

Introduction

Au cours de ces dernières années un intérêt considérable a été faite en ce qui concerne le stress oxydatif suite à son implication dans plus de deux cent situations pathologiques notamment dans la phase initiale du cancer, de la cataracte et de l'athérosclérose. En réalité, les molécules pro-oxydantes ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites normalement dans notre organisme, elles jouent des rôles physiologiques importants à des doses raisonnables (telle que la transduction du signal) mais à doses excessives (cas du stress oxydatif), les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme.

La plupart des pathologies où les ERO sont impliquées se caractérisent par l'intervention outre de ces derniers par un ensemble d'autres molécules qui peuvent être des enzymes protéolytiques telle que l'élastase du neutrophile dans le cas de l'athérosclérose. Cet enzyme, au cas physiologique participe à la première ligne de défense innée de l'organisme contre les agents pathogènes avec une puissante activité antimicrobienne. Dans des conditions normales, l'élastase du neutrophile est contrôlée majoritairement dans le plasma par l'inhibiteur macromoléculaire α_1 - antitrypsine ainsi que par d'autres inhibiteurs de sérine protéase. Dans certaines conditions pathologiques comme dans le cas du stress oxydatif, un déséquilibre est crée entre l'élastase et ses inhibiteurs en faveur du premier. Ce déséquilibre peut être dû à l'augmentation de l'expression de cet enzyme par les ERO, par l'inhibition de l' α_1 -antitrypsine, par les EOR ou également par d'autres facteurs. L'excès et la sur-activation de l'élastase du neutrophile va finalement mener à l'apparition et la complication de plusieurs maladies qui dans la plupart des cas sont les mêmes maladies où les ERO sont impliqués. l'athérosclérose.

L'implication des ERO et de l'élastase du neutrophile dans des pathologies dangereuses comme l'athérosclérose (classé par l'OMS comme la première cause de décès dans le monde), le cancer et d'autres pathologies plus ou moins dangereuses a conduit à la recherche de molécules bioactives qui peuvent exercer des effets antiradicalaire et inhibiteur de l'élastase sans aucun effets secondaires indésirables. Cette recherche est le principal but de plusieurs laboratoires dans le domaine bio pharmacologique dans le monde où les plantes médicinales restent le premier réservoir de ces substances bioactives.

L'une des plantes sur laquelle le Coran attire l'attention est l'olivier; *{Par le figuier et l'olivier! (2) Et par le Mont Sinin! (3)}* [95 : Le Fiquier (ATTYN)]. *{Allah est la Lumière des cieus et de la terre. Sa lumière est semblable à une niche où se trouve une lampe. La lampe est dans un (récipient de) cristal et celui-ci ressemble à un astre de grand éclat; son*

combustible vient d'un arbre béni: un olivier ni oriental ni occidental dont l'huile semble éclairer sans même que le feu la touche. Lumière sur lumière. Allah guide vers Sa lumière qui Il veut. Allah propose aux hommes des paraboles et Allah est Omniscient (35)} [24: La lumière (ANNŪR)].

L'expression *moubaarakatin zaytounatin* dans le verset ci-dessus décrit l'olivier comme étant "abondant, sacré, favorable, fournissant de bienfaits innombrables".

De nombreuses recherches scientifiques faites sur cet arbre (sur ses fruits, son huile et ses feuilles) ont prouvé les innombrables bienfaits de cette plante dans la prévention de plusieurs maladies telles que l'athérosclérose, le cancer, l'hypertension artérielle. Sachant que le facteur géographique possède un effet sur la composition qualitative et quantitative et donc sur l'effet bénéfique de cette même plante, le principal but de ce travail est l'étude et la valorisation de trois variétés d'olive d'origine algérienne.

Les travaux ayant fait l'objet de ce mémoire s'inscrivent dans ce contexte et visent les aspects suivants:

- ✓ La Caractérisation pomologiques des trois variétés d'olive choisies (ces caractères sont utilisés pour la caractérisation, l'identification et la classification de différents cultivars d'olive).
- ✓ La caractérisation quantitative et qualitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de la pulpe des trois variétés.
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante de ces extraits, *in vitro*, en utilisant différents tests (DPPH, acide linoléique/ β -carotène, et pouvoir réducteur).
- ✓ L'étude de l'effet inhibiteur de ces extraits vis-à-vis de l'élastase.

I. Les radicaux libres et le stress oxydatif

Les radicaux libres (RLs) sont des espèces chimiques qui contiennent un (ou plusieurs) électron(s) non parié(s) (Sen et al., 2010), du fait de la perte d'un (ou plusieurs) électron(s) de l'orbite externe (Halliwell et Gutteridge, 1999), ce qui les rend fortement instables et plus réactifs que l'atome ou la molécule dont il (elle) est issu(e) (Sen et al., 2010; Koechlin-Ramonatxo, 2006). Dans des circonstances quotidiennes normales, les RLs sont produits en permanence dans l'organisme en faible quantité car ils sont utiles pour celui-ci à dose raisonnable (Tuppo et Forman, 2001; Defeng et Cederbaum, 2003) tels que les médiateurs tissulaires (Rochette, 2008) ou les résidus des réactions cellulaires énergétiques ou de défense (Valko et al., 2006). Mais cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense (antioxydants) (Pincemail et al., 1999). Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit du fait d'un déficit en antioxydants ou suite à une production excessive de radicaux qui peut avoir de multiples origines (exogènes ou endogènes). Cette situation caractérisée par un excès de radicaux est appelé « **stress oxydatif** » (Favier, 2003) dont la conséquence est l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Huet et Duranteau, 2008).

I.1. Nature et sources des radicaux libres dans l'organisme

L'oxygène est un élément indispensable à la vie, il apporte à nos cellules l'énergie nécessaire pour leur fonctionnement (Sen et al., 2010; Floyd, 1990). Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété de RLs dérivés de cet élément ($O_2^{\cdot-}$, NO^{\cdot}) (Rochette, 2008) ainsi que d'autres dérivés de l' O_2 (H_2O_2 , $ONOO^-$) qui ne sont pas des RLs mais ils sont aussi extrêmement réactifs (Berger, 2006) et qui peuvent être des précurseurs des RLs (Sen et al., 2010). L'ensemble des RLs et leurs précurseurs appelés "espèces réactives de l'oxygène" (ERO) (Bonfont-Rousselot, 2007) ou "espèces réactives de nitrogène" (ERN) lorsque les espèces contiennent de l'azote dans leur structure (Beaudeux et al., 2006). La réactivité des formes radicalaires est généralement plus élevée que les formes non radicalaires parce que les RLs sont moins stables (Sen et al., 2010).

Les réactions et la cascade de formation des principaux ERO/ERN dans l'organisme sont illustrées sur la figure 1 et citées aux points suivants :

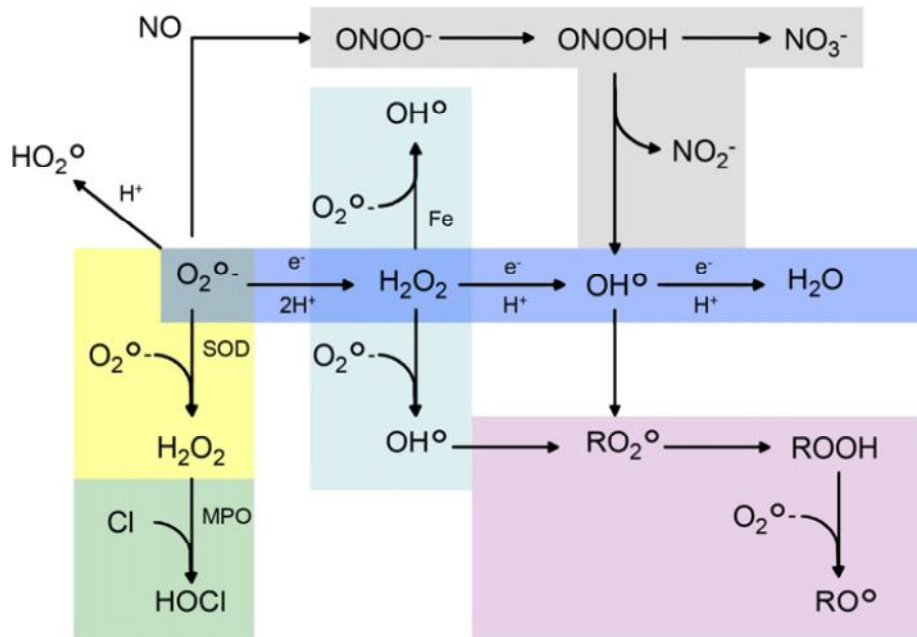


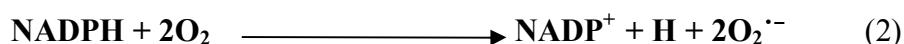
Figure 1: Formation en cascade des différentes ERO/ERN à partir du radical superoxyde (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

- La principale source de production des ERO dans la cellule et dans le corps est la mitochondrie (chaîne respiratoire) (Valko et al., 2006) qui utilise approximativement 80-90% d' O_2 qu'une personne consomme. Environ 2% de cet oxygène subit une réduction mono-électronique (réaction (1)) (Bonfont-Rousselot, 2007) conduisant à la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) au niveau de semiquinone (Barja, 2004), l' $O_2^{\bullet-}$ est le chef de file des espèces réactives de l'oxygène (Koechlin-Ramonatxo, 2006)



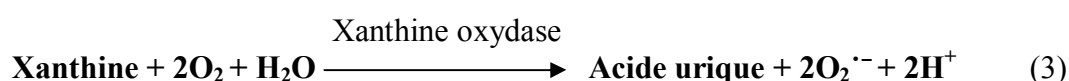
- Au niveau des cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) actives et au cours de la flambée respiratoire, une grande quantité d' $O_2^{\bullet-}$ est produite par l'enzyme NADPH oxydase (réaction (2)) (Deby-Dupont et al., 2002; Droge, 2002) pour la lutte anti-infectieuse (Favier, 2003) et anticancéreuse (Berger, 1997). L'altération de ce système à ce niveau là conduit à l'apparition d'une maladie appelée "granulomatose chronique", les patients dans cette condition sont extrêmement sensibles aux infections et meurent habituellement à un âge jeune (Defeng et Cederbaum., 2003).

NADPH oxydase



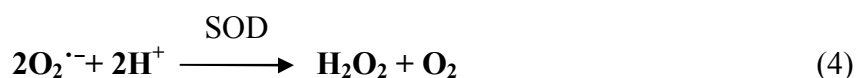
De même, la NADH déshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne (Huet et Duranteau, 2008) et la NADPH oxydase de cellule vasculaire endothéliale (Beaudeau et al., 2006; Monique et al., 2003) peuvent conduire à la formation d'O₂^{·-}.

- La xanthine-déshydrogénase est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion, cette enzyme va se modifier en forme productrice des ERO qu'est la xanthine-oxydase (Kanter, 1998). Ce dernier intervient à la production d'O₂^{·-} au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante (Droge, 2002) :



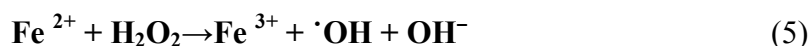
Par ailleurs, l'apparition d'O₂^{·-} peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par oxygène) de certains composés (Tuppo et Forman., 2001; Berger., 2006) tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine) (Droge, 2002), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits (FMNH₂, FADH₂) (Favier, 2003) mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 (Figure 2) (Pincemail, 1999), principalement au niveau du foie et du réticulum endoplasmique (Barouki, 2006).

- L'anion O₂^{·-} formé qui présente une certaine toxicité est éliminé ou diminué par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) pour donner autre espèce oxygénée, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Huet et Duranteau, 2008), selon la réaction suivante (4) (Valko et al., 2006) :



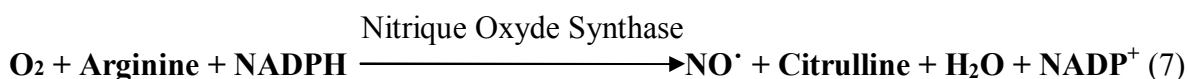
L'H₂O₂ peut aussi se former par réduction biélectronique de l'oxygène en présence d'oxydases (aminoacides oxydase, glycolate oxydase... etc.) (Figure 2) (Bonnefont-Rousselot, 2007) qui se trouvent principalement dans les organites cellulaires comme les peroxysomes. Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines, avec production simultanée de H₂O₂ (Monique, 2003).

- L'H₂O₂, pas lui même radical (Valko et al., 2006), la majeure partie de la toxicité de H₂O₂ provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ (l'espèce oxygénée la plus réactive) (Sen et al., 2010) en présence de cations métalliques (métaux dits de transition) tels que Fe²⁺ (réaction de Fenton (5)) (Markesbery, 1999) ou Cu⁺ (Defeng et Cederbaum, 2003) ou en présence d'O₂^{•-} (réaction d'Haber et Weiss (6)), l' $\cdot\text{OH}$ réagit avec presque toutes les biomolécules (Floyd, 1990).



Chez les neutrophiles actifs, le myéloperoxydase transforme l'H₂O₂ en présence de Cl⁻ en un composé oxydant qu'est l'acide hypochloreux (HOCl), qui détruit le microbe pathogène (Defeng et Cederbaum, 2003)

- Le radical monoxyde d'azote (NO \cdot) est produit essentiellement par le Nitrique Oxyde Synthase (NOS) (Huet et Duranteau, 2008) qui convertit la L-arginine en NO \cdot et L-citrulline (Ghafourifar et Cadenas, 2005) à des fins de médiateurs par les neurones, les cellules endothéliales ou par les macrophages (Réaction (7)) (Favier, 2003).



NOSe (NOS endothéliale) est à l'origine d'un transport d'électrons sur l'oxygène et pas sur la L-arginine. Il en résulte la formation d'O₂^{•-} délétère à la place de NO \cdot protecteur (Hyaden, Tyagi, 2003). Rappelons que la production concomitante dans un même lieu de NO \cdot et O₂^{•-} s'avère très dommageable en donnant rapidement naissance à une espèce radicalaire hautement réactive qu'est le peroxy-nitrite (ONOO⁻) (Henrotin et al., 2005) qui peut donner à son tour le radical $\cdot\text{OH}$ (Kanter, 1998).

I.2. Contrôle des ERO/ERN dans la cellule

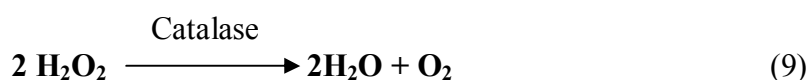
L'équilibre entre la production des ERO/ERN et leur neutralisation à des doses raisonnables est assurée par plusieurs mécanismes qui utilisent des molécules dites "**antioxydantes**" (Defeng et Cederbaum, 2003). Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente en faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Afonso et al., 2007). Cette

définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances comprenant des antioxydants enzymatiques aux propriétés catalytiques spécifiques mais aussi des antioxydants non enzymatiques hydro ou liposolubles, localisés dans des compartiments intra et extracellulaires (Berger, 2006; Berger, 1997).

I.2.1. Anti oxydants enzymatiques:

Les antioxydants enzymatiques comprennent principalement la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (Cat), et le glutathion peroxydase (GPx).

- La SOD est l'enzyme de la première ligne de défense contre les ER [Sen et al., 2010]. Plusieurs isomères de SOD ont été identifiées dans le milieu intracellulaires Cu ou Zn SOD ou SOD cytosolique (SOD₁), Mn SOD mitochondriale (SOD₂), comme dans le milieu extracellulaire EC-SOD(ou SOD₃) (Valko et al., 2006). Cette enzyme catalyse la dismutation et l'élimination rapide de l'anion O₂^{•-} à une molécule de H₂O₂ et de O₂ (Réaction (8)) (Afonso et al., 2007).
- La catalase située dans le peroxysome (organelle cellulaire) (Defeng et Cederbaum, 2003) favorise très efficacement la conversion du H₂O₂ en H₂O et O₂ (réaction (9)) (Valko et al., 2006).



- Les glutathions peroxydase sont des sélénoenzymes que l'on considère comme étant les plus importantes défenses intra et extracellulaires contre l'oxydation (Berger, 2006), ils transforment l'H₂O₂ en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion (GSH) (Réaction (10)). Le glutathion oxydé (GSSG) est non toxique et peut en outre être réduit par le NADPH grâce à l'enzyme glutathion réductase (GR) (Sen et al., 2010).



La GPx agit également sur les hydroperoxydes (ROOH) qui proviennent de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (acide linoléique, linolénique, arachidonique) (réaction (11)) (Afonso et al., 2007).



Il existe également de nombreuses autres enzymes antioxydantes telles que les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, les glutathions transférase, les thioredoxines réductase ou les thioredoxines peroxydase (Favier, 2003).

I.2.2. Antioxydants non enzymatiques

Les cellules utilisent de nombreuses molécules antioxydantes non enzymatiques de sources exogène ou endogène, de différentes structures et natures (Sen et al., 2010). Certains composés antioxydants sont apportés par les aliments comme la vitamine E (α -tocophérol), vitamine C (ascorbate), Q (ubiquinone), les caroténoïdes (Valko et al., 2006) et les oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse) (Sies et al., 1992).

Les vitamines agissent en piégeant les radicaux en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (Favier, 2003). La vitamine piègeuse va devenir un radical moins réactif que les radicaux (Bahorun et al., 2006) puis sera soit détruite soit régénérée par un autre système. Dans le cas de la vitamine E, qui a surtout un effet protecteur vis à vis de la peroxydation lipidique (Pryor, 2000) néanmoins au niveau de la membrane cellulaire (Bjorneboe et al., 1990) elle est régénérée par la vitamine C (Figure 2) qui elle même est régénérée par des enzymes, les ascorbates réductase (Favier, 2003; Kojo, 2004).

Les oligo-éléments agissent indirectement comme antioxydants parce qu'ils sont indispensables à la fonction des enzymes antioxydants (Pincemail et al., 1990).

De très nombreux composés alimentaires peuvent ainsi avoir un effet antioxydant tels que les polyphénols (Ishikawa et al., 2001), les alcaloïdes, les phytates (Favier, 2003) Xallophylys, l'huile essentielle et volatile (Sen et al., 2010).

Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules qui jouent le même rôle, dont le plus important est le glutathion réduit. Il y a également les thioredoxines, l'acide lipoïque (Valko et al., 2006), les glutaredexines, les métallothionéines ou les polyamines (Favier, 2003). L'albumine (Rochette, 2008), les protéines non enzymatiques (transferrine, ferritine, céruloplasmine.....etc) qui chélate les métaux de transition et inhibent ainsi leur effet prooxydant (réaction de Fonton) (Bonfont-Rousselota et Collin, 2010). D'autres protéines appartenant à la famille des UCP (uncoupling protein) découvertes dans certains types de mitochondries pourraient jouer un rôle dans la régulation de la production mitochondriale de radicaux libres (Pincemail et al., 1999).

