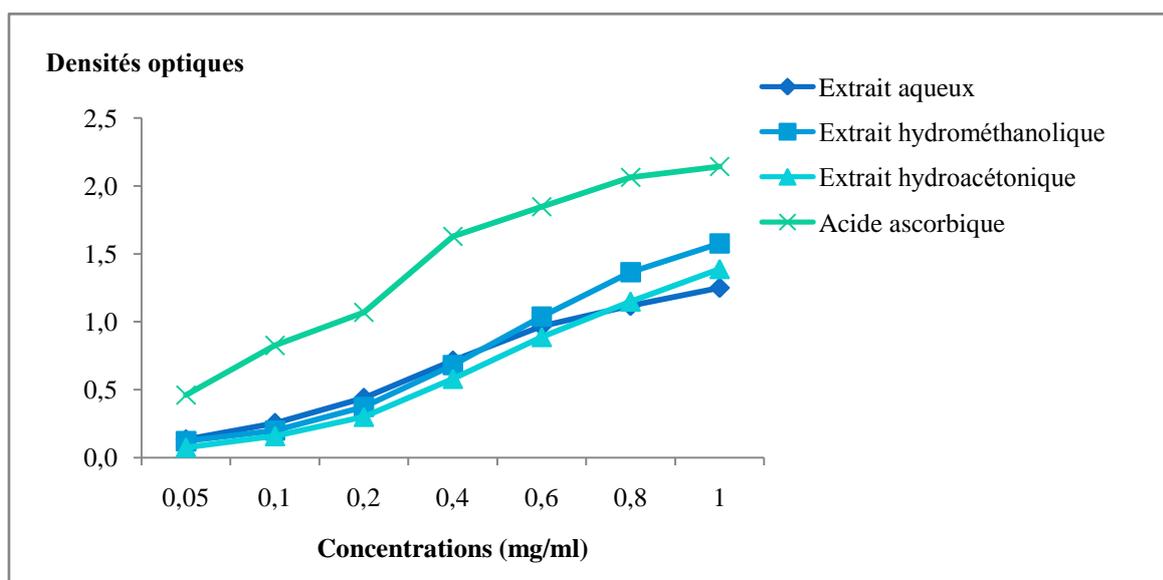


Figure 23: Pouvoir réducteur des extraits aqueux, hydrométhanolique et hydroacétonique de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP

D'après les graphes de la figure 23, nous constatons que l'extrait hydrométhanolique a présenté le plus d'activité pour réduire le fer suivi de l'extrait hydroacétonique, alors que l'extrait aqueux a présenté un pouvoir réducteur inférieur par rapport aux autres extraits. L'acide ascorbique qui est employé dans cette méthode comme un contrôle positif, a montré un pouvoir réducteur plus élevé avec les mêmes concentrations utilisées.

Aussi, nous remarquons que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration des extraits des feuilles de l'olivier sauvage.

De ce fait, nous pouvons dire que les extraits des feuilles de l'olivier sauvage possèdent une activité antioxydante très intéressante avec la technique FRAP.

Discussion

Plusieurs travaux ont présenté les effets biologiques de l'olivier cultivés montrant ses valeurs médicinales. Par contre, peu d'études ont été réalisées sur l'olivier sauvage, en particulier en Algérie. De ce fait, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antioxydante des feuilles d'*Olea europea* var *sylvestris*.

Afin d'évaluer les effets biologiques de l'olivier sauvage, nous avons réalisé des extractions des feuilles de la plante en utilisant trois solvants : eau, eau/méthanol (30/70) (v/v) et eau/acétone (30/70) (v/v). Cette étape est suivie par un screening phytochimique des extraits révélant la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et des triterpènes et des saponosides en quantités importantes, ainsi que des coumarines, des quinones libres, des terpénoïdes et des composés réducteurs avec de faibles quantités. Les tests d'alcaloïdes et d'anthraquinones ont été négatifs sur les trois extraits.

