

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة فرحات عباس - سطيف

UNIVERSITE FERHAT Abbas –SETIF

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biochimie

Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

Spécialité: Biochimie

Option : Biochimie appliquée

Par

BISSET Seghira

THEME

**Activité antioxydante et inhibitrice vis-à-vis de l'élastase
d'extrait de polyphénols d'olive (*Olea europaea* L.)**

Soutenu le :

Devant la Commission d'Examen

Président	: M. Arrar Lekhemici,	Professeur, UFA, Sétif
Rapporteur	: M. Belattar Noureddine,	Professeur, UFA, Sétif
Examineur	: M. Benboubetra Mustapha,	Professeur, UFA, Sétif
	M. Khennouf Seddik,	Professeur, UFA, Sétif

Remerciements

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la volonté de DIEU qui m'a offert santé, force, courage et volonté jusqu'au dernier moment. Je te remercie DIEU pour ça et pour tout le reste.

Je tiens aussi à remercier:

Pr. BELATTAR Noureddine, non seulement pour avoir accepté de m'encadrer et ainsi me faire profiter de ses connaissances, mais aussi pour sa patience et pour la totale confiance qu'il m'a accordée.

Pr. L. Arrar d'avoir acceptée d'assurer la présidence du jury de ma thèse de magister.

Pr. M. Benboubetra, et Pr. S. Khannouf d'avoir bien voulu me faire l'honneur de juger mon travail.

Enfin, mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à l'accomplissement de ce très modeste travail

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail

*à mes **chers parents**, à ma famille*

ainsi qu'à tous mes amis.

SOMMAIRE

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
--------------	---

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les radicaux libres et le stress oxydatif	3
I.1. Nature et sources des radicaux libres dans l'organisme	3
I.2. Contrôle des ERO/ERN dans la cellule	6
I.2.1. Antioxydants enzymatiques	7
I.2.2. Antioxydants non enzymatiques	8
I.3. Stress oxydatif et dommages cellulaires	10
I.3.1. Peroxydation lipidique	10
I.3.2. Oxydation des protéines	10
I.3.3. Oxydation d'ADN	11
I.4. Implication des ERO/ERN dans diverses pathologies	11
I.5. L'évaluation du stress oxydatif chez un individu	12
II. L'élastase du neutrophile	13
II.1. Structure de l'élastase du neutrophile	13
II.2. Rôle biologique de l'élastase du neutrophile	14
II.3. Inhibition et régulation de l'activité de l'élastase du neutrophile	17
II.4. Stress oxydatif et élastase du neutrophile	17
II.5. Implications pathologiques de l'élastase du neutrophile	17
II.5.1. L'athérosclérose	18
II.5.2. Maladies respiratoires	21
II.5.3. Cancer	23
II.5.4. Rhumatoïde arthrite	23
III. Les polyphénols	25
III.1. Les flavonoïdes	27
III.1.1. Localisation et distribution	27
III.1.2. Structure chimique et classification	27
III.2. Source des polyphénols	29
III.3. Activité biologique des polyphénols	30
III.3.1. Activité antioxydante	30

III.3.2. Activité anti-élastase	30
III.3.3. Autres activités biologiques	
IV. l'olivier	30
IV.1. Aspect botanique et répartition géographique	32
IV.2. Principaux constituants de l'olive, et de l'huile d'olive	32
IV.2.1. Constituants majeurs	34
IV.2.2. Constituants mineurs	34
IV.2.1.1. Les composés phénoliques	35
IV.2.2.2. Terpènes et leurs dérivés	35
IV.2.2.3. Tocophérols	37
IV.3. Usage traditionnelle et propriétés pharmacologiques d'olive et de son l'huile	37
IV.3.1. Pouvoir antioxydant	38
IV.3.2. Prévention des maladies cardiovasculaires	38
IV.3.3. Prévention des cancers	38
IV.3.4. Prévention du vieillissement	39
IV.3.5. Effet sur le système immunitaire	39
IV.3.6. Ostéoporose	40
IV.3.7. Effet sur l'appareil digestif	40