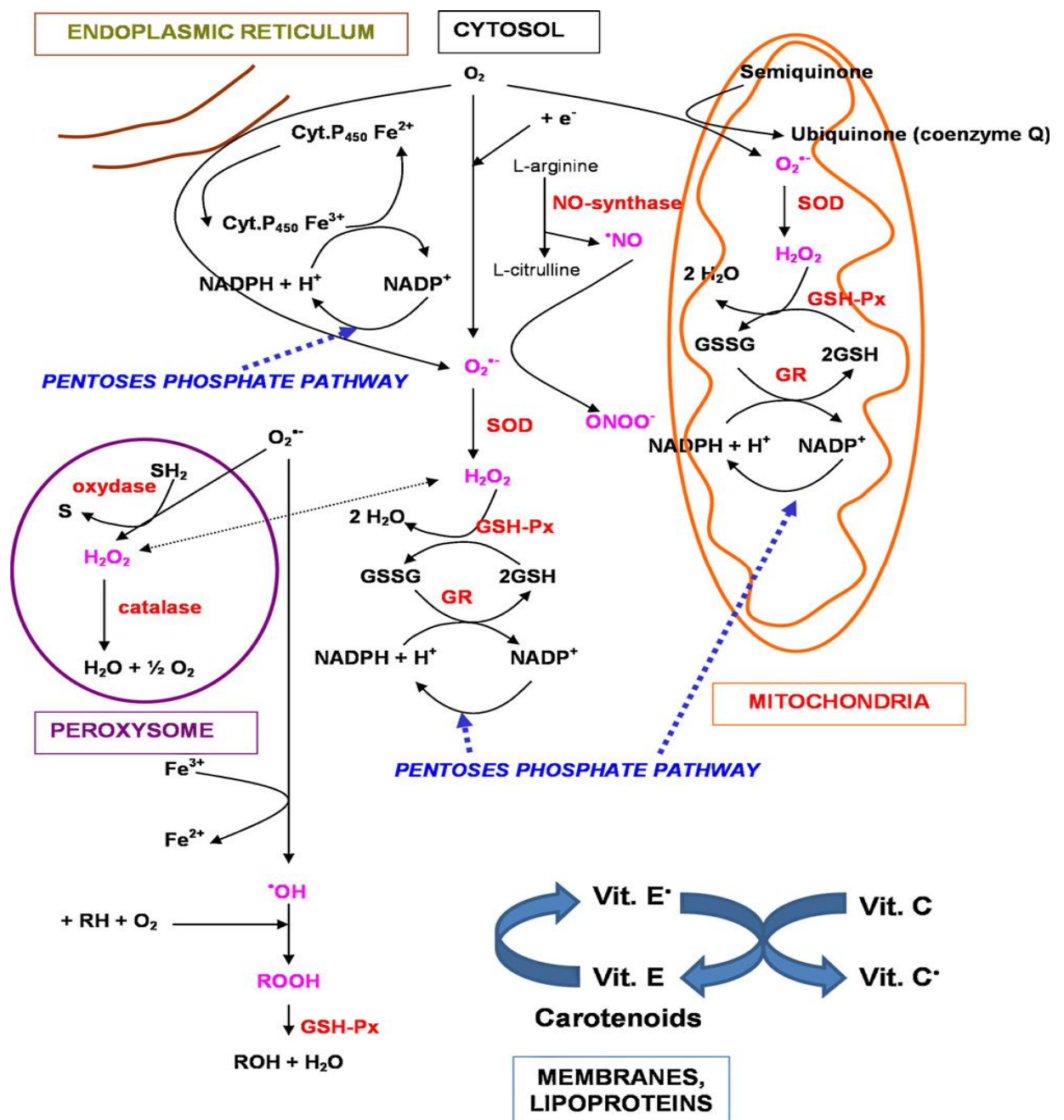


Figure 2: Les principales sources cellulaires d'ERO et d'ERN et les corrélations entre les défenses antioxydantes. (Kojo, 2004).

I.3. Stress oxydatif et dommages cellulaires

On dit qu'un stress oxydatif a lieu quand on passe de la production neutre (physiologique) des ERO/ERN à une production massive de celles-ci, soit par surproduction de ces espèces (Droge, 2002) qui est favorisée par différents stimuli tels que les rayonnements UV, (X et gamma), les radiations micro-ondes (Sen, 2010). Le tabagisme (Beaudeau et al., 2006), une pratique trop intense ou mal gérée d'un sport, l'alcool (Defeng et al., 2003), l'amiante, l'ozonothérapie, certains médicaments, les agents infectieux (Tuppo et Forman, 2001), une chirurgie cardio-vasculaire, une transplantation d'organes (Berger, 2006) ou d'une détresse respiratoire ou à cause d'une diminution du système de défense (enzymatique ou non enzymatique) (Droge, 2002) peuvent être aussi à l'origine de ce stress. La réactivité et l'instabilité des ERO/ERN agissent de manière à arracher un ou plusieurs électrons à d'autres molécules pour être plus stables (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Dans l'organisme, ces espèces peuvent réagir avec la plupart des macromolécules, y compris principalement, les lipides, les protéines et l'ADN.

I.3.1. Peroxydation lipidique

Les lipides et principalement les acides gras polyinsaturés (Siems, 1995) comme l'acide arachidonique et l'acide linoléique, du fait de leurs doubles liaisons (Floyd, 1990) sont la cible privilégiée de l'attaque par les ERO, plus particulièrement par le radical $\cdot\text{OH}$, qui, dans un premier temps se transforment en peroxydes lipidiques ($\text{ROO}\cdot$) (Favier, 2003). Ces peroxydes, sous l'action des métaux de transition (Fe, Cu), seront décomposés ensuite en toute une série de sous-produits toxiques que sont les aldéhydes et les hydrocarbures (Pincemail, 1999) tels que le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonanal qui peuvent réagir et endommager les protéines, l'ADN (Valko et al., 2006) et causer la mutagénèse (Floyd, 1990). Le danger de cette peroxydation est principalement associé à l'oxydation des LDL qui aboutissent à la formation de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (Pincemail, 1999). L'oxydation des phospholipides membranaires va entraîner une modification de leur fluidité et donc le dysfonctionnement de nombreux récepteurs, de transporteurs et de transmission des signaux (Deby-Dupont et al., 2002).

I.3.2. Oxydation des protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryl (SH) (Favier, 2003). Les modifications de structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ERO/ERN sont à la base de la formation

de dérivés protéiques carbonylés *via* plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (Pincemail et al., 1999). Les acides aminés les plus sensibles à l'oxydation sont la cystéine, la méthionine et l'histidine (Bonnetfont-Rousselota et Collin, 2010). Les protéines modifiées perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, inhibiteurs d'enzyme, récepteurs....) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Defeng et Cederbaum, 2003) et notamment du protéosome (Favier, 2003).

I.3.3. Oxydation d'ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les ERO/ERN. Les bases qui composent cette molécule, particulièrement la guanine, sont les cibles de l'oxydation par $\cdot\text{OH}$, mais l'oxydation peut aussi attaquer la liaison entre la base et le sucre, ou attaquer le sucre lui-même (Favier, 2003) et ainsi conduire à la cassure des brins d'ADN (Floyd, 1990) alors que l'attaque des bases va modifier celles-ci, donnant ainsi des bases modifiées telles que le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 5-hydroxyméthyluracil et le glycol de thymine. Ces modifications peuvent conduire à une mutagénèse et carcinogénèse (Valko et al., 2006).

I.4. Implication des ERO/ERN dans diverses pathologies

La présence d'un stress oxydant et d'une oxydation des macromolécules se traduit par le développement d'un très grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (stress oxydant prolongé), dont les plus importantes sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1. Les principales affections liées à la production des ERO

Pathologies	Références
Maladies cardiovasculaires : Athérosclérose, hypertension	(Droge, 2002).
Cancer	(Huet, et Duranteau 2008).
Maladies neurodégénératives : Alzheimer, Parkinson	(Droge, 2002).
Maladies inflammatoires	(Kouakou-Siransy, 2010).
Vieillesse	(Ter-Minassian, 2006).
Maladies respiratoires : asthme et BPCO	(Sen et al., 2010).
Diabète	(Huet et Duranteau. 2008).
Maladies auto-immunes : arthrite rhumatoïde	(Sen et al., 2010).
Pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire)	(Berger, 1997)
Affections hépatiques, pancréatites, rénales et gastriques	(Defeng et al., 2003)

I.5. L'évaluation du stress oxydatif

La survie d'un radical libre *in vivo* est extrêmement brève, de l'ordre de la fraction de milliseconde (Floyd, 1990). L'évaluation du stress oxydant se fait le plus souvent par des mesures indirectes portant soit sur les antioxydants endogènes (GSH, thiols, acide urique, SOD, CAT) et exogènes (vitamines) par la détermination de la capacité antioxydante totale du plasma, la détection du fer libre, la mesure de l'activation des neutrophiles ou alors soit par la détection des dégâts que les radicaux libres causent aux molécules et tissus sur leur passage :

- **Lipides** : lipoperoxydes, malondialdéhyde par la réaction d'acide thiobarbiturique (Gladine et al., 2007), le 4-hydroxynonénal par HPLC, isoprostane dans les urines par SM, détection par la techniques ELISA des anticorps dirigés contre des LDL oxydées dans le sang (Bonnefont-Rousselot, 2007; Pincemail et al., 1999).

- **Protéines** : En présence de dinitrophénylhydrazone (DNPH), les dérivés carbonylés peuvent être mis en évidence dans des échantillons biologiques par spectrophotométrie ou par la technique HPLC, ou *via* des anticorps contre ces mêmes groupes carbonyles (Bonnefont-Rousselot, 2007)

- **ADN** : test comète qui permet de quantifier par électrophorèse sur gel la quantité d'ADN endommagée, estimation principalement de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (Barja, 2004).

Cependant, des mesures directes du stress oxydatif ont été développées par la méthode du «spin trapping» spin trap qui se définit comme un composé capable de fixer un composé radicalaire, le produit d'addition a une demi vie supérieure au radical libre qui a été piégé. L'identification et la quantification de l'association : spin trap-espèce radicalaire sont réalisées par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) (Rochette., 2008).

Cette évaluation permet de prendre en charge les personnes qui souffrent de stress oxydatif en augmentant la consommation d'antioxydants. Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence que de faibles taux sanguins en antioxydants ou oligoéléments (vitamines C et E, sélénium) sont étroitement associés avec une incidence plus élevée de maladies cardiovasculaires et de cancers. (Pincemail et al., 1999).

Finalement, une alimentation saine et équilibrée (consommation de légumes, fruits, poissons et huile d'olive) doit théoriquement être suffisante pour apporter à notre organisme les antioxydants et oligoéléments nécessaires pour limiter au maximum l'effet nocif des ERO.

II. L'élastase du neutrophile

L'élastase du neutrophile (EN) (EC 3.4.21.37) est une sérine protéinase de la superfamille des chymotrypsines comme la protéinase 3 (PR3) et la cathepsine G (CG) (Korkmaz et al., 2008). C'est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 25 KDa (Navia et al., 1989), qui est présentée sous forme active à des concentrations élevées (5mM) au niveau des granules azurophiles des neutrophiles polynucléaires (NPN) avec la CG, PR3 (Gougerot-Pocidallo et al., 2005). Cet enzyme digère à pH neutre ou légèrement alcalin non seulement l'élastine qui confère l'élasticité aux tissus et organes (Barroso et al., 2006) comme les poumons, les artères, et la peau (Alasbahi et Melzig, 2008) mais aussi de nombreux autres substrats protéiques (Xu et al., 2010), principalement par clivage de liaisons –Val-X, Ala-X-, -Leu-X-, et –Met-X- (Russo-Marie et al., 1998). Elle est libérée après stimulation de neutrophiles (Sartor et al., 2002a) et a comme principaux effets la défense de l'hôte et le remodelage de la matrice extracellulaire (Ribeiro et al., 2010). En plus de son rôle destructeur et bactéricide, elle participe à d'autres rôles importants, comme par exemple la régulation de l'inflammation (Korkmaz et al., 2008). Dans des conditions physiologiques normales, l'élastase du neutrophile est contrôlée majoritairement dans le plasma par les inhibiteurs des sérines protéase. En pathologie, l'élastase est impliquée dans plusieurs maladies (Russo-Marie et al., 1998).

II.1. Structure de l'élastase du neutrophile

L'EN humaine est codée par le gène ELA2, qui situé sur le bras court du chromosome 19 (Sun et Yang, 2004; Chua et Laurent, 2006), il est synthétisé préalablement sous forme d'un pré-proprotéine (Zymogène) de 267 résidus d'acides aminés qui subit deux clivages aux deux extrémités au cours de la différenciation du neutrophile (Figure 3a) (Chua et Laurent, 2006) pour être stocké sous forme active au niveau des granules azurophiles des NPN matures (Wong et al., 1999). L'EN mature se compose d'une chaîne polypeptidique unique de 218 résidus d'acides aminés (Dahlen et al., 1999) stabilisée par quatre ponts disulfures et contient deux sites de N-glycosylation au niveau de Asn 109 et Asn 159 (Kawabata et al., 2002) dont la nature variable permet la différenciation des trois isoformes de l'EN humaine (E1, E2, E3) (Watorek et al., 1993).

La structure tridimensionnelle constitue deux tonneaux beta composés chacun de 6 feuillets beta et d'une hélice alpha en carboxy-terminal (figure 3 (b)) (Wei et al., 1988). L'activité de l'EN est dépendante de la triade catalytique qui se compose d'Asp 102, d'His 57 et de Ser 195.

Ces résidus sont séparés en structure primaire mais sont réunis et se situent entre deux domaines de brins- β en structure tertiaire d'enzyme (figure 3b) (Korkmaz et al., 2008). L'EN est extrêmement cationique avec un point isoélectrique très basique ($pI > 10$) (Navia et al., 1989), elle ne contient pas de résidus de Lys et de Tyr dans sa structure (Korkmaz et al., 2008). Une mutation dans le gène ELA2 a été liée à la neutropénie cyclique et à la neutropénie congénitale (Sun et Yang, 2004).

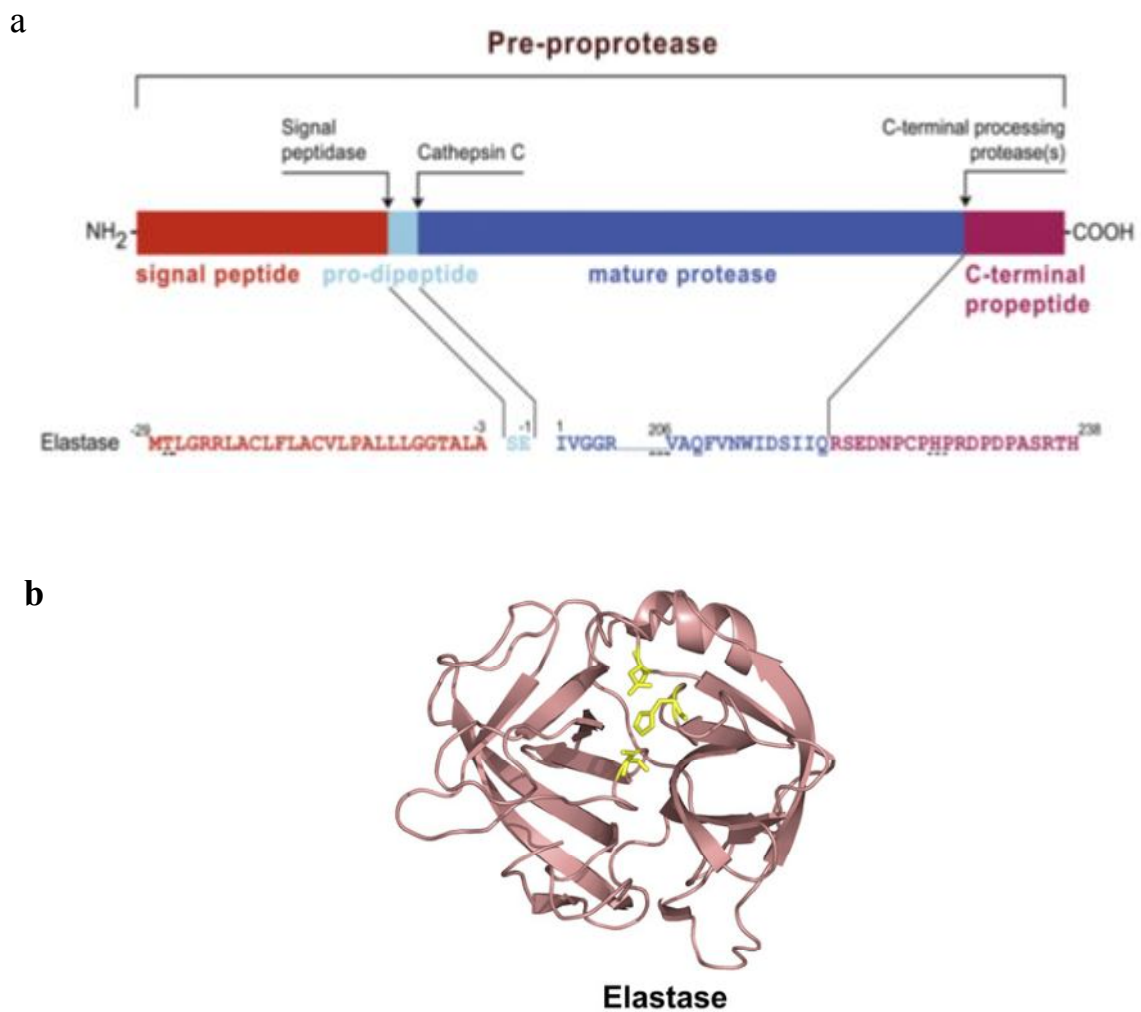


Figure 3: (a) La pré-proprotéase et le Processus de maturation de l'EN humaine. (b) Structure tridimensionnelle de l'élastase humaine du Neutrophile, les résidus de la triade catalytique apparaissent en jaune (Korkmaz et al., 2008).

II.2. Rôle biologique de l'élastase du neutrophile

Le neutrophile polynucléaire (NPN) participe en étant la première ligne de défense innée de l'organisme contre les agents pathogènes (Harris et al., 2000). Sous l'influence des

phagocytoses (Lungarella et al., 2008) ou des différents stimuli (cytokine, endotoxine, PAF, et FMLP) (Ribeiro et al., 2010; Schorr et al., 2005), le NPN libère l'une de ses principales armes "l'élastase" avec une puissante activité antimicrobienne (Chua et Laurent, 2006) contre les bactéries à gram négatif (Belaouaj et al., 1998), spirochètes (Garcia et al., 1998) et mycètes (Kawabata et al., 2002), par la protéolyse des protéines membranaires spécifiques comme Omp A d'E. Coli, ou par la destruction de facteurs de virulence des bactéries telles que Shigella, Salmonella et Yersinia (L'Allemain, 2002). Dans le milieu intracellulaire, elle est libérée au niveau des phagolysosomes et impliquée dans la dégradation des pathogènes ingérés (Korkmaz et al., 2008; Navia et al., 1989). Au niveau extracellulaire, elle est également libérée au site inflammatoire où les NPNs sont recrutés (Pham, 2006) et participent au remodelage des tissus car elle est capable de dégrader la matrice extracellulaire (MEC) (Henriksen et Sallenave, 2008) et un nombre important de molécules d'adhésion, facilitant ainsi la migration des cellules impliquées dans la réponse inflammatoire (Kawabata et al., 2002).

L'EN est capable de dégrader principalement l'élastine (Ribeiro et al., 2010; Henriksen et Sallenave, 2008) et peut également dégrader la plupart des autres composés de la MEC, y compris le collagène de type I-IV, le protéoglycane, les cadhérines et autres composants de la membrane basale tels que la fibronectine, l'héparine et la laminine (Ribeiro et al., 2010; Lungarella et al., 2008; Schorr et al., 2005). L'EN peut également indirectement dégrader les constituants de la MEC *via* l'activation des métalloprotéases (Sternlicht et Werb, 1999). Elle peut également cibler les protéines du surfactant pulmonaire (Liau et al., 1996).

Ces dernières années il est devenu de plus en plus clair que l'EN a une large spécificité de substrats comprenant une variété de protéines plasmatiques (Chua et Laurent, 2006; Allen et Tracy, 1995), d'immunoglobulines et plusieurs protéases et inhibiteurs de protéases (Kawabata et al., 2002) (Tableau 2).

Outre ses propriétés de dégradation et bactéricides, l'EN est susceptible de libérer et/ou de provoquer la synthèse de cytokines (Bedard et al., 1993), glycosaminoglycanes (Sommerhoff et al., 1990) et mucines (Voynow et al., 1999). De récentes études ont montré que l'EN possède des propriétés de régulation de la réponse inflammatoire locale (Wiedow et Meyer-Hoffert, 2005). Elle peut moduler les fonctions biologiques telles que la signalisation

cellulaire en agissant sur l'expression des cytokines, des chimiokines et en activant spécifiquement certains récepteurs cellulaires (Tosi et al., 1990).