Nous avons réalisé aussi des dosages quantitatifs des polyphénols totaux et des flavonoïdes sur les extraits qui révèlent que l'extrait hydrométhanolique est plus riche par rapport aux autres extraits (599.12 mg GAE/100 g de matière sèche et 99.49 mg CEQ/100g de matière sèche), suivie de l'extrait hydroacétonique (500.18 mg GAE/100 g de matière sèche et 79.23 mg CEQ/100g de matière sèche) et enfin l'extrait aqueux (333.04 mg GAE/100 g de matière sèche et 46.03 mg CEQ/100g de matière sèche).

Faten *et al.*, (2013) ont réalisé des dosages quantitatifs de l'extrait méthanolique des feuilles de l'olivier de deux variétés chemlali et neb jmel en Tunisie, ils ont montrés que la teneur en polyphénols totale des feuilles de chemlali (de 219,85 octobre à 464,27 mg/100 g ps janvier) est plus riche que la variété de neb jmel (de 197,60 octobre à 270,53 mg/100 g ps janvier). Or, notre récolte des feuilles de l'olivier sauvage a été faite au mois de Décembre. Ce qui confirme que le maximum des polyphénols totaux a été obtenu dans la phase terminale de la croissance des feuilles c'est-à-dire le mois Décembre, montrant ainsi la richesse de notre variété en polyphénols totaux. Cette différence de teneur peut être dépendre également du profil variétal (exemple *sylvestris*) et de la zone géographique, ainsi, la variation de teneurs en polyphénols semble être liée à la zone géographique oléicole [Baccouri *et al.*, 2007 ; Rotondi *et al.*, 2004] .

Concernant les flavonoïdes, les mêmes auteurs ont obtenu les résultats suivants pour les deux variétés: 98,40 Octobre à 377,06 mg CEQ/100 g ps Janvier, obtenue à partir des feuilles de chemlali et de 119.28 Octobre à 147.96 mg CEQ/100 g ps Janvier pour neb jmel.

Certains auteurs ont recherchés les teneurs en polyphénols totaux de l'olivier montrant que les feuilles d'olivier sont plus riche en composés phénoliques bioactifs en comparaison à l'huile d'olive et aux fruits [Caponio *et al.*, 2001 ; Lalas *et al.*, 2011].

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

D'après les résultats de la technique du piégeage du radical libre DPPH, notre plante a montré une bonne activité avec les trois extraits, en particulier, l'extrait hydrométhanolique des feuilles de l'olivier sauvage qui a présenté l'activité la plus élevée avec une CI_{50} de 12 $\mu\text{g/ml}$ par rapport aux extraits hydroacétonique avec une CI_{50} de 16.96 $\mu\text{g/ml}$ et aqueux avec une CI_{50} de 19.5 $\mu\text{g/ml}$. Cette différence pourrait être attribuée aux divers composés extraits par les solvants de polarité différente [Lafka *et al.*, 2013]. L'augmentation de la solubilité du solvant méthanol joue aussi un rôle. L'activité antioxydante des composés hydroxyles phénoliques dans l'extrait des feuilles de l'olivier pourrait être due à la présence des groupements hydroxyle dans leur structure comme l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et l'acide lutéoline-7-O-glucoside [Hayes *et al.*, 2011].

Bensallah *et al.*, 2012, ont étudié l'activité antioxydante des feuilles d'une variété de l'olivier cultivé de la région Chemlali en Tunisie. Les auteurs ont obtenu une CI_{50} de 7.90 $\mu\text{g/ml}$ en utilisant l'eau/éthanol (30/70) (v/v) comme solvant d'extraction. Ce résultat est proche de celui que nous avons obtenu, ce qui montre que l'olivier sauvage pourrait être une nouvelle source des antioxydants naturels.

Selon Hayes *et al.*, (2011), l'activité antioxydante dépend généralement sur le nombre et la position des groupements hydroxyles par rapport aux groupements carboxyles fonctionnels. La structure des composés phénoliques est un facteur déterminant de leur piégeage des radicaux libres qui sont des pathogènes dans de nombreuses maladies. Certains de ces composés sont capable de chélater le fer, et donc de réduire son excès.