PARTIE PRATIQUE

I. Matériel et Méthodes	
I.1. Matériel	41
I.1.1. Matériel végétal	41
I.1.2. Réactifs chimiques	41
I. 2. Méthodes	41
I.2.1. Préparation d'échantillons	41
I.2.2. Détermination des caractères pomologiques	41
I.2.3. Extraction d'huile	43
I.2.4. Extraction des polyphénols	43
I.2.5. Caractérisation des extraits	44
I.2.5.1. Caractérisation quantitative	44
I.2.5.1.1. Dosage des polyphénols	44
I.2.5.1.2. Dosage des flavonoïdes	44
I.2.5.2. Caractérisation qualitative par CCM	45
I.2.6. Activités biologiques des extraits	45
I.2.6.1. Activité antioxydante	46
I.2.6.1.1. Effet scavenger du radical DPPH	46
I.2.6.1.2. Test de blanchissement du β -carotène	46
I.2.6.1.3. Test du Potentiel Réducteur	47
I.2.6.2. Evaluation de l'effet inhibiteur vis-à-vis de l'élastase	48
I.2.7. Analyse statistique	49
II. Résultats et discussion	49

II.1. Caractérisation pomologique des variétés d'olive	
II.2. Caractérisation quantitative et qualitative des extraits	50
II.2.1. Caractérisation quantitative	52
II.2.1.1. Dosage des polyphénols et des flavonoides	52
II.2. 2. Caractérisation qualitative	52
II.3. Activités biologiques des extraits	56
II.3.1. Activité antioxydante	59
II.3.1.1. Effet scavenger du radical DPPH	59
II.3.1.2. Test de blanchissement du β -carotène	60
II.3.1.3. Test du potentiel réducteur	64
III.3.2. Evaluation de l'activité inhibitrice vis à vis de l'élastase	67
	70
Conclusion et perspectives	
Références bibliographiques	73
	76

Résumé :

Trois variétés d'*Olea europaea* L. cultivées en Algérie ont été investiguées pour leurs caractères pomologiques, leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes ainsi que pour le profil qualitatif de ces composés (CCM). L'effet antioxydant de l'extrait polyphénolique de ces variétés et de certains de leurs composés (tyrosol, et oleuropéine) a également été déterminé par trois tests complémentaires. Finalement l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'élastase a été également évaluée.

La caractérisation pomologique des trois variétés étudiées a montré une différence intervariétale. Alors que la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé la richesse et la différence des extraits aqueux de ces variétés en polyphénols. Concernant, la teneur en flavonoïdes déterminées par la méthode de trichlorure d'aluminium, les trois variétés contiennent une teneur significativement différente ($p < 0.05$), et elle est moins importante par rapport à celle des polyphénols totaux. D'autre part, le criblage préliminaire des extraits par CCM a illustré la présence de nombreux constituants, parmi lesquels l'oleuropéine, le tyrosol, la catéchine, et la vanilline.

Les résultats obtenus pour le pouvoir antioxydant évalué par les trois tests, le test de DPPH•, le test du blanchissement de β -carotène et le test du pouvoir réducteur, il ressort que les variétés étudiées, présentent une grande capacité antioxydante. Alors que, l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols d'olive, le tyrosol et l'oleuropéine, a montré que ce dernier possède une activité antioxydante importante soit par le test de DPPH ou par le test de potentiel réducteur, tandis que le tyrosol est faiblement actif, alors que les deux polyphénols n'ont pas manifesté un effet préventif significatif vis-à-vis de la peroxydation du β -carotène.

La détermination de l'effet inhibiteur vis-à-vis de l'élastase a montré de leur part une activité inhibitrice significative ($p < 0.05$) vis-à-vis cet enzyme pour les trois variétés, ainsi pour l'oleuropéine mais ils sont moins actifs que celle du standard, l' α_1 -antitrypsine, concernant le tyrosol, il a montré un effet inhibiteur très faible.

Mots Clés: *Olea europaea* L., polyphénols, flavonoïdes, CCM, activité antioxydante, activité anti-élastase.

Abstract:

Pomological characters as well as polyphenols and flavonoides contents and qualitative profile in these compounds (TLC) of three varieties of *Olea europaea* L. cultivated in Algeria were investigated. The antioxidant effect of the extract polyphenolic of these varieties and also some of their compounds (tyrosol, and oleuropeine) were determined by three complementary tests. At the last step we were evaluated the inhibiting activity against the elastase.

The pomological characterization of the three varieties showed an inter varietal difference. Whereas the method of Folin-Ciocalteu revealed the richness and the difference of the aqueous extracts of these varieties in polyphenols. Concerning, the content of flavonoides determined by the method of trichloride aluminum, the three varieties contains an amount significantly different ($p < 0.05$), and it is less significant compared to that of total polyphenols. In addition, the preliminary sifting of the extracts by TLC illustrated the presence of many components, among which the oleuropeine, tyrosol, catechin, and vanillin.