Tableau 2: Les différentes cibles de l'élastase du neutrophile

Classe	Protéines/ cellules cibles	Fonction générale	Références
Protéines de la MEC	Elastine, collagène (types I–IV), protéoglycane, Surfactant pulmonaire, cadorherins Fibronectine	Perte de fonction Chemotaxis de neutrophile	Korkmaz et al., 2008, Kawabata et al., 2002 Kamikura et al., 2005
Protéines plasmatiques	Facteurs de coagulation (V, VIII, XI, XIII) Facteurs de complément (C1s, C2–5, C9) C1-inhibiteur Fibrinogen, a2-plasmine	Perte de fonction L'activation de cascade de complément Chimiotaxie de neutrophile	Allen et Tracy, 1995 Taylor et al., 1977 Dahlen et al., 1999
Immunoglobulines	IgG, IgM	Activation de neutrophile et macrophage	Dahlen et al., 1999
Protéases	Kininogen, collagénase, Gélatinase, MMP	Activation des enzymes	Kawabata et al., 2002 Henriksen et Sallenave, 2008
Inhibiteurs de protéase	TIMP	Perte de fonction	Gougerot-Pocidalo et al., 2005
Cytokines chimiokines	ILb-1, -2 et -6, TNF α	Modulation de fonction	Lungarella et al., 2008
Autres	Récepteur plaquettaire IIb/IIIa. Lymphocyte, plaquette Cellules épithéliales Récepteurs spécifiques de surface cellulaire Cadherine, ICAM-1	Perte de fonction. Activation, agrégations Plaquettaire. Sécrétion d'IL-6, IL-8, GM-CSFe, TGFhf et de mucine. Activation ou inactivation et modulation de réponse. Modulation d'adhésion	Sun et Yang, 2004 Kawabata et al., 2002 Schorr et al., 2005 Kawabata et al., 2002

II.3. Inhibition et régulation de l'activité de l'élastase du neutrophile

Dans des conditions physiologiques normales, l'EN est contrôlée majoritairement dans le plasma par l'inhibiteur macromoléculaire α_1 -inhibiteur de protéase (α_1 -PI) (anciennement appelé α_1 -antitrypsine) (Kamikura et al., 2005) qui est principalement synthétisé et sécrété par les hépatocytes (Henriksen et Sallenave, 2008). L'EN est également inactivée par d'autres inhibiteurs endogènes de sérine protéinase (serpins) comme l' α_2 -macroglobuline, les protéases leucocytaires sécrétoires (SLPI) (Travis et Salvesen, 1983) et l'élafine (Henriksen et Sallenave, 2008).

L' α_1 -PI est un inhibiteur systémique typique de plusieurs sérines protéases incluant la PR3, la CG et cible principalement l'EN. Cet inhibiteur inactive l'EN en s'y attachant de façon covalente et permanente (Dobo et Gettins, 2004). Il inhibe approximativement 92% de l'EN du sérum, le reste de l'inhibition étant assuré par l' α_2 -macroglobuline (α_2 -M) (Ohlsson, Olsson, 1974). Ce dernier bloque en partie l'activité de l'EN à travers une obstruction structurale d'une fraction protéique de la sérine protéase (Travis et Salvesen, 1983). Le SLPI et l'élafine inhibent principalement l'EN *via* ses extrémités C-terminale (Simpson et al., 1999). L'inhibition de l'EN limite et régule l'effet protéolytique excessif de cet enzyme (Henriksen et Sallenave, 2008).

II.4. Stress oxydatif et l'élastase du neutrophile

Les espèces réactives oxygénées et l'élastase du neutrophile constituent l'une des principales armes bactéricides du neutrophile où la première est un mécanisme bactéricide oxydatif et la deuxième est un mécanisme non oxydatif (Nathan, 2006). En effet, la présence d'un stress oxydatif (ERO) en voisinage des polynucléaires neutrophiles va diminuer la production et inhiber l'activité biologique de l'alpha-antitrypsine (Lee et Downey, 2001) et les autres inhibiteurs de l'EN (Gougerot-Pocidalo et al., 2005). Les ERO sont également capables d'induire l'expression de l'EN (Thring et al., 2009).

II.5. Implication pathologique de l'élastase du neutrophile

Dans certaines conditions pathologiques, un déséquilibre est créé entre l'élastase et les anti-élastase, en faveur du premier. Ce déséquilibre est principalement dû à un déficit en α_1 -antitrypsine d'origine génétique ou fonctionnelle (tabagisme) (Macnee, 2000), ou en raison de

recrutement accru des leucocytes (Sartor et al., 2002 a). L'activation accrue de cet enzyme qui dégrade et modifie les constituants architecturaux essentiels de la matrice extracellulaire à proximité immédiate des neutrophiles activés va se traduire par l'apparition et le développement de nombreuses pathologies (Liou et Campbell, 2000). La plupart de ces dernières se manifestent en présence d'un stress oxydatif, dont les plus importants sont :

II.5.1. L'athérosclérose

Selon l'OMS, l'athérosclérose, première cause de décès dans le monde, est une maladie inflammatoire chronique des vaisseaux sanguins artériels (Saïle et Taki, 2007). L'événement initiateur de cette pathologie (développement de la plaque d'athérome) est la pénétration de LDL dans l'intima (Figure 4). Le rôle des LDL dans l'athérogénèse est fortement lié aux transformations biochimiques qu'elles subissent au sein de l'intima, notamment leur oxydation.

À l'état normal, les LDL sont éliminées par l'intermédiaire des récepteurs B/E de l'hépatocyte auxquels elles se lient à travers un site de liaison porté par l'Apo B. Il s'agit d'un processus anti-athérogène. Quand elles sont oxydées, les LDL sont reconnues par d'autres récepteurs, les récepteurs "éboueurs" (ou Scavenger Receptors) des macrophages. Ces récepteurs entraînent les LDL dans un processus athérogène dans la mesure où cette voie ne subit aucun rétrocontrôle métabolique ce qui conduit à une absorption excessive de cholestérol dans les macrophages. Il y a alors formation de cellules spumeuses (James, 1993, Picard, 1998).

C'est à cette étape que les stries lipidiques apparaissent. Les macrophages présents sur le site de la lésion avec le concours des cellules endothéliales (figure 4) produisent des cytokines et des molécules qui entretiennent l'état inflammatoire au niveau de la lésion. Une fois que la réaction inflammatoire est amorcée, elle a tendance à s'amplifier d'elle-même.

Une plaque mature d'athérosclérose est composée de deux éléments : un cœur lipidique et une matrice.

- Le cœur lipidique est composé de cellules spumeuses, de résidus de cellules spumeuses et de gouttelettes de lipides.
- La matrice est formée de cellules musculaires lisses qui migrent de la média vers l'intima; elles prolifèrent et modifient leur phénotype afin de former une capsule fibreuse sur le cœur lipidique (figure 4) qui assure la stabilité de la plaque (Saïle et Taki, 2007). En Profondeur, elle sépare le centre athéromateux du media, elle est constituée de collagène, de mucopolysaccharides, d'élastine, de fibrine et de cellules musculaires lisses clairsemées, on peut aussi y trouver des granulomes inflammatoires.

La diminution de la synthèse et la dégradation de ce tissu de soutien va fragiliser la capsule fibreuse. La dégradation de la matrice résulte de la sécrétion de MMP (Matrix Metalloproteinases) telles que les collagénases, les élastases, les gélatinases ou les stromélysines (Crea et al., 1997). De récents travaux ont également montré que l'élastase du neutrophile est impliquée dans cette dégradation (Dollery et al., 2003). En effet, l'activité de cet enzyme résulte de la réponse inflammatoire qui règne au sein de la plaque, elle est commandée par de nombreuses cytokines. Il faut aussi signaler que cette réponse peut être amplifiée par la présentation de différents antigènes (Ag) aux lymphocytes T par les macrophages. Outre les LDLox, les Ag présentés peuvent être : des Ag viraux (herpes, cytomegalovirus) ou des Ag bactériens (*Chlamydia*) (Kol et al., 1999).

La fragilisation de la capsule entraîne la rupture de l'endothélium qui met ainsi au contact du sang circulant le contenu de la plaque qui contient des substances pro-coagulantes (Giral, 1998). Les plaquettes sont mobilisées vers le sous-endothélium et libèrent des substances vasoconstrictrices. L'ensemble forme un point d'appel à la thrombose (Thomas, 1996) dont le premier but est de colmater la blessure mais qui est susceptible de s'obstruer par le fait même de la lumière de l'artère et de provoquer un syndrome ischémique. De plus, cette plaque d'athérome fragilisée en surface, des fragments de la plaque peuvent s'en détacher et ainsi se libérer dans la circulation sanguine et aller obstruer des artères plus petites du cerveau (hémiplegie), du cœur (infarctus) et des poumons (embolies pulmonaires) (Saïle et Taki, 2007).

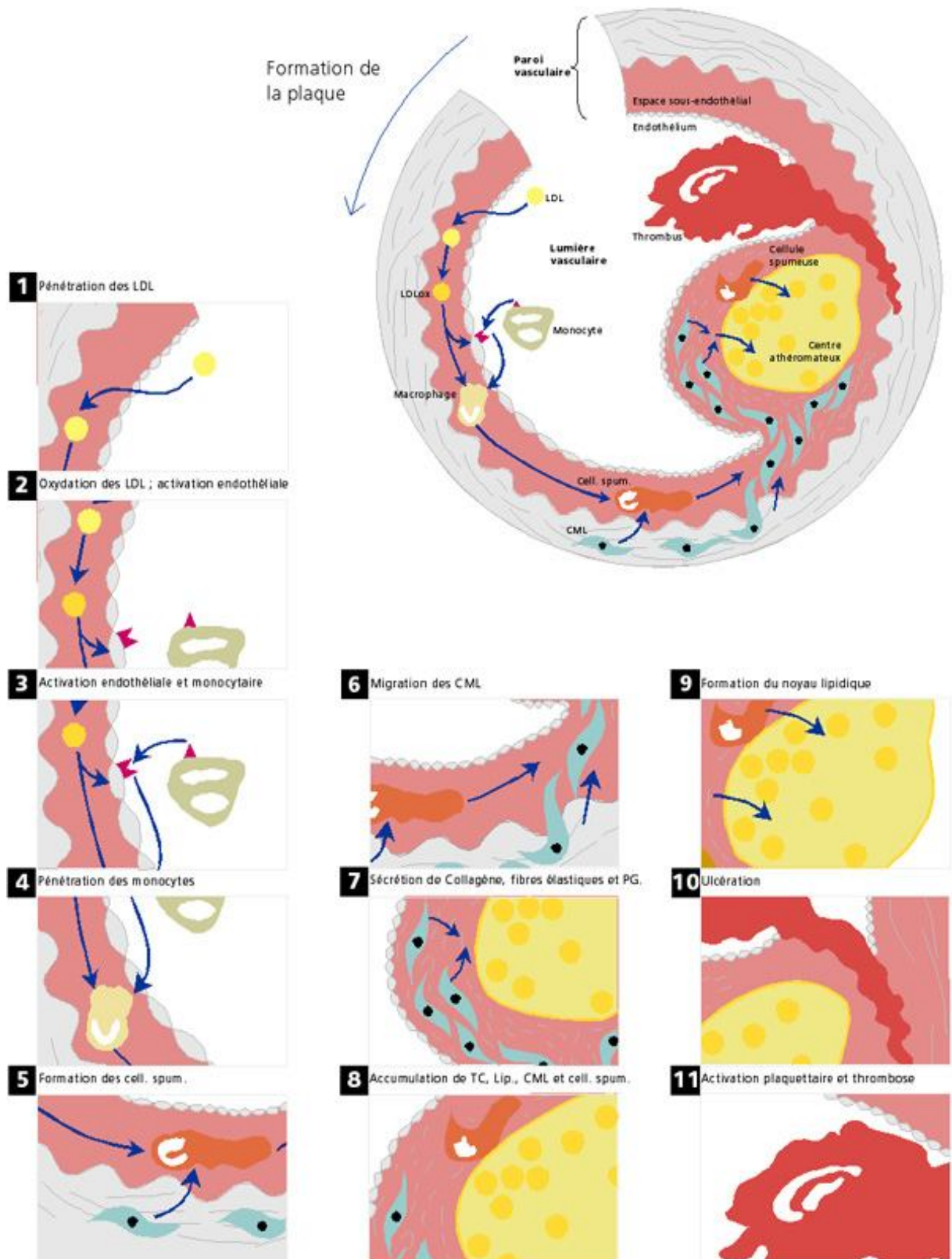


Figure 4: Formation de la plaque athéroscléreuse : vue générale et détail des étapes (CS : cellules spumeuses ; CML : cellules musculaires lisses ; LDL : Low Density Lipoprotein ; LDLox : LDL oxydée ; Lip. : lipides ; PG : protéoglycane ; TC : tissu conjonctif). (Cohen, 1997)

Ainsi, la formation de LDLox est un élément initiateur majeur dans la formation de la plaque d'athérome, et la rupture de la plaque est l'une des étapes de complication de cette plaque. Un traitement antioxydant et même anti-élastase pourrait compléter un régime hypolipémiant dans le cadre de la prévention de cette pathologie.

II.5.2. Maladies respiratoires

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est la quatrième cause de décès au niveau mondial (Pauwels et al., 2001). Le rôle du tabac dans le développement de la BPCO est indiscutable à tel point que la BPCO est considérée comme la « maladie du fumeur » (Feenstra et al., 2001). Le nom BPCO désigne un ensemble de problèmes respiratoires graves et irréversibles dont le plus important est l'emphysème (Campbell et al., 1999).

L'emphysème est la conséquence d'une destruction du parenchyme pulmonaire. Il se définit comme un élargissement irréversible des voies aériennes en aval des bronchioles terminales entraînant une destruction des bronchioles respiratoires et parfois des parois alvéolaires (figure 5) (Screaton, 2004).

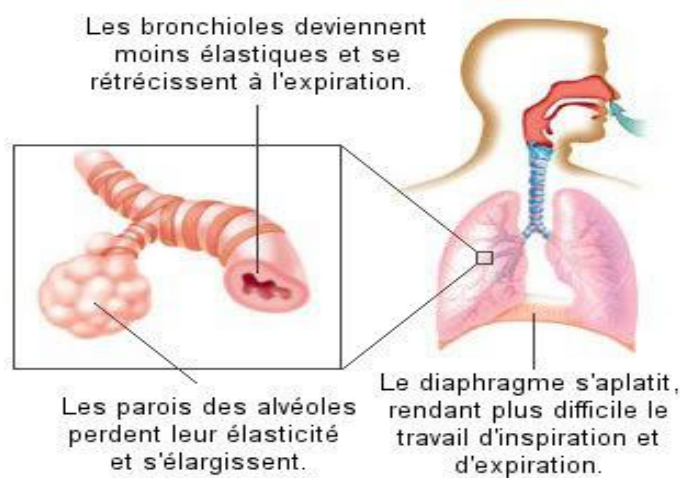


Figure 5: L'emphysème

Les mécanismes en jeu incluent une réponse inflammatoire chronique ou un déséquilibre entre les protéases et antiprotéases pulmonaires en faveur des premières dont l'origine peut être génétique ou la conséquence d'une activité inflammatoire liée à l'action toxique du stress oxydatif (Pauwels et al., 2001)

L'inflammation retrouvée dans la BPCO atteint géographiquement surtout les voies aériennes périphériques (bronchioles) et le parenchyme pulmonaire conduisant à la fibrose des petites voies aériennes ainsi qu'à la destruction du lobule secondaire (Barnes, 2004).

Le déséquilibre entre les protéases et les antiprotéases fut évoqué comme étiologie possible de l'emphysème, du stress oxydatif, *via* l'inflammation, l'infection ou le tabagisme qui vont ainsi diminuer la production et l'activité biologique des antiprotéinases. Parmi ce groupe se trouvent essentiellement les inhibiteurs des sérine-protéases essentiellement l' α_1 -antitrypsine. L'activité accrue des protéases, notamment l'élastase aura pour effet d'amplifier l'inflammation *via* le facteur nucléaire NF-kB, de dégrader l'élastine et le collagène, deux éléments importants dans la composition de la paroi alvéolaire (et de ce fait les parois alvéolaires). Avec le temps, le parenchyme des poumons devient moins élastique (Barnes, 2003) aboutissant ainsi à la réduction progressive de la surface d'échange alvéolo-capillaire et au développement d'un trouble ventilatoire obstructif. Il va également altérer le processus de réparation intrapulmonaire (activation de cytokines et facteurs de croissance) et produire des anomalies du surfactant. D'autre part, il provoque aussi une hyperplasie des glandes avec une majoration de la production de mucus. L'élastase va à son tour favoriser la production des ERO par certaines cellules épithéliales, augmenter l'expression de certaines cytokines (IL-8) et diminuer la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages (Shapiro et al., 2003). Ces éléments sont responsables d'une insuffisance respiratoire chronique conduisant à un handicap sévère et au décès dans un grand nombre de cas (Plantier, 2008).

Des travaux ont montré le rôle des molécules endogènes (notamment certains facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire) dans la genèse du stress oxydatif et la survenue d'un emphysème, mais les sources habituelles des oxydants, outre la cigarette, sont l'inflammation et l'infection. Le stress oxydatif est responsable de son côté de plusieurs effets néfastes dans le poumon, *via* l'altération de l'ADN (mutation des gènes p53 et K-ras notamment), des lipides et protéines (responsables d'apoptose de l'épithélium alvéolaire emphysème), production de mucus par les cellules épithéliales et dysfonctionnement ciliaire avec risques infectieux augmentés. Les radicaux libres augmentent également la perméabilité épithéliale, réduisent l'activité du surfactant et sont toxiques pour les fibroblastes amenant une altération de la mécanique pulmonaire ou du mécanisme de réparation. Le stress oxydatif lui va activer les métalloprotéinases de la matrice. Il va également altérer la translocation jusqu'au noyau des récepteurs aux corticoïdes, ainsi que leur lien avec l'ADN et va réduire

l'activité de l'histone déacétylase. Cette action conjuguée est responsable d'une résistance au traitement stéroïdien (Tuder et al., 2003).

II.5.3. Cancer

Le cancer est la cause majeure de décès dans le monde, à l'origine de 7,6 millions de décès en 2008, soit environ 13% de la mortalité mondiale.

La carcinogénèse est un processus complexe et multi-séquentiel qui conduit à la transformation d'une cellule saine à une cellule à un état précancéreux qui réplique de façon anormale. La carcinogénèse se déroule généralement en trois étapes principales : "initiation–promotion - progression" (Trueba et al., 2004). Les ERO peuvent agir dans toutes les étapes de la carcinogénèse, ces espèces peuvent être responsables des mutations dans l'ADN, et donc de l'initiation du cancer (Manett, 2002). La modification d'ADN oxydante la plus répandue est la formation de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-Gua) qui peut aboutir à des substitutions de GC par TA (Evans et al., 2004) lorsqu'elle n'est pas réparée avant la réplication de l'ADN. Ainsi, la présence de la 8-OH-Gua peut mener à une mutation. De plus, il a été montré une corrélation directe entre la 8-OH-Gua et les phénomènes de carcinogénèse *in vivo* (Le Page et al., 1998). Donc un déséquilibre entre les antioxydants et les ERO sont responsables en grande partie de l'initiation de la carcinogénèse.

D'autre part, des recherches de laboratoires et des résultats cliniques ont démontré qu'un déséquilibre entre l'EN et l' α_1 -antitrypsine peut créer un environnement tissulaire favorable pour la carcinogénèse et la progression des tumeurs. Ils ont également démontré qu'une carence en α_1 -antitrypsine est associée avec l'augmentation du risque du cancer du foie, de la vessie, de la vésicule biliaire, des lymphomes malins, du poumon (Sun et Yang, 2004), et du sein (Sato et al., 2006). Des taux élevés de l'EN pourraient promouvoir le développement, l'invasion et la métastase de nombreux cancers, en dégradant la barrière de la matrice intercellulaire et peut mener directement au développement de cancers *via* la voie de signalisation du TNF (Sun et Yang, 2004). D'autres part certains types de cancers sont capables de synthétiser l'EN, elles l'utilisent pour entrer dans les vaisseaux sanguins et envahir le tissu d'un organe, de façon identique à celle de la neutrophile, la seule différence est que les cellules cancéreuses ne deviennent pas apoptotiques et ne meurent pas dans le tissu. La croissance des cellules cancéreuses exige de nouveaux vaisseaux sanguins alors que les

neutrophiles deviennent apoptotiques après leur entrée dans le tissu et meurent en moins de 72 h (Sato et al., 2006).