Pour cela, nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits par la technique de réduction du fer FRAP, qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes. Les résultats montrent que la capacité réductrice de l'extrait hydrométhanolique est plus élevée que les extraits hydroacétonique et aqueux avec des densités optiques de 1.57, 1.38 et 1.24 respectivement à la concentration de 1 mg/ml.

Selon Hayes *et al.*, (2011), les résultats de la méthode FRAP a montré une activité très élevée pour l'extrait hydrométhanolique des feuilles de l'olivier, ce qui confirme nos résultats.

D'après les résultats obtenus par Bensallah *et al.*, (2012) pour la méthode FRAP, l'extrait éthanolique des feuilles de différentes variétés d'olivier a montré une forte activité pour la réduction du fer, selon l'ordre suivant : l'extrait des feuilles de Chemlali suivi par Gerboua et Sévillane. Cela nous fait penser qu'il y a une corrélation entre l'extrait éthanolique de l'olivier cultivé avec l'extrait hydrométhanolique utilisé dans notre étude et qui a montré la meilleure activité dans la réduction du fer par rapport aux autres extraits.

La réduction de la capacité d'un composé peut servir comme indicateur de l'activité du potentiel antioxydant. La présence de réducteurs (comme antioxydants) provoque la conversion du complexe Fe^{3+} ferricyanure à la forme ferreuse Fe^{2+} . Bien que le fer soit essentiel pour le transport d'oxygène pour la respiration et l'activité des enzymes, il s'agit d'un métal réactif qui catalyse des dommages oxydatifs dans les tissus vivants et les cellules [Bourgou *et al.*, 2008].

Le classement des extraits des feuilles de l'olivier sauvage pour les deux techniques utilisées dans notre étude est dans l'ordre suivant : l'extrait hydrométhanolique, qui a montré de bon résultats, suivi de l'extrait hydroacétonique et enfin l'extrait aqueux.

Conclusion générale

Les dernières décennies sont marquées par l'intérêt particulier porté à la mise en valeur des plantes à intérêt médicinale comme source de substances bioactives naturelles. De ce fait, de nombreuses études s'intéressent, de plus en plus, aux effets antioxydants d'origine naturelle. Dans ce contexte, nous avons évalué le pouvoir antioxydant d'*Olea europea* var *sylvestris*, une plante utilisée par la population locale.

L'extraction sous reflux des feuilles de l'olivier sauvage dans différents extraits a montré de bons rendements. Le résultat obtenu montre que l'extrait hydroacétonique a présenté le rendement le plus élevé suivi de l'extrait hydrométhanolique, tandis que l'extrait aqueux a montré le rendement le plus faible.

L'analyse phytochimique qualitative a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins et des stérols et triterpènes en quantités importantes. Et la présence des coumarines, des quinones libres, des terpénoïdes, des saponosides et des composés réducteurs. Cependant, les alcaloïdes et les anthraquinones ont été absents dans nos trois extraits.

L'analyse quantitative des extraits, a montré des résultats importants pour le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes. L'extrait hydrométhanolique s'est révélé le plus riche par rapport aux autres extraits (599.12 mg GAE/100 g de matière sèche et 99.49 mg CEQ/100g de matière sèche), suivie de l'extrait hydroacétonique (500.18 mg GAE/100 g de matière sèche et 79.23 mg CEQ/100g de matière sèche) et enfin l'extrait aqueux (333.04 mg GAE/100 g de matière sèche et 46.03 mg CEQ/100g de matière sèche).

L'activité antioxydante de l'olivier sauvage a été évaluée par deux techniques : le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer FRAP.

Pour la première technique, les résultats révèlent que l'extrait hydrométhanolique des feuilles de l'olivier sauvage présente l'activité la plus élevée avec une CI_{50} de 12 $\mu\text{g/ml}$ suivi de l'extrait hydroacétonique avec une CI_{50} de 16.96 $\mu\text{g/ml}$, et enfin l'extrait aqueux avec une CI_{50} de 19.5 $\mu\text{g/ml}$.