Results obtained for the antioxidant capacity evaluated by the three tests, the DPPH • assay, the β -carotene bleaching assay and reducing power assay demonstrated that the varieties studied, have a great antioxydant capacity. Whereas, the evaluation of the antioxydant activity of olive polyphenols, tyrosol and the oleuropeine, showed that this last has a significant antioxidant activity for the test of DPPH or the test of reducing power, while the tyrosol is slightly active, but the two polyphenols did not express a significant preventive effect against the peroxidation of β -carotene.

The determination of the inhibiting effect against the elastase showed a significant inhibiting activity ($p < 0.05$) for the three varieties, thus for the oleuropeine but they are less active than that of the standard, the α_1 - antitrypsin, concerning the tyrosol, it showed a very weak inhibiting effect.

Key words: *Ola europaea* L., polyphenols, Flavonoides, TLC, antioxidant activity, anti-elastase activity.

الملخص:

تمت دراسة ثلاثة أصناف من ثمار الزيتون الجزائري، من ناحية الخصائص الوصفية، محتواها من عديدات الفينول و من الفلفونويدات، كذلك تحليل هذه المحتويات بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، الفاعلية المضادة للأكسدة هي الأخرى تم تحديدها باستعمال ثلاث أنواع من الاختبارات وهي، اختبار الجذر (DPPH)، اختبار بيتا- كروتين/ حمض اللينولييك واختبار القدرة الارجاعية، كما تم في الأخير تحديد النشاطية المثبطة لإنزيم الـ *élastase*.

الدراسة الوصفية أظهرت وجود تباين فيما بين الأصناف الثلاثة، في حين أن اختبار Folin-Ciocalteu اظهر غنى واختلاف هذه الأصناف بعديدات الفينول، ، فيما يخص محتواها من الفلفونويدات المقدر باختبار ثلاثي كلورير الألمنيوم فان الأصناف الثلاثة تملك محتوى مختلف، و اقل اهمية مقارنة بمحتواها من عديدات الفينول، من جهته اظهر التحليل الأولي للمستخلصات بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وجود العديد من المركبات من بينها *oleuropéine*, *Catéchine* و *tyrosol*, *vanilline*.

النتائج المتحصل عليها فيما يخص القدرة المضادة للأكسدة و المقطرة بالاختبارات الثلاث، اختبار الجذر (DPPH)، اختبار بيتا- كروتين/ حمض اللينولييك واختبار القدرة الارجاعية، بينت أن الأصناف الثلاث تملك نشاطية مضادة للأكسدة عالية. من جهة أخرى، تقدير النشاطية المضادة للأكسدة لبوليفينولات الزيتون، *Tyrosol* و *oleuropéine*، اظهر أن هذا الأخير يملك نشاطية مضادة للأكسدة مهمة، سواء في اختبار الـ DPPH أو باختبار القدرة الارجاعية، في حين أن الـ *Tyrosol* منخفض النشاطية، بينما لم يبدي البوليفنولين تأثير واقى معنوي ضد أكسدة الـ بيتا- كروتين.

تقدير التأثير المثبط لإنزيم *élastase* أظهر من جهته وجود تأثير تثبيطي معنوي ($p < 0.05$) اتجاه هذا الإنزيم بالنسبة للأصناف الثلاثة، كذلك بالنسبة للـ *Oleuropéine* غير أنها اقل من نظيرتها الخاصة بالـ α_1 -antitrypsine ، أما بالنسبة للـ *Tyrosol* فقد أبدى قدرة تثبيطية جد منخفضة.

الكلمات المفتاح: *Ola europaea* L. ، عديدات الفينول، الفلفونويدات، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المثبطة لإنزيم الـ *élastase* .

Liste des abréviations

α_1-PI	α_1 -Protéase Inhibiteur
$\alpha 2$-M	$\alpha 2$ -macroglobuline
AA	activité anti-radicalaire
Abs	absorbance
AI	activité inhibitrice
ANOVA	analysis of variance
BHT	butylated hydroxytoluen
BPCO	Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive
CAT	catalase
CCM	chromatographie sur couches minces
CG	cathépsine G
DNPH	dinitrophénylhydrazone
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EC₅₀	concentration effective à 50%
EN	elastase du neutrophile
ERN	espèces réactives de nitrogène
ERO	espèces réactives de l'oxygène
FMNH₂	flavine mononucléotide réduite
FADH₂	flavine adénine dinucléotide réduite
FMLP	formylmethionyl- leucyl-phényalanine
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GPx	glutathion peroxydase
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
GR	glutathion réductase
CI₅₀	concentration inhibitrice à 50%

ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
LDL	low Density Lipoprotein
LDLox	low Density Lipoprotein oxydé
LSD	least Significant Difference
MMP	matrix Metalloproteinases
MEC	matrice extracellulaire
MeOH	méthanol
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NO	nitrite oxyde
NOS	nitrique oxyde synthase
PAF	platelet activating factor
NPN	neutrophile polynucléaires
EPP	élastase porcine pancréatique
PR	polyarthrite rhumatoïde
P3	protéinase 3
RLs	radicaux libres
RPE	résonance paramagnétique électronique
Rpm	rotation par minute
SD	standard deviation
SH	sulfhydryle
SOD	superoxyde dismutase
Serpins	serine protease inhibitors
TCA	acide trichloracétique
TGF	Transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TIMP	tissue Inhibitor of Metalloproteinases
UCP	uncoupling protein

Liste des figures

Figure 1: Formation en cascade des différentes ERO/ERN à partir du radical superoxyde	4
Figure 2: Les principales sources cellulaires d'ERO et d'ERN et les corrélations entre les défenses antioxydantes	9
Figure 3: (a) La pré-proprotéase et le Processus de maturation de l'EN humaine. (b) Structure tridimensionnelle de l'élastase humaine du Neutrophile	14
Figure 4: Formation de la plaque athéroscléreuse: vue générale et détail des étapes	20
Figure 5: L'emphysème	21
Figure 6: Classification générale des polyphénols	26
Figure 7: Les principales classes de flavonoides. Un (ou deux) exemple (s) précis a été donné chacun des cas	28
Figure 8: Aspect morphologique de la plante <i>Olea europaea</i> L. et leurs parties	33
Figure 9: Répartition géographique de l'oléiculture	34
Figure 10: structure des principaux polyphénol, et leurs dérivés présents dans l'olive	36
Figure 11: Représentation schématique des étapes de l'étude réalisée	42
Figure 12: Système d'extraction au Soxhlet	43
Figure 13: Droite d'étalonnage d'acide gallique	54
Figure 14: Droite d'étalonnage de rutine	54
Figure 15: Chromatographie sur couche mince de l'extrait polyphénolique de trois variétés d'olive sur gel de silice dans système de développement (CEA)	57
Figure 16: Chromatographie sur couche mince de l'extrait polyphénolique de trois variétés d'olive sur gel de silice dans système de développement (TEF)	57
Figure 17: Réduction du radical DPPH [•] par un antioxydant AO-H	60
Figure 18: Activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux des variétés Chemlali, Farhi et Beskri, du standard (BHT), du Tyrosol et de l'oleuropéine	62
Figure 19: La CI_{50} d'extraits aqueux des variétés Chemlali, Farhi, Beskri et de BHT, et d'oleuropéine	63
Figure 20: Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence d'extraits d'olive, d'Oleuropéine, du Tyrosol, et du BHT	65
Figure 21: Pourcentage d'inhibition de l'oxydation du β -carotène par l'extrait aqueux de la V. Chemlali, V. Farhi et V. Beskri, et par le BHT	66
Figure 22: pouvoir réducteur d'extraits de trois variétés d'olive (Chemlali, Farhi, et Beskri) de l'Oleuropéine, du Tyrosol, et du BHT	68
Figure 23: Activité inhibitrice vis-à-vis de l'élastase d'extrait polyphénolique de la V. Chemlali, V. Farhi et V. Beskri, des polpyhénols : Oleuropéine, Tyrosol, et de l'inhibiteur α_1 -antitrypsine	71

Liste des tableaux

Tableau 1: Les principales affections liées à la production des ERO	11
Tableau 2: Les différentes cibles de l'élastase du neutrophile	16
Tableau 3: Quelques sources naturelles des polyphénols	29
Tableau 4: Caractères pomologiques de l'olive des trois variétés étudiées	50
Tableau 5: Contenu en composés phénoliques et en flavonoïdes pour les trois extraits	55
Tableau 6: Rf des spots des extraits et des témoins dans le système: CHCl ₃ / AcOEt / AcOH (50/40/10)	58
Tableau 7: Rf des spots des extraits et des témoins dans le système: Tol / AcOEt / HCOOH (50/40/10)	58
Tableau 8: Potentiel réducteur des trois extraits, du Tyrosol, de l'oleuropéine, et de la BHT	69
Tableau 9: Effet inhibiteur vis-à-vis de l'élastase des trois extraits, du Tyrosol, de l'oleuropéine, et de l'α1- antitrypsine	72