II.5.4. Rhumatoïde arthrite

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la maladie rhumatismale inflammatoire la plus fréquente puisqu'elle affecte environ 0,5 % de la population adulte. Il s'agit d'une maladie systémique dont les manifestations cliniques s'expriment le plus souvent au niveau articulaire (Larbre et al., 1994). Pour la polyarthrite rhumatoïde la substance fondamentale du cartilage subit des changements structuraux, moléculaires et mécaniques substantiels au cours du vieillissement comme la fibrillation de surface, les altérations de la structure de la composition des protéoglycannes ainsi que la dégradation accrue de collagène et la diminution de sa rigidité (Martel-Pelletier et al., 1999).

Les causes exactes de PR ne sont pas bien connues, mais on soupçonne une possible implication des radicaux libres et des protéases telle que l'élastase de neutrophile.

Sur la jonction du pannus-cartilage, premier site d'érosion du cartilage, les NPN et autres cellules immunitaires s'accumulent et contribuent directement à la destruction du cartilage par l'action de leurs protéases et par la production des ERO (Larbre et al., 1994). Des études *in vitro* ont démontré que la formation du ONOO^- diminue la synthèse de collagène de type II et d'agrécan ainsi que la réponse chondrocytaire au facteur de croissance IGF-1. Par ailleurs, le ONOO^- augmente l'expression des MMP-3 et 13 et diminue la synthèse et l'activité des inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs) (Henrotin et al., 2003). L'ensemble de ces changements aboutit à une augmentation de la dégradation matricielle. Le $\text{TNF-}\alpha$ produit de façon excessive au cours de la PR est décrit comme principal activateur de la production des ERO. Hormis les effets cellulaires délétères de cette cytokine, le TNF est un inhibiteur de la SOD1 (Afonso et al., 2006) et SOD3 (Stralin et Marklund, 2000). Le travail initial de Marklund et al. (1982) montre que la SOD3 est l'enzyme majoritaire dans le liquide synovial et représente 80 % de l'activité enzymatique de ce liquide. Une réduction de 50 % de l'activité de SOD3 est observée chez les patients atteints de PR, ce qui pourrait augmenter la susceptibilité du tissu synovial à l'attaque radicalaire.

Par ailleurs, des taux élevés d'élastase sont également présents dans le liquide synovial des patients atteints de PR (Lopez et al., 1995). Elle participe avec les autres sérines protéases des NPN au remodelage de cartilage articulaire (Okada et al., 1988) *via* la dégradation de la matrice extracellulaire, directement ou en activant des métalloprotéases matricielles (Liau et al., 1996, Allen et Tracy, 1995).

Finalement le développement d'antioxydants, et/ou d'inhibiteurs exogènes d'élastase seraient des drogues de premier-choix qui vont protéger l'organisme de toutes ces pathologies dépendantes de l'activité accrue de l'élastase et/ou de l'augmentation des ERO dans l'organisme (Barnes, 2003), le remplacement d' α_1 -antitrypsine direct est également une approche thérapeutique potentielle (Sartor et al., 2002 a).

III. Les polyphénols

Depuis quelques années, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que la consommation de légumes, fruits et certaines boissons peuvent prévenir des maladies cardiovasculaires et certains types de cancers. Les polyphénols très répandus dans l'alimentation semblent être responsables de ce phénomène (Krisa et al., 1997). Ces composés sont des métabolites secondaires dont la nature et la teneur dans les végétaux est très variable et participent à la défense contre les agressions environnementales. Ce sont des phytomicronutriments et plus généralement des pigments responsables des teintes automnales des différents organes végétaux (Edeas, 2007). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié des groupements hydroxyles (Dacosta, 2003).

Ces molécules représentent une famille constituée d'environ 8000 composés, divisés en plusieurs catégories qui sont principalement : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins issus de la polymérisation des flavonoïdes, les lignanes qui, avec les isoflavones sont nommés phyto-oestrogènes (figure 6). Parmi ces classes, les flavonoïdes constituent la classe majoritaire des polyphénols (Edeas, 2007).

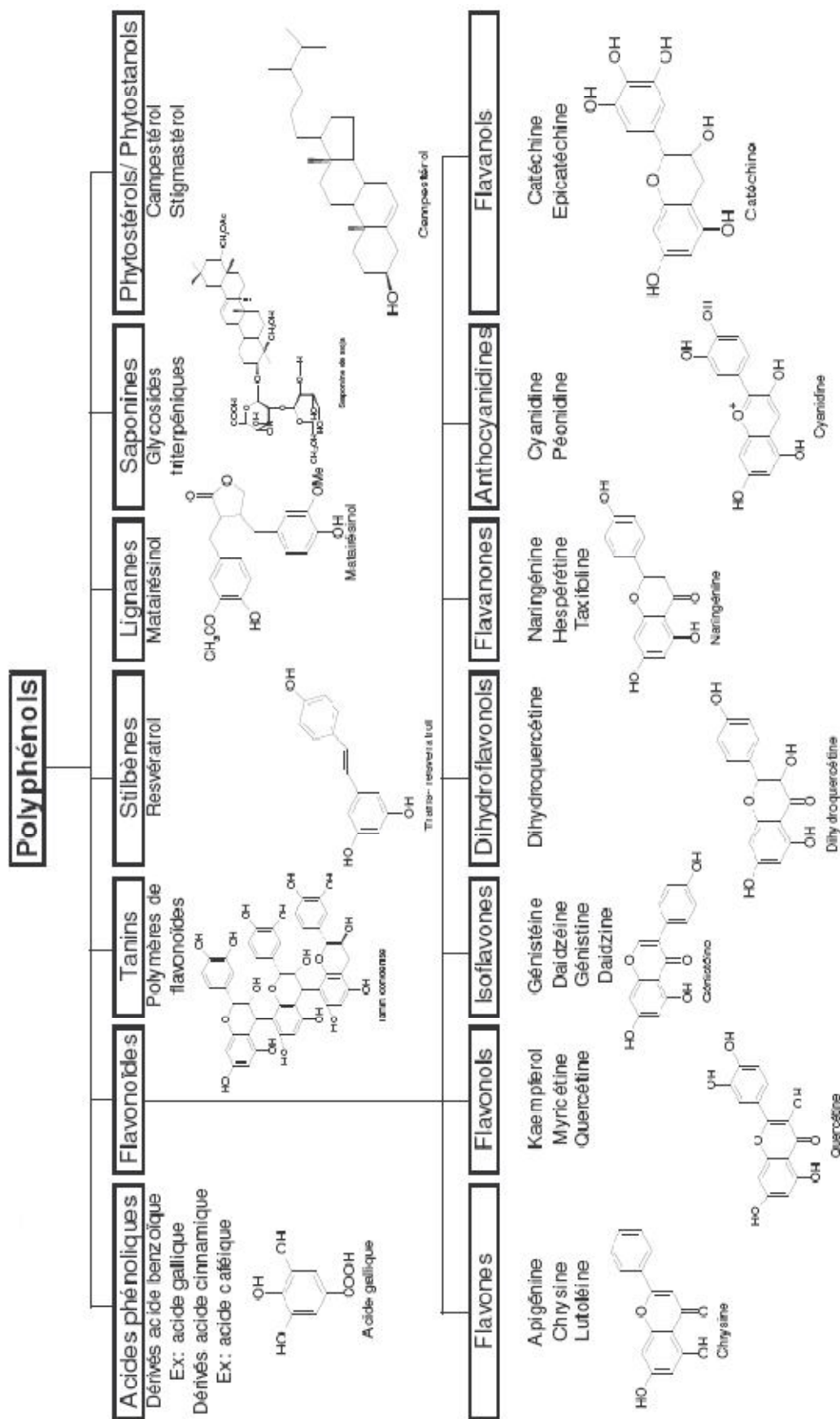


Figure 6: Classification générale des polyphénols (Gervaise, 2004)

III.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Erlund, 2004). Ce sont des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Havsteen, 2002). Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits et les légumes. Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes sont utilisés en médecine traditionnelle de par le monde entier (Di Carlo et al., 1999). Les travaux relatifs aux flavonoïdes se sont multipliés depuis la découverte du « French paradox », correspondant à un taux bas de mortalité cardiovasculaire observée chez des populations méditerranéennes en associant à une consommation de vin rouge et à une prise importante de graisses saturées (huile d'olive) (Nijveldt, 2001).

III.1. 1. Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste sous forme d'hétéroside. Ils se libèrent de ce dernier pour s'accumuler dans la vacuole (Guignard et al., 1985). Ces molécules ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce (Lee et al., 1994) mais elles ont une teneur maximale dans les organes jeunes (les boutons floraux et jeunes feuilles) (Paris et Hurabielle, 1981). Par contre, ils sont rencontrés en abondance dans les familles suivantes (Hadi, 2004) :

- | | | |
|----------------|--------------|----------------|
| - Polygonacées | - Apiacees | - Légumineuses |
| - Rutacées | - Astéracées | |

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes : la chrysine, la quercétine et la galangine se trouvent dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions des bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, le sapin et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires (Marfak, 2003).

III. 1. 2. Structure chimique et classification

L'ensemble des flavonoïdes de structure générale en C₁₅ sont constitués de deux unités aromatiques (deux cycles) en C₆ (A et B) reliés par un hétérocycle en C₃ (figure 7). Il comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes, dont les plus importantes sont les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanols, et les anthocyanidines (figure 7) (Macheix et al., 2005). Ces classes se différencient entre elles par le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000).

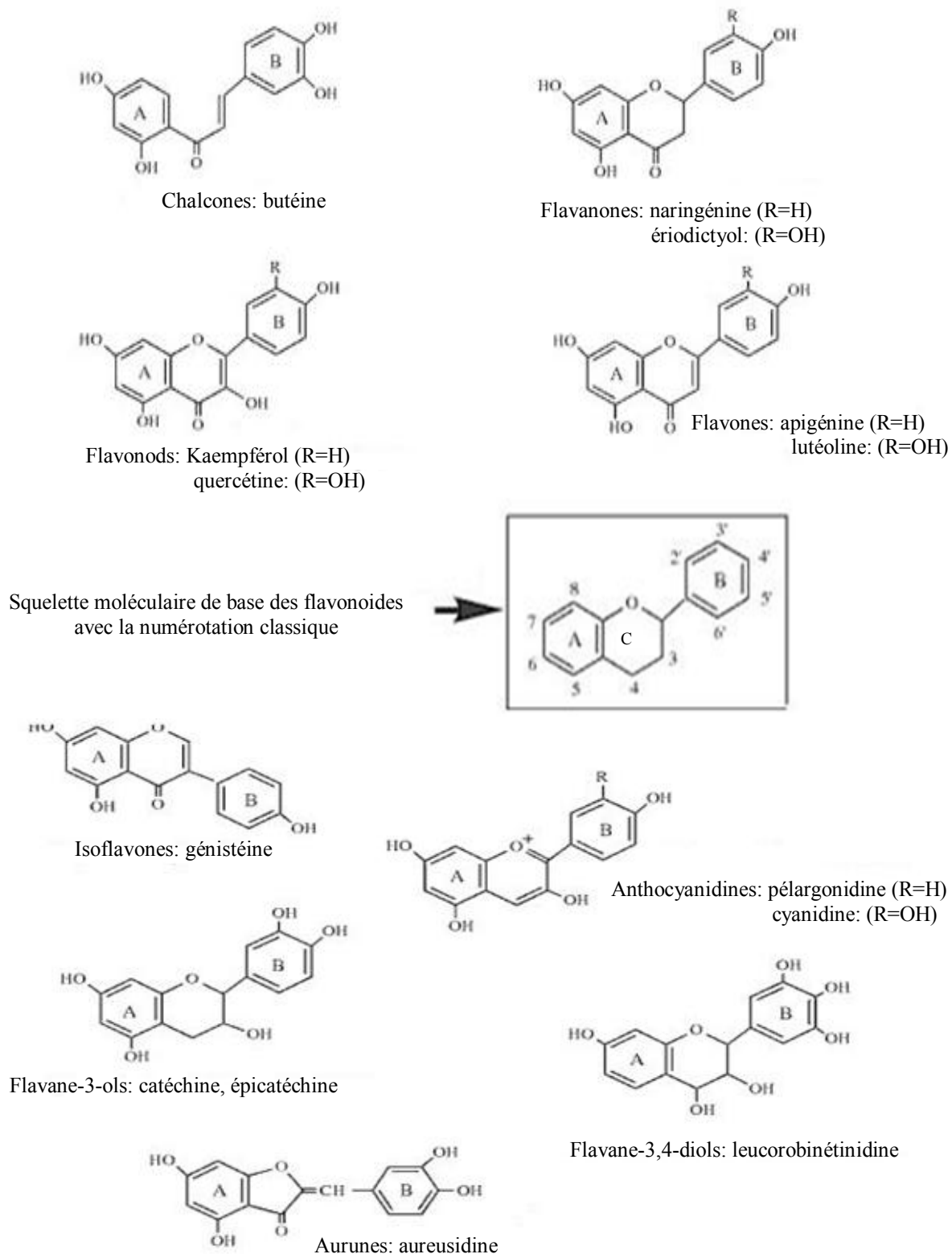


Figure 7: Les principales classes de flavonoïdes. Un (ou deux) exemple (s) précis a été donné chacun des cas. La numérotation classique des différents sommets des cycles est rappelée sur le squelette moléculaire de base (Macheix et al., 2005)

Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B (Heim et al., 2002). À l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent très souvent sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone ou génine, l'unité glycosidique la plus commune est le glucose mais parfois elle peut être du glucorhamnose, du galactose, de l'arabinose ou du rhamnose (Heim et al., 2002).

III. 2. Sources des polyphénols

Les fruits, les légumes et les plantes médicinales sont la principale source de polyphénols. Le tableau 3 regroupe quelques exemples de polyphénols et leurs principales sources.

Tableau 3: Quelques sources naturelles des polyphénols (Ghedira, 2005, Lotito et Frei, 2006)

<i>polyphénols</i>	<i>Source : produits alimentaires et plantes médicinales</i>
Acide phénolique	
Acide chlorogénique	Herbes aromatiques, café, prune.
Stilbènes	
Trans resvératrol	Vin rouge, arachides, mûre, peau de raisin.
Lignanes	
Seco-isolariciresinol	Lins oléagineux, céréales non raffinées, café.
Flavones	
Apigénine	Persil, thym, romarin, céleri.
Flavones glycosylés	
Baicaline	<i>Scutellaria baicalensis</i> .
Flavonols	
Quercétine	Oignon, tomate, olive, épinard, pomme, , raisin, abricot.
Kaempférol	Brocoli, radis, thé noir.
Myricétine	Canneberge, vin rouge.
Flavonols glycosylés	
Rutine (rutoside)	<i>Eucalyptus macrorrhyncha</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Stellaria media</i> , <i>Sophora japonica</i> .
Flavan-3-ols	
Catéchine	thé vert et thé noir, pêche, poire, framboise, chocolat.

Flavanones	
Naringénine	fruits du genre Citrus (<i>sp. aurantium, limon, etc.</i>).
Isoflavones	
Génistéine	<i>Soya hispida, Stellaria media, Pueraria lobata, Sophora japonica.</i>
Anthocyanidins	
Cyanidin	Cassis, myrtilles.
Malvidin	Raisin, fraise.
Apeginidin	Framboise, fraise.

III.3. Activités biologiques des polyphénols

III.3.1. Activité antioxydante

La propriété des polyphénols, plus particulièrement des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, ROO^{\cdot}). Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer ces effets délétères par la production des radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) (Nijveldt, 2001).

Ils peuvent exercer leur effet antioxydant *via* l'inhibition de certaines enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Marfak, 2003, Lotito et Frei, 2006) ou la xanthine oxydase (Pietta, 2000).

III.3.2. Activité anti-élastase

L'activité antioxydante des polyphénols est la plus connue, cependant des études sur l'effet inhibiteur de ces composés vis-à-vis de l'élastase sont rares. Melzig et ses collaborateurs (Melzig et al., 2001) ont montré que 40 polyphénols exercent un effet inhibiteur significatif vis-à-vis l'élastase du neutrophile où les flavonoïdes avec une structure catéchol étaient les plus actifs. Sartor et al., 2002b ont montré que cette activité est due d'une part au groupement hydroxyle du C3 et C4', aux trois groupements d'hydroxyle portés sur le cycle B et à la double liaison C2-C3.

III.3.3. Autres activités biologiques

L'activité antioxydante et anti-élastase des polyphénols confère à ces derniers plusieurs activités pharmaco-biologique importantes, surtout pour celles liées à la prévention des

maladies causées par les EOR et l'élastase du neutrophile telles que les maladies cardiovasculaires et certains types de cancers.

En tant qu'antioxydants et inhibiteurs d'élastase, les polyphénols sont capables d'inhiber la carcinogenèse. Ils inhibent en plus de l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales (Rice-Evans, 2001).

Les flavonoïdes manifestent également une activité P vitaminique qui intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale (Beretz, et Cazenave, 1991).

Les polyphénols ont été utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle dans le traitement des affections hépatiques avec leurs propriétés anti hépatotoxiques (Gilani et al., 1997). Ils possèdent également une activité anti-ulcérogène (Di Carlo et al., 1999).

Les polyphénols sont également connus pour leurs effets anti-inflammatoires (Galati et al., 1994) et antiallergiques. Ils agissent en inhibant des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles (Magliulo et al., 1973)

Les propriétés antibactériennes et antivirales des polyphénols (flavonoïdes) vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence (Jassim, et Naji, 2003).

Finalement, les polyphénols préviennent la cataracte diabétique par l'inhibition de l'aldose réductase du cristallin (Chaudhry et al., 1983).

IV. l'olivier

Dans la culture arabo-musulmane, l'olivier est un arbre particulier. Il fait parti des arbres cités dans le Coran au regard, entre autre, de ses vertus alimentaires et thérapeutiques déjà signalées et approuvées par des recherches scientifiques, surtout celles qui concerne la faible incidence de maladies cardiovasculaires et de certains types de cancer et la consommation de produits de cet arbre (olive, et huile d'olive).

IV.1. Aspect botanique et répartition géographique

L'olivier, arbre originaire des régions méditerranéennes, occupe la 24^{ème} place des 35 espèces les plus cultivées dans le monde. Elle comporte 30 espèces différentes réparties à la surface du globe. L'espèce cultivée dans le méditerranéen est *Olea europaea* dans laquelle on rencontre l'oléastre ou olivier sauvage et l'olivier cultivé (*Olea europaea sativa*) (Blazquez, 1997). Selon Breton, 2006, la classification de *Olea europaea* L. est la suivant :

Famille	Oleaceae
Genre	Olea
Espèce	<i>Olea europea</i> L.

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen, de 6 à 8 m de hauteur, à tronc tortueux et à écorce grisâtre et crevassée (Bruneton, 1999; Iserin, 2001). Les feuilles, blanches argentées à la face inférieure dû à la présence de poils tecteurs (Loussert et Brousse, 1978), vertes grisâtres à la face supérieure, opposées, coriaces, lancéolées et persistantes (Bruneton, 1999, Iserin, 2001), elles ont une durée de vie de l'ordre de trois ans. Leurs dimensions peuvent varier de 3 à 8 cm de long et de 1 à 2.5 cm de large (Loussert et Brousse, 1978). Les fleurs petites, blanches et à quatre pétales sont réunies en grappes dressées (Bruneton, 1999) en nombre très varié qui peut aller de 10 à plus de 40 fleurs par grappe en moyenne (Loussert et Brousse, 1978). Les fruits que sont les olives sont des drupes ovoïdes, vertes puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme (Bruneton, 1999, Iserin, 2001) (Figure1).