Aussi, l'activité antioxydante a été évaluée par la technique de réduction du fer FRAP, qui représente un indicateur significatif du pouvoir antioxydant des plantes. Les résultats montrent que la capacité réductrice de l'extrait hydrométhanolique est plus élevée que les extraits hydroacétoniques et aqueux à la concentration de 1 mg/ml.

Les résultats obtenus dans cette étude, montre la richesse d'*Olea europea* var *sylvestris* en substances chimiques et qui pourraient représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives en thérapeutique.

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

- ✓ L'isolement et l'identification de la ou les molécule (s) bioactive (s) responsables de l'activité antioxydantes par des techniques chromatographiques et spectrales ;

- ✓ Evaluer d'autres activités comme : antidiabétiques, antimicrobiennes, anticancéreuses ... et autres ;

- ✓ Des études *in vivo* seront souhaitables pour déterminer les tissus et organes cibles, et rechercher leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire.

Références bibliographiques

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

Afonso Valéry, Champy Romuald, Mitrovic Dragoslav, Collin Pascal, Lomri Abderrahim. Radicaux libres derives de l'oxygène et superoxydes dismutases: role dans les maladies rhumatismales, 2007; 637-638.

Anderson C.M., Hallberg A., Hogberg T. Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res.*28, 1996; 65-180.

Anderson, O.M., Markham, K.R. FLAVONOIDS: Chemistry, Biochemistry and Applications, Edited by Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press, 2006; 01-32-397-425.

Arab Karim, Bouchenak Ouahiba et Yahiaoui Karima. Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. *Afrique SCIENCE*. 2013 ; 09 (3) 159 – 166.

Aranda, S., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R.M., Landa, B.B. Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L.subsp *europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*. *Plant Soil* 343, 2011; 329–345.

Arockiaraj Jesu, Easwvaran Sarasvathi, Vanaraja Puganeshwaran, Singh Arun, Goudable Joëlle, Favier Alain. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol*, 1997; 115-20.

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

Atmani D, Chaher N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry* 112, 2009; 303–309.

Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem*. 2005 ; 89 : 27–36.

Baccouri B., Zarrouk W., Krichene D., Nouairi I., Ben Youssef N., Daoud D., Zarrouk M. Influence of fruit ripening and Crop yield on chemical properties of virgin olive oils from seven selected Oleasters (*Olea europaea* L.). *J. Agro.* 6 (3), 2007; 388-396. In Rotondi A., Magli M. Ripening of olives var. Correggiolo: Modification of oxydative stability of oils during fruit ripening and oil storage. *J. Food Agric. Env.* 2, 2004; 193-199.

- Barnham, K.J., Masters, C.L., Bush, A.I., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 205–214.
- Ben Salah Myriam, Abdelmelek Hafedh 1 and Abderraba Manef. Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia. *Medicinal chemistry*, 2012; 2-5.
- Benariba N, Djaziri R, Bellakhdar W, Belkacem N, Kadiata M, Malaisse WJ, Sener A, Abdelkrim C. Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pac J Trop Biomed* 3 (1), 2013; 35-40.
- Bendini A., L. Cerretani, S Vecchi, A. Carrasco-Pancorbo, G. Lercker. Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil Phenolics on Oxidative Stability in the Presence or Absence of Copper Ions. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4880-4887.
- Berger MM. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutr clin méta* 20 : 2006; 48 – 53.
- Bianco A., Uccella N. Biophenolic components of olives. *Food Research International*, 33, 2000; 475-485.
- Biaye Mamadou. Actions pharmacologiques des tanins, université cheikh anta diop de DAKAR, thèse Doc en Pharmacie, No 101,2002 ; 03.
- Bossokpi Igor Passi Lysette. Etude des activités biologiques de fagara zanthoxyloides Lam (Rutaceae), thèse de pharmacie 2002, Bamako page 133.
- Bouaziz M., Grayer R.J., Simmonds M.S., Damak M. et Sayadi S. Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 2005; 236-241.
- Boudribila M- M., Les anciens Amazighs avant les phéniciens : Mode de vie et organisation sociale, *AWAL n°29*, 2004; 17- 31.
- Bourgou Soumaya, Ksouri Riadh, Bellila Amor, Skandrani Ines, Falleh Hanen, Marzouk Brahim. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, 2008; 48-55.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Ijic, R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 2008 ; 111, 925–929.

Breton Catherine, Pinatel Christian, Médail Frédéric, Bonhomme François, Berville André. Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms, 2008; 524-200.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^e éd. France : Tech & Doc – Lavoisier ; 1999.

Bruneton J, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3^e édition), 1999 ; 1120.

Bruneton, J. Pharmacognosie et Phytochimie. Plantes médicinales, Tec et Doc, 1993 ; 278-279.

Cai LY, Shi FX, Gao X. Preliminary phytochemical analysis of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. J Med Plants Res. 2011 ; 5 (17) : 4059 – 4064.

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

Caponio F, Gomes T, Pasqualone A. Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. Eur Food Res Technol, vol 212, 2001; 329-333. In Lalas S, Athanasiadis V, Gortzi O, Bounitsi M, Giovanoudis I, Tsaknis J, Bogiatzis F. Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. Food Chemistry, vol 127, 2011; 1521-1525.

Cavina M. Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes au propriété antioxydante et anti radicalaire : « *Tinospora crispa* (Menispermaceae). *Merremia emerginata* (Convolvulaceae) et *Orpheaen neandra* (Annonanceae). Thèse de Doctorat. Université de l'Indonésie, 1999 ; 10-19.

Cholewa J., Poprzeczki S., Zajac A., Waskiewicz Z. Impact de la supplémentation en vitamine C sur les paramètres du stress oxydatif dans le sang des basketteurs d'élite lors d'un effort maximal, Science & Sports 23, 2008 ; 176–182.

Cook N.C., Samman S. Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. J Nutr Biochem, 7, 1997; 66-76.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbial. Rev 12 (4), 1999; 564-582.

Derbel S, Ghedira k. Les phytonutriments et leur impact sur la santé. Phytothérapie et nutrition numéro 1, 2005; 28-34.

Dobson, A.W., Erikson, K.M., and Aschner, M. Manganese Neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012, 2004; 115-129.

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

Ducros V., Favier A. *Métabolisme du sélénium*, EMC-Endocrinologie 1, 2004 ; 19–28.

Dugas, A.J.; Castaneda-Acosta,J.; Bonin,G.C.; Price,K.L.; Fischer, N.H.Winston, G.W. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod*, 63, 2000; 27-31.

Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H., 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*405, 903–904.

Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afric J Biotech*. 2005 ; 4 : 685 – 688.

Ekoumou C. Etude phytochimique et pharmacologique de cinq recettes traditionnelle utilisés dans le traitement des infections Urinaire et la Cystite. Thèse Pharmacie, Bamako, 2003 ; 145.

El-Haci IA, Atik-Bekkara F, Didi A, Gherib M, Didi MA. Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie* 10, 2012 ; 280-285.

Faten Brahmi, Beligh Mechri, Madiha Dhibi, Mohamed Hammami. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products* 49 (2013); 256–264.

Favier A. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* 2003; 108- 115.

Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 64: 2006; 390- 396.

Favier M., Hininger-Favier I. Zinc et grossesse. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 33, 2005 ; 253–258.

Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.

Fontecave Marc, Pierre Jean-Louis. Mechanisms of formation of free radicals in biological catalysis. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry* Volume 4, Issue 7, 2001 ; 531–538.