Figure 8: Aspect morphologique de la plante *Olea europaea* L. et leurs parties

L'olivier est un arbre essentiellement, on pourrait presque dire exclusivement, méditerranéen. Il est cultivé dans toutes les régions qui bordent la Méditerranée (Cavaillès, 1938), il est également cultivé dans les pays d'Amérique ayant un climat similaire (Iserin, 2001), notamment aux États-Unis (Californie), en Amérique du Sud (Argentine, Chili, Pérou, Uruguay) (Cavaillès, 1938) et même dans le sud africain (Ross, 2005) (Figure 9) où le nombre mondial d'oliviers est évalué à 784 millions, dont 754,2 Ms dans le bassin méditerranéen. Au sein du Bassin Méditerranéen, l'Europe représente 66% du verger oléicole

mondial, loin devant l'Asie méditerranéenne (17%) et l'Afrique du Nord (14%) (Cavaillès, 1938).

En Algérie, la surface oléicole est répartie dans trois zones importantes:

La zone ouest, représente 16.40 % du verger oléicole national repartis entre 5 wilayas (Tlemcen, Aïn Temouchent, Mascara, Sidi Bel Abbès et Relizane).

La zone centrale du pays, elle représente 57,5% de la superficie oléicole nationale, (Aïn Djefla, Blida, Boumerdes, Tizi Ouzou, Bouira et Bejaia). Dans cette région du centre, la Kabylie (Bouira, Bejaia et Tizi-ouzou) détient à elle seule près de 44 % de la superficie oléicole nationale.

La zone Est représente par 26,1 % du patrimoine national, repartis entre les wilayas de Jijel, Skikda, Mila et Guelma.

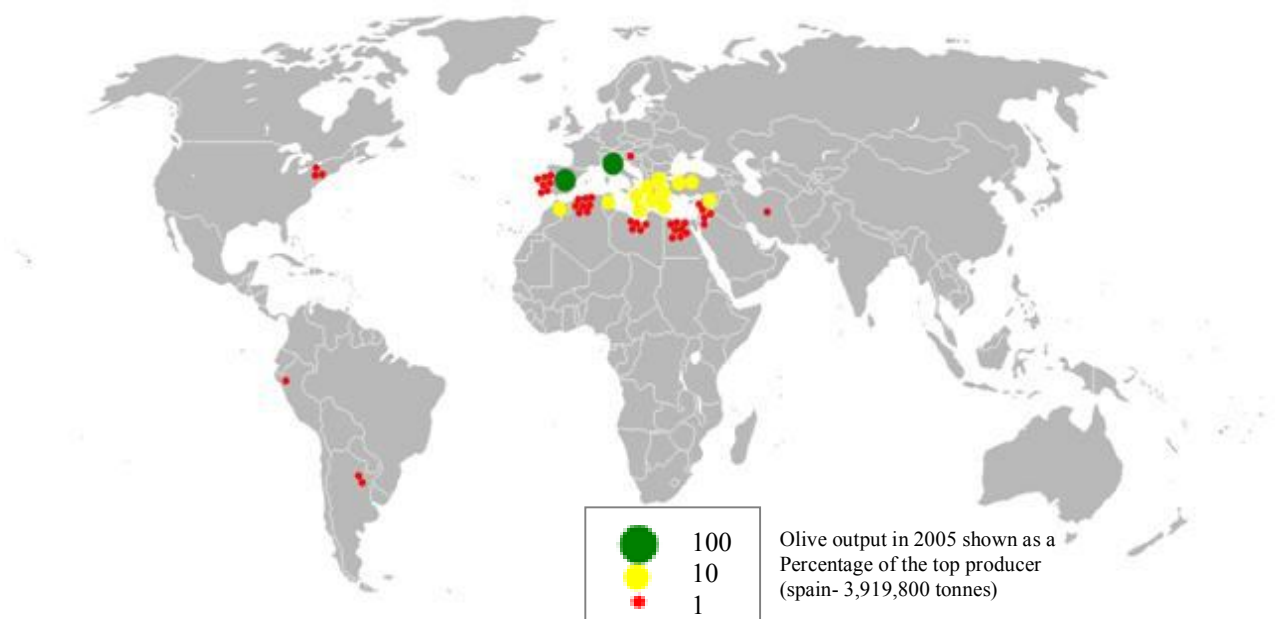


Figure 9: Répartition géographique de l'oléiculture

IV.2. Principaux constituants de l'olive et de l'huile d'olive

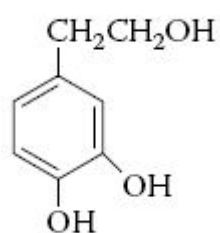
IV.2.1. Constituants majeurs

Les acides gras sont les constituants majeurs de l'huile d'olive, et d'olive, dont les principaux : acide palmitique 7,5-20%, acide palmitoléique 0.3-3.5%, acide stéarique 0.5-5%, acide oléique 55-83%, acide linoléique 3,5-21% et acide α -linoléique $> 0,9\%$. (Tripoli et al., 2005).

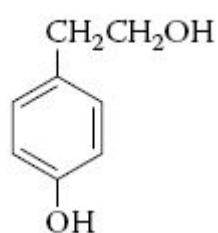
IV.2.2. Constituants mineurs

IV.2.2.1. Les composés phénoliques

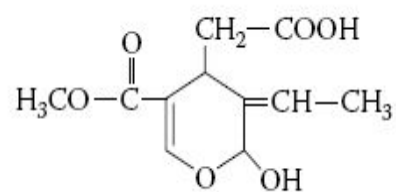
Le contenu en ces composés est habituellement compris entre 100 et 300 mg/kg dans l'huile (Boskou, 2009). Les classes les plus importantes des composés phénoliques dans l'olive incluent les acides phénoliques, les alcools phénoliques, les flavonoïdes et les secoiridoids (Romero et al., 2002). Les alcools phénoliques des olives sont 3,4-dihydroxyphényléthanol (hydroxytyrosol) et p- hydroxyphényléthanol (tyrosol) (Romani et al., 1999). Les flavonoïdes les plus fréquents incluent le lutéoline 7-O-glucoside, la rutine et l'apigénine 7-O- glucoside, les anthocyanines, la cyanidine 3-O-glucoside et la cyanidine 3-O rutinoside (Macheix, et al., 1990). Dans quelques cultivars, un glycoside de delphinidine a été également décrit (Brenes et al., 1995). L'oleuropéine et le ligstroside sont les secoiridoids prédominants de la pulpe d'olive. Quelques dérivés d'oleuropéine ont été également décrits, à savoir le diméthyloléuropéine, l'oleuropéine aglycone, l'acide élénolique et le verbascoside qui est le principal dérivé de l'acide hydroxycinnamique du fruit de l'olivier (Macheix, et al., 1990). Les composés phénoliques en général, et les secoiridoids en particulier, influencent les propriétés sensorielles des olives et des huiles d'olive vierges et sont en grande partie responsables des modifications se produisant pendant le traitement des olives de table (Gapor Md Top et Abd Rahman, 2000). Dans l'huile d'olive vierge, ils sont les principaux agents responsables de la résistance contre l'auto-oxydation et la phot-oxydation (Macheix, et al., 1990).



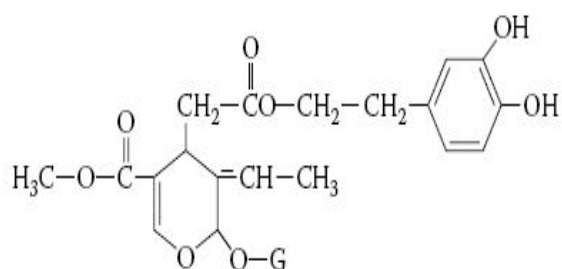
Hydroxytyrosol



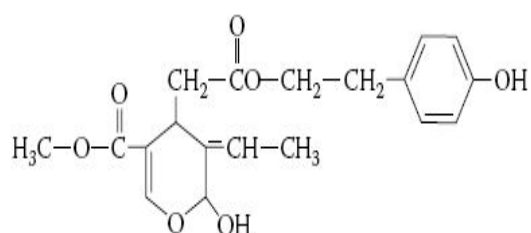
Tyrosol



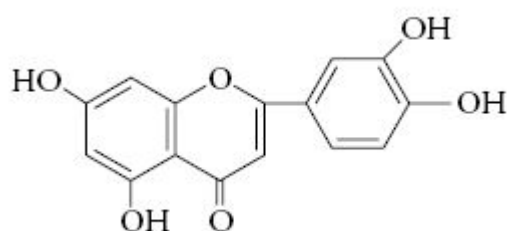
Acide élénolique



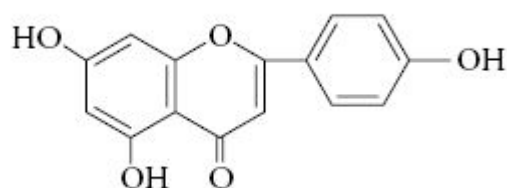
Oleuropéine



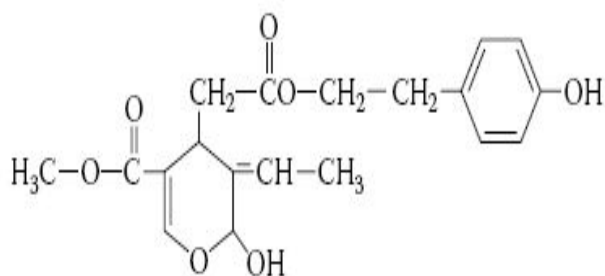
Oleuropéine aglycone



Apigénine



Lutéoline



Ligstroside Aglycone

Figure 10: Structure des principaux polyphénols et leurs dérivés présents dans l'olive
(Boskou et al., 2006 a)

IV.2.2.2. Terpènes et leurs dérivés

- **Le squalène**, précurseur de phytostérols chez les plantes et du cholestérol chez les humains, est un terpène insaturé largement distribué dans la nature. Chimiquement, c'est un all-trans isoprénoides contenant six unités d'isoprène. Il est présent en petites quantités dans l'huile d'olive (Boskou et al., 2006 a). Le squalène représente de 300-700 mg/100g d'olive (Soler-Rivas et al., 2000) et de 200-7500 mg/kg d'huile d'olive (plus de 50% de la partie insaponifiable dans ce dernier) (Manzi et al., 1998; PerezCamino et Cert, 1999).

- **Les acides triterpéniques** tels que l'acide oléanolique, l'acide maslinique, l'acide ursolique et l'acide bétulinique sont présents en petites quantités dans l'olive et l'huile d'olive (PerezCamino et Cert, 1999). Leur contenu en acide triterpénique dans l'huile d'olive extra vierge est compris entre 40-185 mg/kg (Gul et Seker, 2006).

- **les Triterpène dialcools** sont les principaux composés mineurs de l'olive et de l'huile d'olive, tels que Érythrodiol et uvaol qui sont des triterpènes pentacycliques trouvés principalement dans la fraction nonglycéride d'huile d'olive et résidus d'huile d'olive (PerezCamino et Cert, 1999), et dans les fruits présentent un taux compris entre 100-300 mg/100g (Soler-Rivas et al., 2000).

- **Stérols**: Les phytostérols sont très importants pour la nutrition humaine. Ils se trouvent dans l'olive avec un taux compris entre 70-90 mg/100g (Soler-Rivas et al., 2000). Cependant, le niveau de stérols dans l'huile d'olive se situe généralement de 0.1 à 0.2% où les stérols totaux ont été trouvés entre 1.03 à 2.01 g/kg, suivis par avenastérol allant de 0.07 à 0.44 g/kg (Tsimidou, 2006).

- **Caroténoïdes**: Les principaux caroténoïdes présents dans l'huile d'olive sont la lutéine et le bêta-carotène (PerezCamino et Cert, 1999 168). La teneur totale en caroténoïdes est généralement comprise entre 1 à 20 mg/kg (León1 et al., 2004).

IV.2.2.3. Tocophérols

Parmi les 8 types de vitamine E, l'alpha-homologue présente au cas libre 90% de tocophérols totaux. Le reste est le beta, gamma et delta tocophérols par un taux compris entre 10-20 mg/kg d'huile d'olive (PerezCamino et Cert, 1999), tandis que dans les olives on en trouve entre 4-13 mg/100g d'olive pour l'alpha-tocophérol et entre 1-2 mg/100g d'olive pour le bêta-tocophérol (Soler-Rivas et al., 2000). La concentration d' α -tocophérol, rapportée dans la littérature pour une bonne qualité d'huile d'olive vierge est habituellement dans la gamme 100-300 mg/kg d'huile, la beta et le gamma -tocophérols sont trouvés en petites quantités et le delta -tocophérol seulement en traces (PerezCamino et Cert, 1999).

IV.3. Usage traditionnel et propriétés pharmacologiques de l'olive et de son huile

En réalité l'olivier à travers ses produits l'olive de table et l'huile d'olive a un usage nutritif préventif plutôt que thérapeutique car il représente une grande partie du régime méditerranéen. Mais les parties utilisées dans la médecine traditionnelle sont les feuilles et l'huile des fruits (Bruneton, 1999). Les feuilles abaissent la tension artérielle et améliorent la circulation. Légèrement diurétiques, elles peuvent être utilisées pour soigner les cystites. Capables de réduire le taux de glucose dans le sang, elles sont conseillées aux diabétiques. Très nourrissante, l'huile équilibre le taux de graisse dans le sang. On la prescrit souvent additionnée de jus de citron pour éliminer les calculs biliaires. Elle exerce une action protectrice sur l'appareil digestif et est utilisée comme cholérétique et cholagogue. On lui attribue des propriétés laxatives légères. En usage externe, c'est un adoucissant et un émollient utilisé contre les brûlures et les coups de soleil (Soler-Rivas et al., 2000).

IV.3.1. Pouvoir antioxydant

Toute une série de composés de l'olive et de son huile possèdent une activité antioxydante importante *in vivo* et *in vitro* parmi lesquels la vitamine E (α -tocophérol), les caroténoïdes (β -carotène), les composés phénoliques (notamment l'hydroxytyrosol et l'oleuropiéne) (Covas et al., 2006) et le squalène ou triterpènes (Trichopoulou et al., 2003). Ces molécules par leur effet antioxydant peuvent contribuer indirectement à la prévention contre certaines pathologies induites par les radicaux libres et le stress oxydant.

IV.3.2. Prévention des maladies cardiovasculaires

Plusieurs études épidémiologiques ont montré la relation entre la consommation d'olive et d'huile d'olive et la faible incidence des maladies cardiovasculaires (Jacotot et Henri, 1997). Cet effet est causé d'une part par la richesse de ces derniers en acides gras mono insaturés notamment l'acide oléique (Visioli et al., 1998) qui sont moins sensibles à l'oxydation (Covas et al., 2006). Ils font également diminuer le taux plasmatique de LDL-cholestérol (Visioli et al., 1998) et augmenter le taux de HDL-cholestérol (Covas et al., 2006) par les composés mineurs d'autre part (Visioli et al., 1998) qui protègent les LDL de l'oxydation, surtout l' α -tocophérol (Covas et al., 2006; Perona et al., 2006). Certains composés d'olive et de son huile exercent un effet antithrombotique, antiagrégant plaquettaire (hydroxytyrosol), anti-inflammatoire (acide oleanolique, erythrodol), vasodilatateur et donc hypotensif (oleuropiéne, oleuropéside) (Boskou, 2009; Perona et al., 2006) et hypocholestérolémique

(squalène) (Perona et al., 2006). Tous ces effets préventifs dans la formation et le développement de la plaque d'athérome pourraient expliquer en partie la faible incidence d'infarctus du myocarde dans les pays où l'olive et son huile sont les principales sources de matières grasses.

IV.3.3. Prévention des cancers

D'autres études épidémiologiques ont montré également que la consommation d'olive et d'huile d'olive est associée à une diminution du risque d'apparition de certaines tumeurs malignes et de certains types de cancer. La mutation cellulaire impliquée dans la cancérogenèse étant due en partie à des substances mutagènes (radicaux libres) qui altèrent l'ADN. La neutralisation des espèces réactives de l'oxygène par les antioxydants tels les composés phénoliques contenus dans l'olive et l'huile d'olive vont avoir un effet préventif anticancéreux sur ces espèces. Cet effet bénéfique pourrait ainsi être lié à l'action de l'acide oléique qui entraîne une réduction de la production des prostaglandines dérivées de l'acide arachidonique qui jouerait un rôle dans la promotion cellulaire, seconde étape de la cancérogenèse (Soler-Rivas et al., 2000). Il a été aussi établi que le squalène, les stérols (Prasad, 1997) et les lignans (Covas et al., 2006) présentent une action anticancéreuse. L'effet anticancéreux de lignans est probablement dû à son effet antioxydant (Owen et al., 2000), antiviral (Manna et al., 2002) et anti-œstrogène (Covas et al., 2006).

IV.3.4. Prévention du vieillissement

Les régimes alimentaires riches en huile d'olive pourraient contribuer à prévenir la perte de mémoire et le déclin des fonctions intellectuelles chez les personnes âgées saines. Une étude réalisée sur des personnes âgées ayant adopté un régime alimentaire riche en acides gras mono-insaturés, présents en particulier dans l'huile d'olive, a montré que ces personnes présentent une diminution du risque de déclin cognitif lié à l'âge. Le mécanisme d'action d'apports élevés d'acides gras mono-insaturés dans la prévention du déclin cognitif n'est pas encore élucidé mais cela pourrait être lié au rôle des acides gras dans le maintien de la structure des membranes neuronales. Toutefois, cet effet n'est démontré que pour les acides gras oméga 3 dont l'huile est pauvre. Des études d'observation ont permis de vérifier que la quantité d'huile d'olive consommée était inversement liée à la détérioration cognitive due à l'âge, à la perte de mémoire, aux démences et à la maladie d'Alzheimer (Ghedira, 2008).

IV.3.5. Effet sur le système immunitaire

Il a été démontré que la consommation d'huile d'olive permettait de renforcer les défenses immunitaires face aux agressions externes causées par des micro-organismes (bactéries, virus). Des études menées récemment dans ce domaine ont permis de démontrer que les acides gras insaturés présents dans l'huile d'olive constituaient de bons agents de réduction de paramètres immunologiques aussi importants que la lymphoprolifération induite par des mitogènes spécifiques de cellules B et de cellules T (Ghedira, 2008).

D'autre part, il a été récemment établi que les secoiridoides (oleuropéine et ses dérivés) et l'hydroxytyrosol contenus dans l'olive et l'huile d'olive empêchent ou retardent le taux de croissance des bactéries, des virus, des champignons et de divers types de parasites (Ghedira, 2008).

IV.3.6. Ostéoporose

Des travaux expérimentaux chez le rat ont montré qu'un régime riche en acide oléique permettait une meilleure croissance osseuse que des régimes riches en saturés et même en polyinsaturés. D'autre part, dans une étude épidémiologique transversale évaluant la densité osseuse de femmes adultes vivant dans le midi de la France, il a été montré que seulement deux paramètres étaient associés à une bonne minéralisation osseuse : l'activité physique et la consommation régulière d'huile d'olive. (Visioli et al., 1998). Ce dernier augmente la minéralisation osseuse, elle favorise l'absorption du calcium et exerce un rôle important au moment de la croissance et dans la prévention de l'ostéoporose (Puel et al., 2004).

IV.3.7. Effet sur l'appareil digestif

Connues depuis l'Antiquité, les propriétés digestives de l'huile d'olive ont conduit à des utilisations nombreuses, notamment dans le traitement des troubles gastriques, constipation et la biliaires. Elle est en effet à la fois cholérétique (stimule la sécrétion hépatique de la bile) et cholécystokinétique (favorise l'évacuation de la vésicule biliaire).

La motricité gastrique est stimulée par les acides gras mono-insaturés et le temps de vidange gastrique est réduit, comparativement aux graisses saturées. (Soler-Rivas et al., 2000, Visioli et al., 1998).

Outre les effets de l'olive et de son huile, les feuilles de cet arbre ont également des effets préventifs vis-à-vis nombreuses maladies dont les plus importants sont l'effet hypoglycémiant, hypotensif, hypocholestérolémiant, antiseptique, antioxydant et spasmolytique (Soler-Rivas et al., 2000).

I. Matériel et Méthodes

I. 1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des fruits de trois variétés d'olivier (*Olea europaea* L.) les plus prédominants dans la région de Ngaous (wilaya de Batna) que sont les variétés Beskri, Chemlali et Farhi.

Ces échantillons ont été récoltés durant le mois de décembre 2009, qui correspond au stade de pleine maturation de l'olive où les fruits prennent la couleur noire ainsi qu'à la période de production de l'huile d'olive. Après la récolte, les échantillons sont stockés immédiatement au réfrigérateur.

I.1.2. Réactifs chimiques

Le méthanol, l'éthanol, le butylated hydroxytoluène (BHT), l'acide linoléique, le N-Succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, l'élastase pancréatique porcine (EPP), le sodium phosphate dibasique (Na₂HPO₄), le sodium phosphate monobasique (NaH₂PO₄), le polyoxyéthylènesorbitan monopalmitate (Tween 20), le chlorure de fer (FeCl₃), le potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆), l'oleuropéine, le tyrosol, le Tris (hydroxyméthyl) aminométhane (tris), le NaCl, tous ont été fournis par Sigma- Aldrich. Le trichlorure d'aluminium (AlCl₃), le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), le β-carotène, l'acide trichloracétique (TCA) ont été fournis par Fluka, l'hexane, le réactif de Folin-Ciocalteu ont été fournis par Prolabo, le carbonate de sodium, l'acide gallique, la rutine, le chloroforme, la vanilline, la catéchine, la quercétine, l'acétate d'éthyle ont été fournis par Fischer laboratory et l'acide acétique, le toluène, l'acide formique, et l'acide sulfurique ont été fournis de Biochem.

I.2. Méthodes

I.2.1. Préparation d'échantillons

Au préalable, les olives endommagées ont été éliminées et seuls les fruits sains et bien matures, non infectés et n'ayant subi aucun dommage physique auxquels on aura pris le soin de bien les nettoyer sont utilisés. Afin de déterminer les caractères et les différences pomologiques entre les olives, nous n'avons employé qu'une quantité de chaque variété. Les autres olives ont été dénoyautées et la pulpe séchée dans une étuve à 40 °C durant quelques jours pour l'extraction. Les tissus végétaux séchés ont été ensuite réduits en fine poudre de couleur noirâtre grâce à un broyeur pour faciliter l'extraction puis conservés dans des bouteilles propres au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation. (Figure 11).

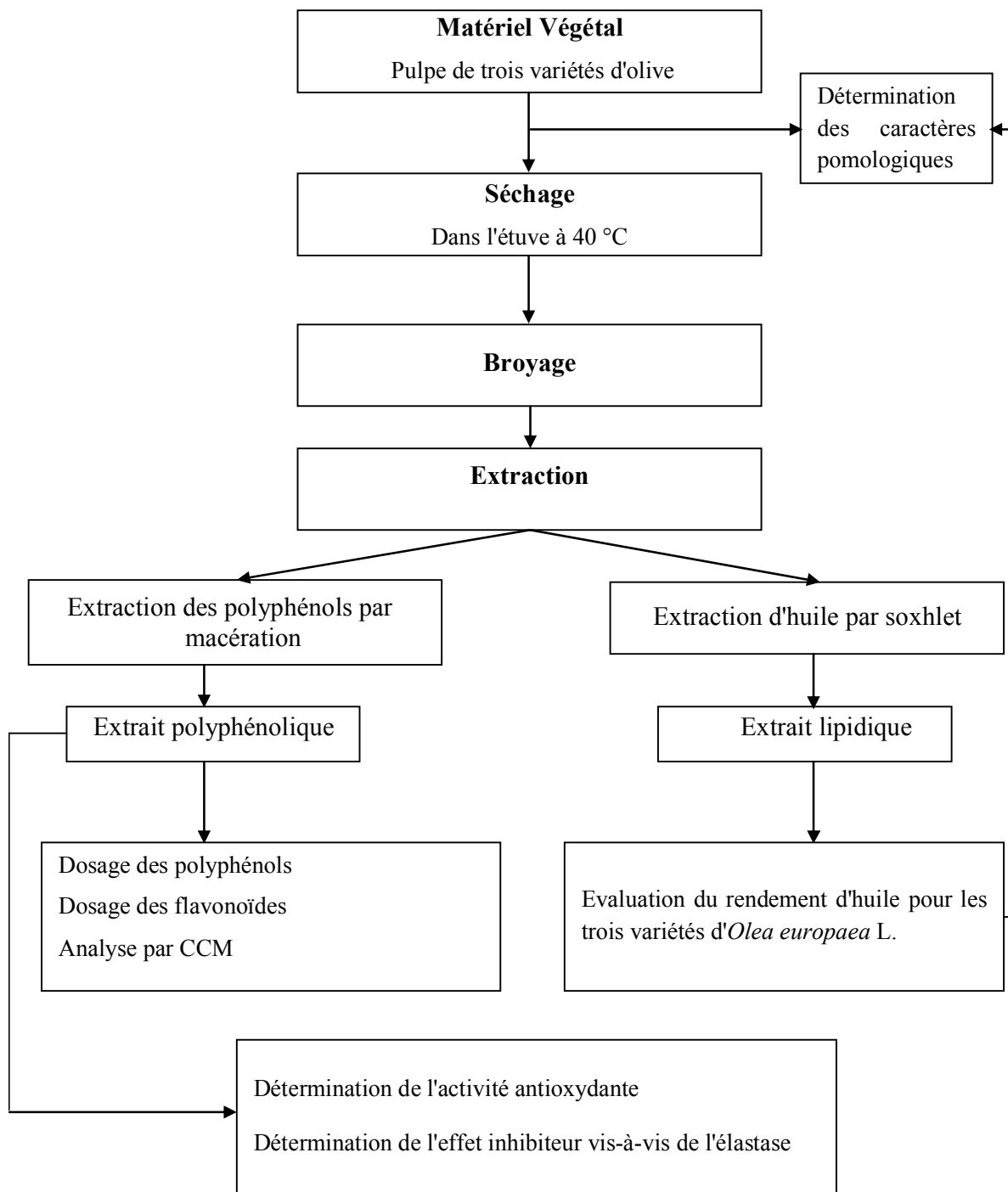


Figure 11: Représentation schématique des étapes de l'étude réalisée

I.2.2. Détermination des caractères pomologiques

La détermination des caractères pomologiques des trois variétés d'olives étudiées a été faite à partir de deux échantillons aléatoires homogènes constitués de cinquante fruits. Dans un premier temps ils ont été pesés afin de déterminer le poids frais moyen et d'évaluer poids des pulpes et des noyaux des fruits dénoyautés pour estimer ensuite le rapport pulpe/noyau. Les pulpes sont séchées dans une étuve à une température de 105°C durant 42 heures, puis elles sont de nouveau pesées afin de déterminer le poids sec et donc son humidité.

I.2.3. Extraction d'huile

L'extraction et la détermination de la teneur en huile des trois variétés a été réalisée par la méthode de Soxhlet. Selon plusieurs auteurs (Virot et al., 2008; Jadhav et al., 2009), et avec certaines modifications, on a préalablement placé 20 g de poudre d'olive dans la cartouche de cellulose. L'extraction de l'huile a été réalisée avec 200 ml de n-Hexane durant 4 heures, jusqu'à ce que le solvant d'extraction devienne clair, c'est-à-dire sans aucune proportion significative de soluté (Figure.8).



Figure 12: Système d'extraction au Soxhlet

Une fois l'extraction terminée le n-Hexane est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 40 °C puis la matière grasse est pesée. Le rendement d'extraction est estimé selon la formule suivante:

$$\text{Teneur en huile} = \frac{\text{Masse de l'extrait} \times 100\%}{\text{Masse de la prise d'essai (matériel végétale)}}$$

I.2.4. Extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols contenus dans la pulpe d'olive a été effectuée selon la méthode décrite par Gómez-Rico et ses collaborateurs (2008) avec certaines modifications. Brièvement, 25g de poudre d'échantillon est macéré dans 250 ml de MeOH (80%) sous agitation durant toute une nuit à température ambiante. Après filtration de l'extrait hydro-méthanolique sur verre fritté (N°3), on procède à une deuxième extraction sur le résidu avec 250 ml de MeOH (50%) durant 6 heures dans les mêmes conditions. Les deux extraits hydro-méthanoliques sont ensuite combinés et évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 40°C pour éliminer le méthanol et ne récupérer que la phase aqueuse. Les phases aqueuses récupérées pour chaque variété, sont ensuite lavées deux fois avec un demi-volume d'hexane dans une ampoule à décanter, ceci afin d'éliminer les lipides et les pigments. Les traces d'hexane sont ensuite éliminées par un évaporateur à 40 °C. Finalement, les extraits délipidés sont soumis à une microfiltration (Ø 0.22 µm) pour éliminer toute intervention de petites particules et de microorganismes durant l'analyse. Les filtrats obtenus sont ainsi conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

I.2.5. Caractérisation des extraits

I.2.5.1. Caractérisation Quantitative

I.2.5.1.1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols a été effectué selon la méthode adaptée par *Singleton et Ross* en 1965 avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungestique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit dans un milieu alcalin, lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

Le contenu en polyphénols dans les extraits préparés a été estimé selon la méthode du réactif Folin-Ciocalteu (Li et al., 2007), en mélangeant 200 µl d'extrait dilué avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1/10 dans de l'eau distillée. Après 4 minutes, 800 µl de

carbonate de sodium saturé (75g/l) sont ajoutés. Puis après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765 nm.

Une gamme d'étalonnage est établie dans les mêmes conditions, en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0-250 µg/ml). Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 100 g de pulpe sèche (mg EAG/100g).

I.2.5.1.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination quantitative des flavonoïdes dans les mêmes extraits est effectuée selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (Djeridane et al., 2006). A 1 ml d'extrait dilué dans le méthanol est ajouté 1 ml de trichlorure d'aluminium (2%) préparé aussi dans le méthanol. Après 10 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 430 nm.

Une gamme d'étalonnage est établie dans les mêmes conditions, en utilisant différentes concentrations de la rutine préparées dans le méthanol (0-10 µg/ml). Les résultats de dosage sont exprimés en mg d'équivalent de rutine par 100 g de pulpe sèche (mg ER/100g).

I.2.5.2. Caractérisation qualitative par CCM

La chromatographie est une méthode permettant de séparer les constituants d'un mélange et éventuellement de les identifier. Le mélange à étudier ainsi que les substances de référence sont déposées sur un support appelé *phase stationnaire* (dans le cas d'une chromatographie sur couche mince, il s'agit d'un gel de silice déposé en couche sur une plaque d'aluminium). Les dépôts sont entraînés par un solvant approprié (phase mobile ou *éluant*) qui migre par capillarité sur la plaque. *Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle, chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins absorbé par la phase stationnaire.*

L'analyse par CCM des extraits aqueux de la variété Chemlali, Farhi et Beskri est réalisée en phase normale sur des plaques préparées par l'étalage d'une suspension de gel de silice sur des plaques en verre (20x20cm) d'une épaisseur de 0.25µm. les plaques sont ensuite séchées préalablement à l'air libre puis activées dans l'étuve à 110 °C durant 10 minutes. 5µl de chaque extrait concentré 10 fois et des divers témoins utilisés (vanilline, catéchine, quercétine, rutine, oleuropéine et tyrosol) sont déposés et séchés sur la plaque activée. Le développement des plaques est effectué immédiatement dans une cuve en verre préalablement saturée avec

l'éluant ou phase mobile de choix. (CH₃Cl/ACoETH/AC.Acétique, 50/40/10, v/v/v) (Wagner et al., 1983) et (Tol/ACoETH/A.Formique, 50/50/10, v/v/v) (Scott et al., 1974)

La localisation des taches ou spots développées est effectuée par pulvérisation d'un réactif révélateur approprié tel que le réactif à la vanilline sulfurique (0.25g de vanilline, 5 ml d'acide sulfurique et complété jusqu'à 25ml par l'éthanol) et les vapeurs d'iode (la plaque de chromatographie est introduite dans une cuve contenant des cristaux d'iode).

Les rapports frontaux (Rf) sont calculés et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits.

I.2.6. Activités biologiques des extraits

I.2.6.1. Activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits polyphénoliques préparés a été réalisée par trois tests complémentaires :

- le test de scavenger du radical DPPH qui est un test en absence du substrat oxydable.
- le test de blanchissement de β - carotène et le test de potentiel réducteur, deux tests en présence du substrat oxydable

I.2.6.1.1. Effet scavenger du radical DPPH

Le test de DPPH est le test le plus fréquemment rencontré dans la littérature pour déterminer l'activité anti-oxydante d'un composé et notamment anti-radicalaire de différents extraits végétaux.

Ce test est basé sur le pouvoir des composés dits "anti-oxydants" présentés dans les extraits à neutraliser ou à réduire le radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) de couleur initialement violette qui absorbe à 517 nm à un composé réduit (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazone) de couleur jaune qui n'absorbe plus à cette longueur d'onde, ce qui se traduit ensuite par une diminution de l'absorbance (Roberto, 2008).

L'activité scavenger du radical de DPPH des extraits aqueux a été effectuée selon la méthode décrite par Atoui et ses collaborateurs (2005), avec certaines modifications. Brièvement; 50 μ l des extraits à différentes concentrations, de certains de leurs composés (oleuropéine, et tyrosol), de BHT (standard) et de méthanol (contrôle négatif) sont ajoutés à 1950 μ l de DPPH (6.10^{-5} M) préparé dans le méthanol. Le mélange est ensuite vortexé puis incubé durant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance de milieu réactionnel est ensuite mesurée à 517 nm contre un blanc (MeOH).

L'activité anti-radicalaire (AA%) est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH en utilisant l'équation suivante :

$$AA\% = [A_0 - A_e / A_0] \times 100$$

A_0 : Absorbance de la solution DPPH[•] initiale en absence des extraits

A_e : Absorbance de la solution DPPH[•] en présence des extraits.

Afin d'éliminer l'absorbance des différents constituants dans le milieu réactionnel, un blanc sans DPPH[•] a été préparé pour chaque concentration. Ainsi donc dans l'équation précédente le terme « A_e » est substitué par le terme « $A_e - A_b$ ».

1.2.6.1.2. Test de blanchissement du β -carotène

Cette technique a initialement été développée par Marco (1968), puis légèrement modifiée par Miller (1971). C'est une méthode sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. Elle présente également avec le test de DPPH l'avantage de pouvoir être couplée à la chromatographie sur couche mince (Pratt et Miller, 1984).

Dans ce test, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition des composés organiques volatiles et le diène hydroxyperoxyde conjugués, produits de l'oxydation de l'acide linoléique (réaction en chaîne) qui causent la dégradation et donc la décoloration du β -carotène.

Ce test a été effectué selon Dapkevicius et ses collaborateurs (1998) avec certaines modifications. Une solution de β -carotène/acide linoléique a été préparée par la solubilisation de 0.5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme. 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 20 sont ensuite ajoutés, le chloroforme est complètement évaporé par le rotavapeur à 40 °C, puis 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont additionnés avec agitation vigoureuse. Cette émulsion est préparée fraîche et doit être utilisée immédiatement. 250 μ l d'émulsion préparée sont distribués dans des tubes à essai puis 350 μ l des extraits, des composés (Tyrosol et Oleuropéine) et de BHT (référence) préparés à 2g/l dans le méthanol sont ajoutés. Pour le contrôle négatif, l'extrait est remplacé par 350 μ l de méthanol. Les tubes sont par la suite placés dans un bain marie à 50 °C.

L'absorbance des différents tubes est mesurée à 490 nm au temps zéro en utilisant une émulsion sans β -carotène comme un blanc, puis la cinétique de décoloration de l'émulsion est suivie par la mesure de l'absorbance durant 120 min à des intervalles de 20 min.

La capacité antioxydante des extraits et des polyphénols (tyrosol et oleuropéine) est comparée à celle de BHT et du contrôle négatif.

Le pourcentage de l'activité antioxydante (A%) est calculée selon l'équation suivante :

$$A\% = (A_0 / A_{120}) \times 100$$

Où A_0 et A_{120} représentent l'absorbance au temps zéro et après 120 minutes respectivement (Tous les tests sont réalisés en duplicata).

I.2.6.1.3. Test du potentiel réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits polyphénoliques d'olive est déterminé par la méthode décrite par Prasad et ses collaborateurs (2009) avec certaines modifications. 50 μ l des extraits à différentes concentrations, de l'oleuropéine, du tyrosol ou de BHT (référence) sont mélangés avec 1,25 ml de tampons de phosphate de sodium (0.2M, pH=6.6) et 1.25 ml de potassium ferricyanide $[K_3Fe(CN)_6]$ (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min, puis après l'incubation 1.25 ml d'acide trichloracétique (10%) a été ajouté avant la centrifugation du mélange à 3000 rpm pendant 10 min. 1.25 de surnageant est ensuite mélangé avec 1.25 d'eau distillée et 0.25 ml de $FeCl_3$ (0.1%). L'absorbance de couleur vert foncée est mesurée à 700 nm.

L'absorbance la plus élevée indique le pouvoir réducteur le plus élevé et ce dernier est exprimé par la valeur d' EC_{50} (mg/ml), qui correspond à la concentration effective qui donne une absorbance de 0,5.

I.2.6.2. Evaluation de l'effet inhibiteur vis-à-vis de l'élastase

L'effet inhibiteur de l'extrait polyphénolique pour les trois variétés d'olive vis-à-vis de l'élastase a été déterminé selon la méthode de La Barre et ses collaborateurs (1996), avec certaines modifications. Ce test a été effectué dans un tampon Tris-HCl (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, pH= 8) dans des microplaques de 96 puits. A 95 μ l des extraits préparés à différentes concentrations, des composés testés (Oleuropéine, Tyrosol), ou d' α_1 -antitrypsine (contrôle positif) sont ajoutés à 95 μ l de l'élastase pancréatique porcine (EPP) (105,26 nM) puis incubés avec durant 20 minutes à 25°C. la réaction de la catalyse enzymatique est alors déclenchée en

ajoutant 10 µl de substrat (N- Succinyle- (Ala)₃- p- nitroanilide) (18 mM) préparé dans le même tampon. Après incubation durant 20 min à 25 °C, l'absorbance est déterminée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Tous les essais sont réalisés en duplicata).

Les concentrations finales dans le milieu réactionnel de l'enzyme (PPE) et de substrat sont 50 nM et 0,9 mM respectivement.

L'activité inhibitrice (AI%) vis-à-vis de l'élastase est exprimée en pourcentage d'inhibition en utilisant l'équation suivante :

$$AI\% = [(Abs_o - Abs_e) / Abs_o] \times 100$$

Abs_o: Absorbance de milieu (p- nitroaniline) en absence des extraits

Abs_e : Absorbance de milieu (p- nitroaniline) en présence des extraits.

I.2.7. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD à partir de deux essais parallèles et indépendants. La comparaison des moyennes est faite par le test d'ANOVA à un facteur (variété d'olive). La différence significative entre les moyennes a été déterminée par le test de Fisher (test de LSD) à l'aide du logiciel SPSS 8.0 pour Windows. Les valeurs d'IC₅₀ et EC₅₀ sont calculées par régression linéaire. Toutes les valeurs sont statistiquement considérées significatives au seuil de 0.05 (P<0.05).

II. Résultats et discussion

II.1. Caractérisation pomologique des variétés d'olive

La caractérisation pomologique de l'olive est un critère de très grande importance pour l'identification et la sélection des variétés (variétés d'olives à huile ou variétés d'olives de table).

Les caractères pomologiques des olives montrent une variation entre les trois cultivars étudiés (Tableau 4).