- Fraga Cesar G, Oteiza Patricia I. Dietary flavonoids: Role of (–)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine* 51, 2011; 813–823.
- Gammoudia, A. Dandanaa, H. Chaheda, S. Ferchichia, S. Ernezb, A. Mileda. Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* : 28, 2013; 39–42.
- Ghanbari Rahele, Farooq Anwar, Alkharfy Khalid M, Gilani Anwarul-Hassan and Saari Nazamid. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2012 ; 13, 3291-3340.
- Ghedira K. L'olivier. *Phytothérapie*. 6, 2008 ; 83-89.
- Goudable Joëlle, Favier Alain. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol* 1997; 11:115-20.
- Green P. S., A revision of *Olea*. (*Oleaceae*). *Kew Bull.* 57, 2002 ; 91-140.
- Guerin, J., Mekuria, G., Burr, M., Collins, G., Sedgley, M. Selection of olive cultivars. *Acta Hortic*: 622, 2003; 231–234.
- Guo, L., Xie, M. Y., Yan, A. P., Wan, Y. Q., & Wu, Y. M. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(6), 2006; 1881-1887.
- Haddad John J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors, *Cellular Signalling Volume 14, Issue 11, November 2002*; 879–897.
- Hannachi Hédia, Breton Catherine, Msallem Monji, Salem Ben El Hadj Salem Ben, El Gazzah Mohamed, Bervillé André. Differences between native and introduced olive cultivars as revealed by morphology of drupes, oil composition and SSR polymorphisms: A case study in Tunisia, *Scientia Horticulturae* 116, 2008; 280–290.
- Hartmann Thomas. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry Volume 68, Issues 22–24, 2007*; 2831–2846.
- Harvey Mueller. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health, *J. Sci. Food Agric*: 86, 2006; 2010–2037.

Hayes J.E., Allen P, Brunton N., O'Grady M.N., Kerry J.P. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry* 126, 2011; 948–955.

Hazout A., Menezo Y., Madelenat P., Yazbeck C., Selva J., Cohen-Bacrie P.. Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36, 2008; 1109–1117.

Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér*, 1, 2004; 3-6.

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

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

Jacques-Meunié D. Le Maroc saharien des origines à 1670, Klincksieck, Paris. 2vol, 1982; 990.

Karumi Y, Onyeyili PA, Ogugb uaja VO. Identification of active principales of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Scien.* 2004 ; 4 : 179 – 182.

Keil Claudia, Petermann Eva, Shiao Li Oei. Tannins elevate the level of poly(ADP–ribose) in HeLa cell extracts, *Archives of Biochemistry and Biophysics* Volume 425, Issue 1, 2004; 115–121.

Khan AM, Qureshi RA, Ullah F, Gilani SA, Nosheen A, Sahreen S, et al. Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *J Med Plants Res.* 2011 ; 5 (25) : 6017 – 6023.

Khanbaba K, Ree T.R.Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry:* 18, 2001; 641-649.

Koane J.N., Syssa-Magale J.L., Ouamba J.M. Études phytochimique et pharmacologique de quelques plantes médicinales Centrafricaines à propriétés antidiabétiques. *Diabète*, 2012 ; 127.

Lafka Theodora-Ioanna, Lazou Andriana E, Sinanoglou Vassilia J and Lazos Evangelos S. Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential as Edible Oils Antioxidants. *Food*, 2 , 2013 ; 18-31.

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

Leverve Xavier. Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* Volume 44, Issue 5, 2009 ; 219–224.

Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F., Di Giusto, F. Allozyme variation of oleaster populations wild olive tree *Olea europaea* L. in the Mediterranean Basin. *Heredity* 92, 2004; 343–351.

Macheix Jean-Jacques, Fleuriet Annie, Jay-Allemand Christian. Les Composés Phénoliques Des Végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Collection biologie*, 2005; 10-11.

Majob F, Kamalinejab M, Ghaderi N, Vahidipour HR. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian J Pharma Res.* 2003 ; 77 – 82.

Manach C, Scalbert A, Morand C & Jimenez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 2004; 727-747.

Maurice N. L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed. Lavoisier, Paris, 1997 ; 12- 14.

Moussaoui Younes, Bensalem Ridha. Catalyzed Knoevenagel reactions on inorganic solid supports: Application to the synthesis of coumarine compounds, *C. R. Chimie* 10, 2007; 1162 – 1169.

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

Naoya Kishikawa, Naotaka Kuroda, Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Volume 87, 18 January 2014; 261–270.