Tableau 4: Caractères pomologiques de l'olive de trois variétés étudiées

Cultivar	Poids du fruit (g)	Poids de pulpe (g)	Pulpe/noyau ratio	Humidité de pulpe (%)	Contenu d'huile (% p.s) ^b
Beskri	2.38 ^a ± 0.10	1.65 ^a ± 0.04	2.63 ^a ± 0.03	40.28 ^a ± 1.75	45.25 ^c ± 1.76
Chemlali	0.58 ^a ± 0.00	0.35 ^a ± 0.00	1.78 ^a ± 0.02	47.30 ^a ± 0.23	65.25 ^c ± 0.35
Farhi	1.92 ^a ± 0.04	1.38 ^a ± 0.01	3.10 ^a ± 0.09	50.21 ^a ± 1.75	53.25 ^c ± 0.35

^a La moyenne de 50 fruits d'olives ± SD

^b pourcentage d'huile par rapport au poids sec de pulpe

^c la moyenne de deux mesures ± SD

Selon les résultats montrés sur le tableau 4, l'olive de la variété Beskri présente le poids du fruit moyen le plus élevé (2.38 g), suivie par l'olive de Farhi (1.92 g). Toutefois, l'olive de la variété Chemlali est plus petite et présente un poids moyen de 0.58g, similaire à la variété Chemlali tunisienne qui se caractérise par un poids frais moyen de moins de 1g (0.89g) (Hannachi et al., 2007) mais légèrement supérieur.

Le fruit de la variété Beskri semble être la plus riche en pulpe, présentant un poids de pulpe égal à 1.65g suivie de près par l'olive de la variété Farhi (1.38g) alors que le fruit de la variété Chemlali est le moins charnu avec un poids égal à 0.35g.

Considérant le poids frais moyen, trois catégories de variétés se distinguent, le premier est représenté par le cultivar ayant des fruits de grosseur moyenne (poids frais moyen supérieur ou égal à 2g) que constitue la variété Beskri, la seconde catégorie est représentée par la variété Farhi avec un poids frais de moins de 2g et plus de 1g, puis vient la variété Chemlali qui représente la troisième catégorie avec un petit poids frais inférieur ou égal à 1g.

Le rapport pulpe/noyau est très important pour évaluer la description de masse entre la pulpe et le noyau. Bien que la variété Beskri ait un poids frais plus élevé (2.38g) que la variété Farhi

(1.92g), cette dernière a le rapport pulpe/noyau le plus élevé (3.10) ce qui indique qu'elle possède la masse de pulpe la plus élevée.

En effet, la grosseur du fruit et la proportion de pulpe sont deux caractéristiques recherchées aussi bien pour les variétés d'olive de table que pour les variétés à huile. Les trois variétés ont des fruits relativement petits à moyens d'où leur utilisation dans la région de récolte (Ngaous) comme des variétés à huile.

La description pomologique des fruits montre déjà des différences entre les variétés étudiées, ne serait que ce que du point de vue pondéral. L'estimation du produit fondamental de ces fruits, l'huile, constitue un critère important à prendre en considération lors d'une sélection variétale.

Des études ont montré que la teneur en huile des fruits est très influencée par l'humidité de la pulpe au moment de la récolte du fruit (Sanchez et al., 1999). Ainsi par rapport à la matière sèche et fraîche qui est toujours basse au dernier cas pour la même variété (Hannachi et al., 2007). Pour éliminer l'influence de ce facteur, il est très juste d'évaluer la teneur en huile vis à vis de la matière sèche.

D'après tous et Romero, cité par Sanchez et al (1999), les variétés d'olive peuvent être classées selon le rendement en huile par rapport à la matière sèche en variétés à rendement élevé (>46%), à rendement moyen (de 38 à 46%), et à rendement faible (<38%).

Le rendement en huile obtenue, exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche pour les trois variétés est caractérisé par une couleur jaune verte dont l'intensité diffère d'une variété à l'autre et varié entre 45.25%, 53.25%, et 65.25% pour les variétés Beskri, Farhi, et Chemlali, respectivement.

Selon la classification de tous et Romero, on peut dire que les deux variétés Chemlali et Farhi ont une teneur élevée en huile où plus de la moitié de la matière sèche est de l'huile tandis que la variété Beskri en possède une teneur moyenne.

Des résultats obtenus, il apparaît que les caractères pomologiques sont étroitement liés au cultivar, comme il a été observé pour des variétés d'origines, grecque (Boskou et al., 2006 b), et tunisienne (Hannachi et al., 2007; Mehri et Hellali, 1995). Hannachi et al (2007) ont trouvé qu'outre la variation inter-variétale, il y a des variations intra-variétales (facteur géographique), ce qui peut expliquer aussi ces différences. En effet, pour une même variété d'olive (Chemlali) cultivée dans deux zones ou régions différentes (Algérie et Tunisie),

possèdent un rendement en huile (extraite par la même méthode) de 65.25% et de 38 à 46%, respectivement. Cette expression différente de ce caractère est liée avec le facteur environnemental.

L'étude pomologique des individus de trois cultivars et leur comparaison avec d'autres cultivars d'autres d'origines montre que les caractères relatifs au fruit sont variables. La plasticité d'un caractère peut être expliquée au moins par deux facteurs principaux (génétique, et environnement). Chaque individu dans son milieu exprime différemment ses potentialités génétiques, ce qui se traduit par une importante variabilité intra-variétale (Hannachi et al., 2007).

L'étude des variations dans différentes régions pourrait être utilisée pour améliorer le standard des caractères technologiques d'un cultivar, en choisissant le milieu le plus adéquat surtout pour leur rendement en huile, produit fondamental du fruit de l'olivier.

II.2. Caractérisation quantitative et qualitative des extraits

II.2.1. Caractérisation quantitative

II.2.1.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les polyphénols en général et les flavonoïdes en particulier, sont des composés extrêmement actifs biologiquement, ce sont des antioxydants par excellence, ils possèdent également plus d'une activité préventive et thérapeutique. Ils sont trouvés dans le règne végétal, dont leur nature et leur teneur sont très variables. Pour ces raisons, on a choisi d'extraire et de doser ces deux composés pour les trois variétés d'*Olea europaea* L. étudiées.

L'extrait des polyphénols de la pulpe d'olive des trois variétés étudiées a été obtenu par macération sous agitation de la poudre sèche de la pulpe dans le mélange méthanol/eau. L'utilisation de ce mélange hydro-alcoolique a pour but d'extraire les composés polaires ainsi que les composés de moyenne et de faible polarité. L'aptitude du méthanol d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires facilite l'extraction d'un plus grand nombre de composés. L'utilisation du méthanol permet également de prévenir la croissance microbienne au cours de la macération (Seidel, 2005). De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante, et à 40°C pendant l'évaporation des solvants permet de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues à des températures élevées.

Le dosage des polyphénols dans ces extraits a été réalisé ensuite par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li et al., 2007) à l'aide d'une gamme d'étalonnage établie avec différentes concentrations d'acide gallique (Figure 13). Les résultats obtenus sont exprimés en

milligrammes équivalent d'acide gallique par 100 g de matière sèche (mg EAG/100 g). Ici, le choix du polyphénol témoin pour la calibration a son importance. L'acide gallique, possédant un nombre moyen de fonctions phénols est un bon compromis mais certains contenus sont forcément sous évalués par rapport à d'autres (Boizot et Charpentier, 2006).

Le contenu en flavonoïdes est également estimé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (Djeridane et al., 2006) en utilisant la rutine pour établir la gamme d'étalonnage (Figure 14). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent de rutine par 100 g de matière sèche (mg ER/100g).

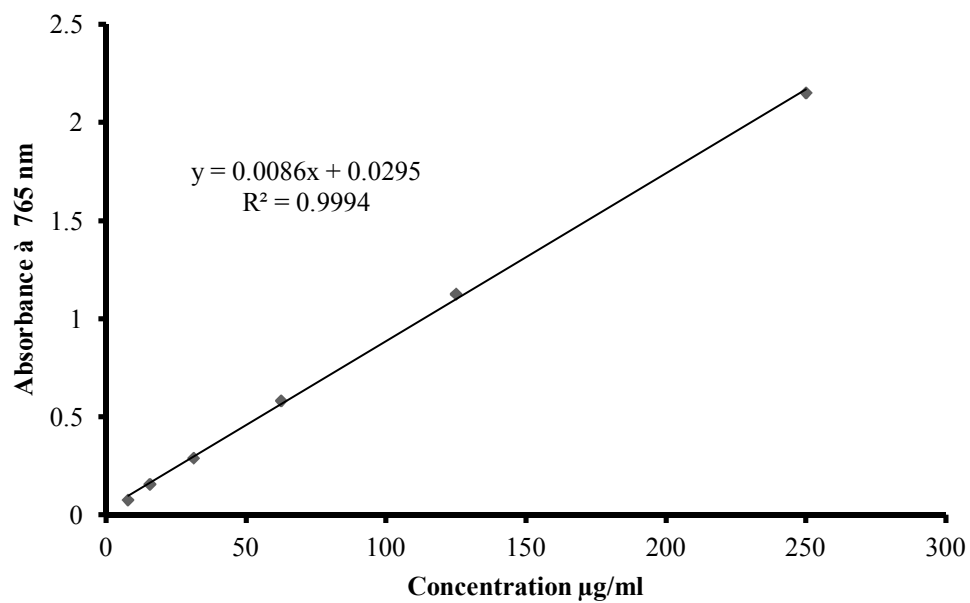


Figure 13: Droite d'étalonnage d'acide gallique (moyenne de deux essais \pm SD)

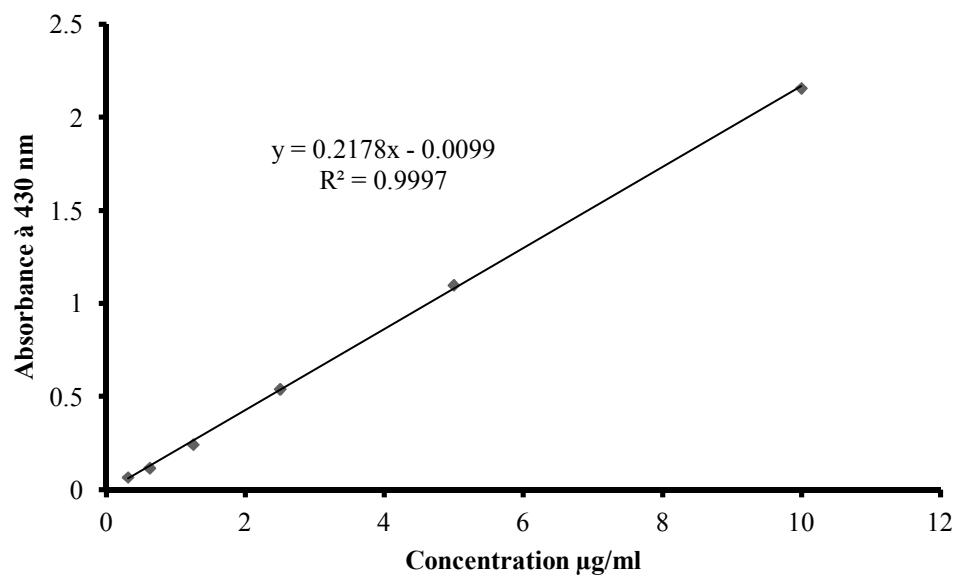


Figure 14: Droite d'étalonnage de rutine (moyenne de deux essais \pm SD)

La teneur en polyphénols et en flavonoïdes ainsi que le pourcentage des flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5: Contenu en composés phénoliques et en flavonoïdes pour les trois extraits

Cultivar	polyphénols ^a	flavonoïdes ^b	% des flavonoïdes ^c
Beskri	2931.86 ^d ± 46.04	29.62 ^d ± 1.68	1.01
Chemlali	1919.29 ^d ± 4.59	30.62 ^d ± 0.95	1.59
Farhi	2664.88 ^d ± 13.81	35.47 ^d ± 0.72	1.33

^a mg d'équivalent d'acide gallique par 100 g de pulpe sèche (mg EAG/100 g)

^b mg d'équivalent de rutine par 100 g de pulpe sèche (mg ER/100g)

^c pourcentage des flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux

^d la moyenne de deux essais ± SD

A la lumière de ces résultats, il ressort que des différences interspécifiques significatives ($p < 0.05$) des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes sont observées pour les trois variétés. En effet, les variétés Beskri et Farhi possèdent les teneurs les plus élevées en polyphénols de l'ordre de 2931.86 ± 46.04 mg EAG/100 g et 2664.88 ± 13.81 mg EAG/100 g, respectivement. Au regard de la variété Chemlali dont la teneur n'est que 1919.29 ± 4.59 mg EAG/100 g seulement.

Concernant, les teneurs en flavonoïdes, déterminées par la méthode de trichlorure d'aluminium, il apparait que la variété Farhi possède un taux légèrement supérieur (35.47 ± 0.72 mg ER/100 g) à ceux des deux d'autres variétés (Beskri et Chemlali) dont les taux sont 30.62 ± 0.95 mg ER/100 g et 29.62 ± 1.68 mg ER/100 g. La comparaison des rapports de taux des flavonoïdes par rapport à la teneur en polyphénols (% de flavonoïdes), fait ressortir que la variété Chemlali est la plus riche en flavonoïdes avec un rapport de 1.59, qui n'est que 1.33 et 1.01 pour les variétés Farhi et Beskri, respectivement.

Bien que ces variétés ne contiennent pas des taux élevés en flavonoïdes par rapport à leurs teneurs en polyphénols néanmoins cela peut s'expliquer en partie par la prépondérance des polyphénols non flavonoïdiques tels que l'hydroxytyrosol (50%-70%) qui est le principal polyphénol de l'extrait de pulpe d'olive, l'oleuropéine (5-10%), et le tyrosol (0.3%) et (Soni , 2006).

D'ailleurs, la variation en composés polyphénoliques et en flavonoïdes des trois variétés qui sont de la même région peut être due à la différence génétique entre eux.

La synthèse des différents résultats des teneurs en polyphénols et flavonoïdes obtenus montre que la variation des teneurs en polyphénols pour les trois variétés étudiées ne s'accompagne pas de la même variation en flavonoïdes, c'est à dire qu'il n'existe aucune corrélation entre ces deux teneurs ($R^2 = 0.011$). Les trois variétés étudiées manifestent un

profil quantitatif riche en polyphénols, qui est de loin très supérieur particulièrement, pour les variétés Beskri (2931.86 ± 46.04 mg EAG/100 g) et Farhi (2664.88 ± 13.81 mg EAG/100 g) par rapport à la variété Chétoui tunisienne (1760 mg GA/100 g poids sec), une variété chinoise (1291 mg EAG /100 g poids frais), et des variétés d'Espagne (118 à 82 g d'acide caffeic/kg poids sec) (Ben Othman et al., 2009; He et Xia, 2007; Morello et al., 2005). Cette variation inter-variétale est un caractère spécifique pour chaque individu qui est dépendante du cultivar et de plusieurs autres facteurs tels que le régime d'irrigation, le degré de maturation des drupes et le climat (zone géographique) (Larrauri et al., 1996; Patumi et al., 2002; Ryan et al., 1999; Romani, et al., 1999).

Ainsi et malgré que l'olive (fruits de l'olivier) constitue une source de polyphénols très importante, cependant, la majorité de ces composés seront éliminés durant les divers traitements pour la préparation des olives de table ou la préparation d'huile.

En effet, il a été démontré que la teneur en polyphénols pour des olives de table grecque n'était que 82-171 mg EAC /100 g de pulpe (Boskou et al., 2006 b), ce qui est une teneur très basse en les comparant avec celles obtenues pour nos variétés brutes, qui était entre 2900 et 1900 mg EAG/100 g de pulpe sèche. Par ailleurs, il a été rapporté que la saumure de traitement des olives brutes contenait 32 à 51% des polyphénols totaux (Ben Othman et al., 2009). En fin, il a été établie que l'huile d'olive ne contenait que 2% seulement des polyphénols totaux et que la quasi-majorité (98%) de ces composés sont retrouvés dans l'eau résiduaire et les grignons d'olive (masse solide) (DeJong et Lanari, 2009).

II.2. Caractérisation qualitative

La CCM est une méthode physico-chimique d'analyse qui permet de séparer les différents constituants d'un extrait. De plus, son emploi est simple et son coût modeste et elle présente aussi de nombreux avantages tels que:

- la préparation des échantillons est habituellement relativement simple.
- la comparaison des échantillons peut se faire directement.
- plusieurs modes de détection peuvent être utilisés simultanément, souvent sur la même plaque.
- la séparation peut être suivie durant tout son déroulement et arrêtée à tout moment ou lors d'un changement de système de solvants.
- les volumes de solvants et d'autres réactifs sont très faibles.

Pour cela, la CCM constitue un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés (Mendham, 2006). De ce

contexte, un CCM a été menée sur les divers extraits préparés afin d'avoir un aperçu général sur la composition et la nature des polyphénols des trois variétés d'olives étudiées.

A la lumière des profils chromatographiques obtenus (figures 15 et 16).

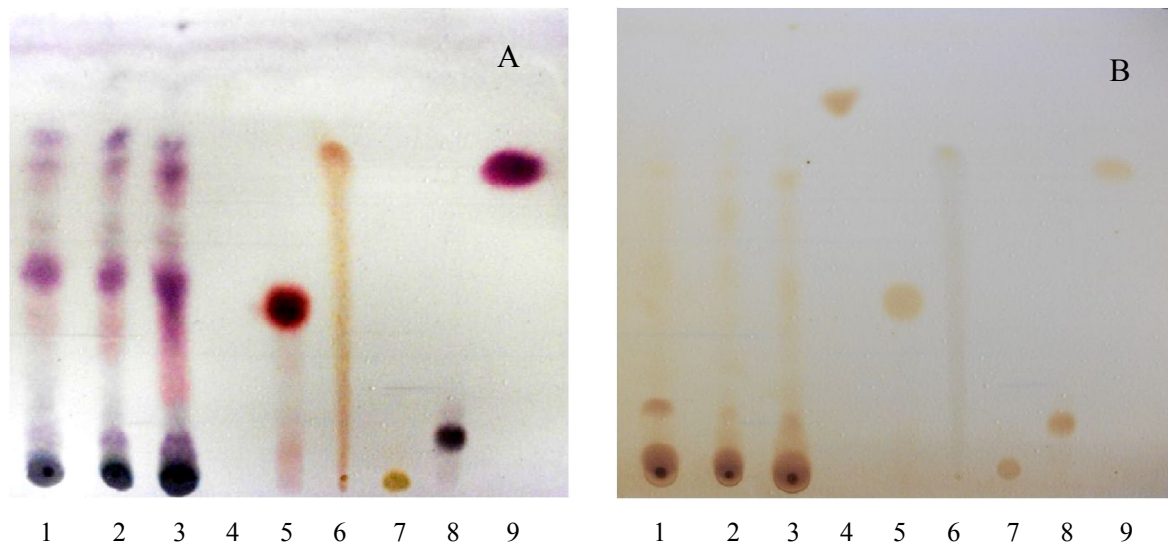


Figure 15: Chromatographie sur couche mince de l'extrait polyphénolique de trois variétés d'olive sur gel de silice dans système de développement $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{AcOH}$ (CEA), en utilisant la vanilline sulfurique (A) et la vapeur d'iode (B) comme révélateurs.

1; V.Chemlali, 2; V.Farhi, 3; V. Beskri, 4; Vanilline, 5; Catéchine, 6; Quercétrine, 7; Rutine, 8; Oleuropéine, 9; Tyrosol.