Neve, J., Vermongen, F., Carpentier, Y.A. Valeurs usuelles du sélénium et de la glutathion peroxydase dans une population belge, *Ann Biol Clin*, 47, 1989 ; 43-138.

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

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

Omulokoli E., Khan B. and Chhabra S.C. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. J. Ethnopharmacol; 56, 2000; 133-137.

Organisation mondiale de la santé (2003). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle.

Owen R- W., Haubner R., Wurtele G., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H. Olives and olive oil in cancer prevention. Eur J Cancer Prev 13, 2004; 319-326.

Peronny S. La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. Discipline Eco-Ethologie, 2005; 151.

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

Polzonetti V., Egidio D., Vita A., et al. Involvement of oleuropein in digestive metabolic pathways. Food Chemistry. 88, 2004 ; 1-15.

Priya Alphonso and Aparna Saraf, Chemical profile studies on the secondary metabolites of medicinally important plant *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb) DC using HPTLC, 2012 ; 1293.

Produit pour le CTA par WRENmedia Fressingfield, Eye, Suffolk, IP21 5SA, UK. CTA Centre technique de coopération agricole et rurale Postbus 380, 6700 A J Wageningen, Pays Bas, LES PLANTES MÉDICINALES, PROGRAMME DE RADIO RURALE 07/3.

Roberta Cazzola, Benvenuto Cestaro. Chapter 9: Antioxidant Spices and Herbs Used in Diabetes. Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants, 2014; 89–97.

Roué M. Contribution de la flore bactérienne associée au métabolisme secondaire de l'éponge calcaire *Clathrina clathrus*. Doctorat de l'université Pierre et Marie Curie, 2011.

Salas J- L., Sanchez J., Ramli U- S., Manaf A- M., Williams M., Harwood J- L. Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. Progr. Lipid Res. 39, 2000; 151-180.

Sanogo Rokia, Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie, Université de Bamak, 2006 ; 04.

Savarese TM, Strohsnitter WC, Low HP, Liu Q, Baik I, Okulicz W, Chelmow DP, Lagiou P, Quesenberry PJ, Noller KL, Hsieh CC. Correlation of umbilical cord blood hormones and growth factors with stem cell potential: implications for the prenatal origin of breast cancer hypothesis. *Breast Cancer Res* 9: R29, 2007.

Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, Riad., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., et Balansard, G. Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2001; 618-621.

Stoclet J.-C., Schini-Kerth V. Dietary flavonoids and human health. *Annales Pharmaceutiques Françaises* Volume 69, 2011; 78–90.

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

Trocello J.-M., Chappuis P., El Balkhi S., Poupon J., Leyendecker A., Chainea P., Woimant F. Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte, *Médecine Interne* 31, 2010; 750-756.

Valéry, Champy Romuald, Mitrovic Dragoslav, Collin Pascal, Lomri Abderrahim. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales, 2007 ; 637-638. Afonso

Verdier E. L'Huile d'olive, 2003.

Vermerris W, Nicholson R. Isolation and Identification of Phenolic Compounds, *Phenolic Compound Biochemistry*. Dordrecht : Springer ; 2006.

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

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

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

Williams G M. Interventive prophylaxis of liver cancer. *European Journal of Cancer Prevention*: 3, 1994; 89-99.

Xiang, Q., Gao, Y., & Xu, Y. H. Capillary electrophoresis-amperometric determination of antioxidant propyl gallate and butylated hydroxyanisole in foods. *Analytical Science*, 23(6), 2007; 713-717.

Yen GC et Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem*. 1995 ; 43 : 27 – 37. In : Zovko Cončić M, Kremer D, Karlović K, Kosalec I. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol*. 2010 ; 48 : 2176 – 2180.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999 ; 64 : 555 – 559. In : Ardestani A, Yazdanparast R. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycoxidation. *Food Chem Toxicol*. 2007 ; 45 : 2402 – 2411. In : Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycoxidation, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2402–2411.

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

Zovko Cončić M, Kremer D, Karlović K, Kosalec I. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. *Food Chem Toxicol*. 2010 ; 48 : 2176 – 2180.

Annexes

Annexe 1 : Résultats de l'activité antioxydante par la technique de réduction du fer FRAP

Tableau 4 : Densités optiques obtenues pour l'extrait aqueux de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP

Concentrations								
de l'extrait		0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
mg/ml								
Densités optiques		0,1216	0,2146	0,4332	0,7502	1,0338	1,1455	1,2119
		0,118	0,2942	0,4254	0,712	0,8772	1,0514	1,1613
		0,1592	0,2482	0,459	0,6813	0,9908	1,1532	1,3755
Moyenne		0,1329	0,2523	0,4392	0,7145	0,9673	1,1167	1,2496

Tableau 5 : Densités optiques obtenues pour l'extrait hydrométhanolique de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP

Concentrations								
de l'extrait		0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1
mg/ml								
Densités optiques		0,1369	0,2219	0,4358	0,6972	1,0349	1,2691	1,5573
		0,1186	0,1923	0,3462	0,6638	1,0509	1,2934	1,6836
		0,1062	0,1851	0,3359	0,6823	1,0277	1,5316	1,4862
Moyenne		0,1206	0,1998	0,3726	0,6811	1,0378	1,3647	1,5757

Tableau 6 : Densités optiques obtenues pour l'extrait hydroacétonique de l'olivier sauvage testé par la méthode FRAP

Concentrations								
de l'extrait	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	
mg/ml								
Densités optiques	0,112	0,1257	0,286	0,571	0,8745	1,1609	1,5391	
	0,0591	0,2249	0,2824	0,5639	0,9064	1,1257	1,309	
	0,0493	0,1237	0,3315	0,603	0,882	1,1596	1,318	
Moyenne	0,0735	0,1581	0,3000	0,5793	0,8876	1,1487	1,3887	

Tableau 7 : Densités optiques obtenues pour l'acide ascorbique testé par la méthode FRAP

Concentrations								
de l'extrait	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	
mg/ml								
Densités optiques	0,4699	0,8618	1,2705	1,3873	1,6722	2,1102	2,3526	
	0,4313	0,8157	0,901	1,7982	1,9372	2,0704	2,0687	
	0,4764	0,7997	1,036	1,6994	1,9294	2,0086	2,0058	
Moyenne	0,4592	0,82573	1,0692	1,6283	1,8463	2,0631	2,1424	

Annexe 2 : Résultats de l'activité antioxydante par la technique de piégeage du radical libre DPPH

Tableau 8 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux

Concentrations						
de l'extrait	1.25	5	10	15	20	25
µg/ml						
Densités optiques	0,7644	0,7048	0,5439	0,521	0,4345	0,3453
	0,7783	0,734	0,5706	0,5085	0,3665	0,3173
	0,7461	0,6377	0,5842	0,5072	0,3496	0,2377
Moyenne	0,7629	0,6921	0,5662	0,5122	0,3835	0,3001
Pourcentages d'inhibition %	4,78	13,61	29,33	36,07	52,13	62,54

Tableau 9 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydrométhanolique

Concentrations						
de l'extrait	1.25	5	10	15	20	25
µg/ml						
Densités optiques	0,4404	0,5754	0,416	0,3276	0,0925	0,1129
	0,6908	0,6871	0,3346	0,4019	0,0754	0,0484
	0,7191	0,6973	0,3753	0,294	0,0729	0,0387
Moyenne	0,6168	0,6533	0,3753	0,3412	0,0803	0,0667
Pourcentages d'inhibition %	16,52	11,58	49,21	53,82	89,13	90,97

Tableau 10 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydroacétonique

Concentrations						
de l'extrait	1.25	5	10	15	20	25
µg/ml						
Densités optiques	0,7449	0,6383	0,5211	0,4854	0,3056	0,1579
	0,696	0,6104	0,5624	0,4253	0,3119	0,1648
	0,7027	0,6008	0,5774	0,4118	0,3341	0,1363
Moyenne	0,7145	0,6165	0,5536	0,4408	0,3172	0,153
Pourcentages d'inhibition %	0,12	13,82	22,62	38,38	55,66	84,2