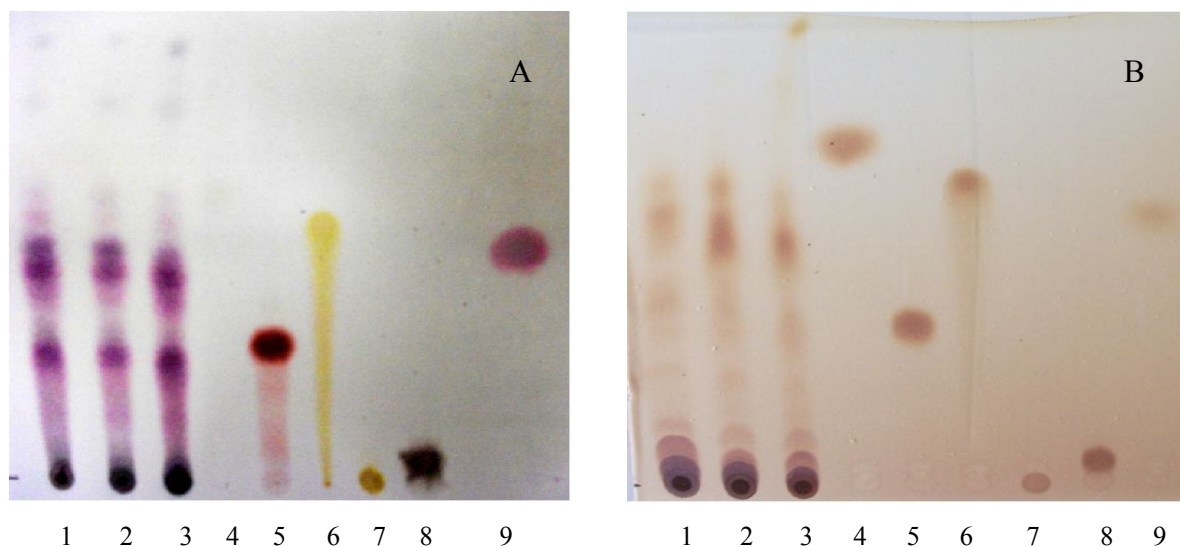


Figure 16: Chromatographie sur couche mince de l'extrait polyphénolique de trois variétés d'olive sur gel de silice dans système de développement $\text{Tol} / \text{AcOEt} / \text{HCOOH}$ (TEF), en utilisant la vanilline sulfurique (A) et la vapeur d'iode (B) comme révélateurs.

1; V.Chemlali, 2; V.Farhi, 3; V. Beskri, 4; Vanilline, 5; Catéchine, 6; Quercétrine, 7; Rutine, 8; Oleuropéine, 9; Tyrosol.

Les rapports frontaux (R_f) des spots issus de la séparation des extraits ainsi que ceux des témoins sont reportés dans les tableaux 6 et 7.

Tableau 6: R_f des spots des extraits et des témoins dans le système: CHCl₃ / AcOEt / AcOH (50/40/10, v/v/v)

Extraits/Témoins	Révélation			
	vanilline sulfurique		vapeur d'iode	
	R _f	visible	R _f	Visible
Extraits aqueux de: V.Chemlali, V.Farhi, V.Beskri	0.08	Gris	0.08	Jaune-marron
	0.35	Rouge clair	0.35	Jaune-marron
	0.43	Violet	0.43	Jaune-marron
	0.52	Marron clair	0.52	Jaune-marron
	0.60	Rose violet	0.60	Jaune-marron
	0.65	Rose	0.65	Jaune-marron
	0.70	Violet	0.70	Jaune- marron
Vanilline	/		0.80	Jaune-marron
Catéchine	0.36	Rouge	0.36	Jaune-marron
Quercétine	0.68	Jaune orange	0.68	Jaune-marron
Rutine	/	Jaune	/	Jaune-marron
Oleuropéine	0.08	Gris	0.08	Jaune- marron
Tyrosol	0.65	Rose foncé	0.65	Jaune- marron

Tableau 7: R_f des spots des extraits et des témoins dans le système: Tol / AcOEt / HCOOH (50/40/10, v/v/v)

Extraits/Témoins	Révélation			
	vanilline sulfurique		vapeur d'iode	
	R _f	visible	R _f	Visible
Extraits aqueux de: V.Chemlali, V.Farhi, V.Beskri	0.04	Gris	0.03	Jaune-marron
	0.23	Violet	0.23	Jaune-marron
	0.44	Rose	0.41	Jaune-marron
	0.46	Violet	0.46	Jaune-marron
	0.51	Rose clair	0.51	Jaune-marron
	/	/	0.56	Jaune-marron
	0.73	Bleu violet	0.73	Jaune-marron
	0.86	Bleu clair	0.86	Jaune- marron
Vanilline	/	/	0.56	Jaune-marron
Catéchine	0.27	Rouge	0.27	Jaune-marron
Quercétine	0.50	Jaune orange	0.50	Jaune-marron
Rutine	/	Jaune	/	Jaune-marron
Oleuropéine	0.04	Gris	0.04	Jaune-marron
Tyrosol	0.44	Rose foncé	0.44	Jaune-marron

A la lumière des résultats illustrés sur les chromatogrammes (Figure 15, et 16), on remarque dans un premier temps que les trois variétés apparaissent des tâches communes dont le nombre, la position et la coloration sont identiques, dans les deux systèmes de solvants utilisés.

Au visible et après développement dans le système CEA (Figure 15), et quelque soit le révélateur les trois extraits donnent sept spots de différentes couleurs, trois d'entre eux correspondent par leur R_f à ceux de l'oleuropéine (0.08), la Catéchine (0.36), et le Tyrosol, (0,65).

Le chromatogramme obtenu dans le système TEF permet d'observer outre les spots ayant apparus dans le système CEA, un spot correspondant à la vanilline (0.56) et deux spots de couleur bleue d'un R_f de 0.73 et 0,86 situés presque à la limite du front de solvant et dont la nature reste inconnue

Les deux polyphénols (tyrosol et oleuropéine) identifiés dans les trois extraits sont présents normalement dans les fruits de l'olivier, et constituent avec l'hydroxytyrosol les polyphénols les plus prédominants dans l'olive où l'oleuropéine représente entre 5-10 %, le tyrosol représente 0.3% des polyphénols d'extraits aqueux de la pulpe d'olive (Soni , 2006). Ils confèrent aux olives, particulièrement l'oleuropéine, plusieurs activités biologiques telles que l'activité antimicrobienne (Tuck et Hayball, 2002), l'activité antioxydante et la prévention de l'athérosclérose (Tripoli et al., 2005).

II.3. Activités biologiques des extraits

III.3.1. Activité antioxydante

A la lumière de la complexité chimique des extraits, souvent constitués d'un mélange d'une douzaine de composés avec des différences dans les groupements fonctionnels, la polarité et le comportement des produits chimiques, les résultats d'un seul test ne peuvent donner qu'une idée peu fiable des propriétés antioxydantes des extraits qui doivent être interprétés avec prudence. Par conséquent, une approche avec de multiples tests dans le travail de dépistage de ces activités est fortement recommandée (Sacchetti et al., 2005). Compte tenu de cela, l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits testés par rapport à celle du BHT a été évaluée par trois tests différents et complémentaires, le test de DPPH, le test de β -carotène/acide linoléique et le test de potentiel réducteur.

Bien que les tests de DPPH et de potentiel réducteur génèrent des radicaux libres qui sont étranglés au corps, le test de β - carotène est spécialement approprié à l'élimination des RLs *in*

vivo. Cependant le test de DPPH et de potentiel réducteur sont réalisés dans un milieu aqueux et le test de b-carotène est effectué dans une émulsion, ainsi on peut mesurer l'activité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles des extraits préparés en obtenant ainsi des informations complémentaires sur l'activité antioxydante des extraits.

II.3.1.1.Effet scavenger du radical DPPH

Le DPPH[•] (2,2- diphenyle- 1 -picryl hydrazyl) est un radical libre, stable, de couleur violette absorbe à 517 nm qui peut accepter un hydrogène donné par les antioxydants (AO-H) présentés dans les extraits à tester pour devenir une molécule diamagnétique stable (Soares et al., 1997). La réduction du DPPH[•] s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune qui n'absorbe plus à 517nm, ce qui permet de quantifier sa réduction par la diminution de l'absorbance à la même longueur d'onde (Figure18) (Chang et al., 2007).

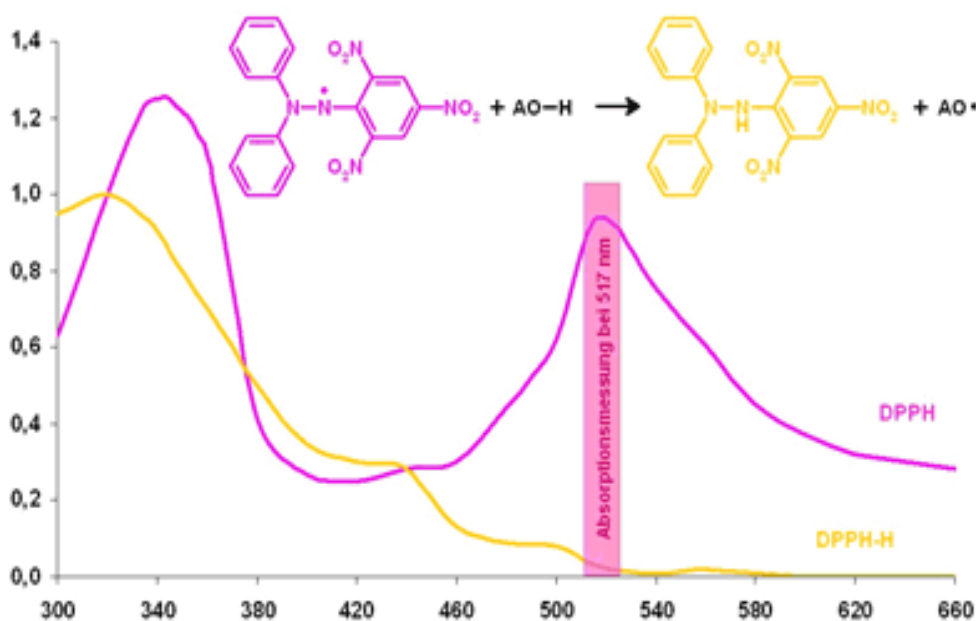


Figure 17: Réduction du radical DPPH[•] par un antioxydant AO-H

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux des trois variétés par ce test révèle que ces derniers possèdent un effet scavenger significatif ($p < 0.05$) dose-dépendant (Figure2) vis-à-vis du radical DPPH[•], quand la concentration des polyphénols augmente dans le milieu réactionnel, le pourcentage d'inhibition augmente proportionnellement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'inhibition presque totale du DPPH[•] présent dans le milieu réactionnel.

L'effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical DPPH[•] est exprimé par la concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀) qui correspond à la concentration des polyphénols

nécessaire pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH[•]. Une CI₅₀ faible représente l'activité anti-radicalaire la plus élevée (Molyneux, 2004). Tous les CI₅₀ sont calculés à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents composés à tester avec un coefficient de corrélation supérieur à 0.95 ($R^2 > 0.95$).

La Figure 19 représente les valeurs de CI₅₀ des extraits, des polyphénols (Oleuropéine et Tyrosol), et du BHT (utilisé comme référence).

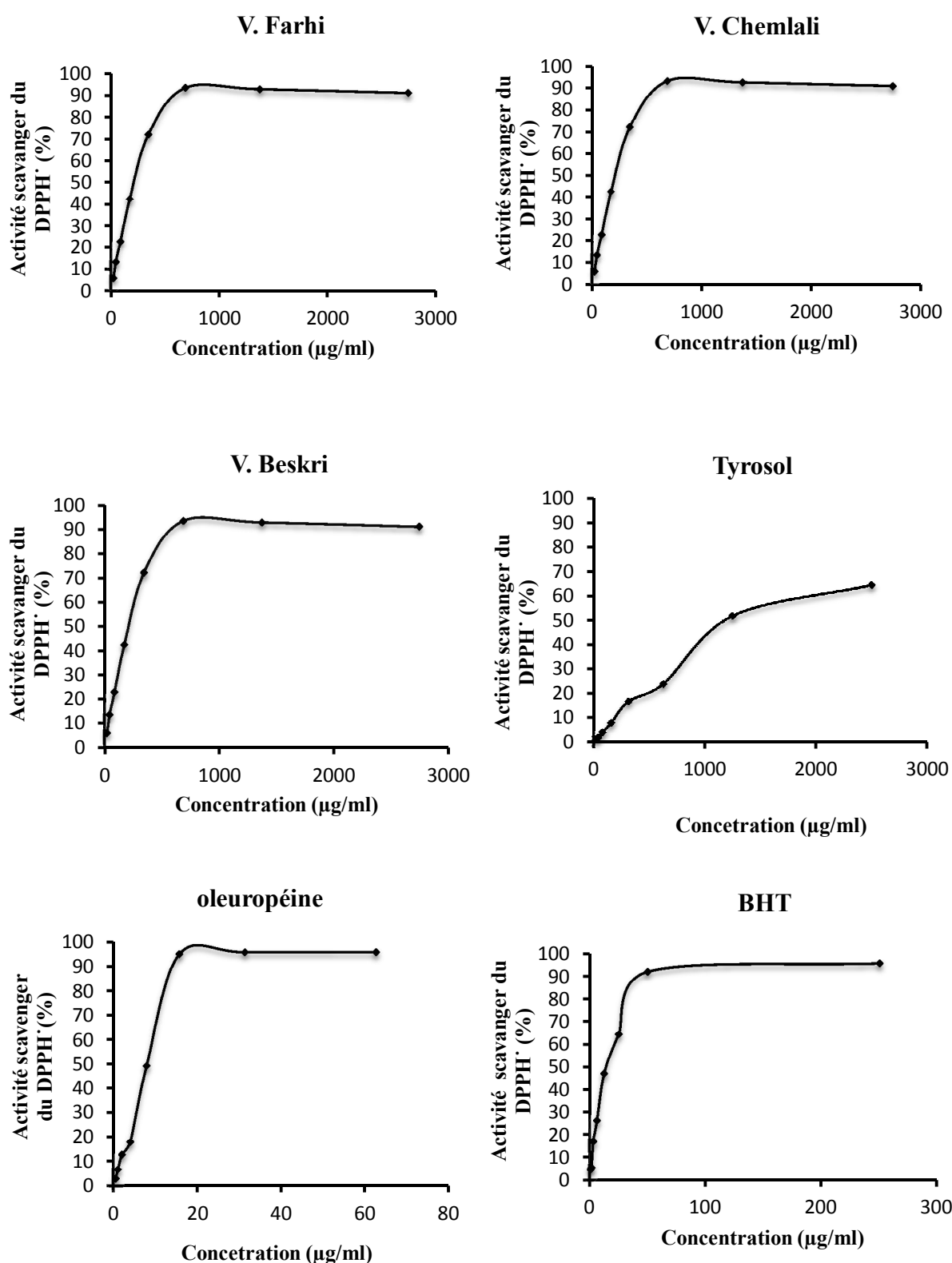


Figure 18: Activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux des variétés Chemlali, Farhi et Beskri, du standard (BHT), du Tyrosol et de l'oleuropéine (chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD).

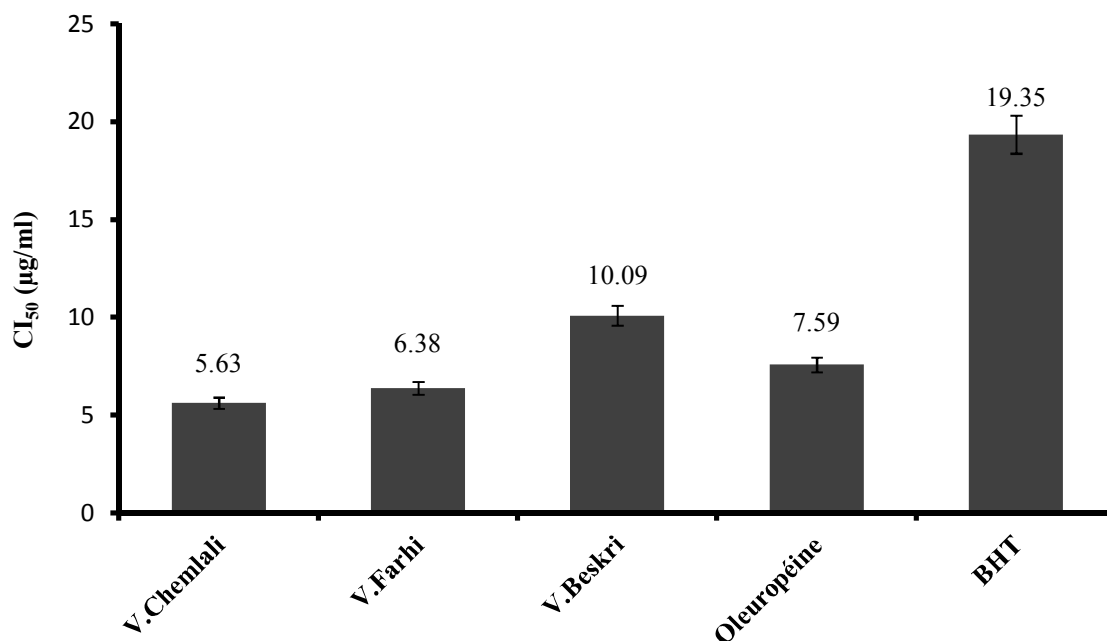


Figure 19: La CI₅₀ d'extraits aqueux des variétés Chemlali, Farhi, Beskri et de BHT, et d'oleuropéine (chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD).

Les résultats obtenus (Figure 20) montre que les trois variétés présentent un CI₅₀ significativement inférieurs ($p < 0.05$) à celle de l'antioxydant synthétique (BHT) (CI₅₀=19.35 \pm 1.138 μ g/ml) de l'ordre 5.63 \pm 0.098 μ g/ml, 6.38 \pm 0.070 μ g/ml, et 10.09 \pm 0.049 μ g/ml pour la variété Chemlali, Farhi, et Beskri, respectivement. Il apparait ainsi que les variétés Chemlali et Farhi présentent l'activité antioxydante la plus élevée, trois fois supérieure à celle du BHT. La variété Beskri est moins active, toutefois son pouvoir antioxydant est assez substantiel et presque deux fois supérieure à celui du BHT. Ces variations dans la capacité antioxydante des extraits polyphénoliques de ces trois variétés d'olive pourraient être dues à la présence de certains composés potentiellement actifs (polyphénols) tel que l'oleuropéine dont la CI₅₀ est très appréciable de l'ordre de 7.59 \pm 1.29 μ g/ml deux fois plus active au BHT. Le tyrosol autre polyphénol de l'olive, semble faiblement actif avec une CI₅₀ très élevée de l'ordre de 1201.8 \pm 64.31 μ g/ml. Ces résultats sont en conformité avec ceux obtenus par Pérez-Bonilla et al (2006) qui ont montré dans leurs travaux que l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine, et le tyrosol, trois polyphénols prépondérants dans l'olive, possèdent une activité antioxydante vis-à-vis du DPPH de l'ordre de 76.7%, 20.4%, et 3.7%, respectivement. Ainsi, l'activité antioxydante élevée de la V. Chemlali et la V. Farhi est probablement due en partie à la présence élevée des deux polyphénols (hydroxytyrosol et oleuropéine) alors que le faible effet anti-radicalaire du Tyrosol peut s'interpréter soit parce

que ce polyphénol est faiblement antioxydant, soit parce qu'il exerce son effet de façon synergétique avec d'autres polyphénols ou d'autres composés présents dans l'olive.

Très peu de travaux se sont intéressés à l'activité antioxydante des extraits de la pulpe d'olive brute par rapport aux sous produits consommables des olives (huile d'olive et olives de table) qui ont été largement étudiés. L'étude menée par Boskou et al (2006 b) montre clairement que les CI_{50} obtenus sur des olives de table Grecques sont très élevées de l'ordre de 30-587 $\mu\text{g/ml}$, cette diminution de l'activité anti-radicalaire est due principalement à la perte importante et à la dégradation de certains polyphénols lors de la fermentation des olives.

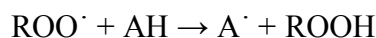
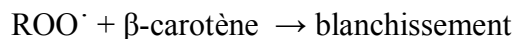
La détermination du degré de corrélation entre les CI_{50} et le contenu en polyphénols, en flavonoïdes et le rapport flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux a donné lieu à des coefficients de corrélation faibles pour les deux premiers critères de l'ordre de $R^2=0.65$, $R^2=0.2524$, respectivement, et un très bon coefficient de corrélation entre les CI_{50} et le taux de flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux ($R^2= 0.9091$) est obtenu.

Dans la littérature, de très grandes divergences sont notées concernant ce point. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre la CI_{50} et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, par contre à l'apposé d'autres études n'ont pas établie cette corrélation (Athamena et al., 2010; Mariod et al., 2010; Malencic et al. 2008). Par ailleurs, il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée (Rodriguez-Bernaldo de Quirós et al., 2009) due à leur capacité de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de Pinedo et al., 2007), ce qui peut expliquer en partie la faible activité antioxydante du Tyrosol qui ne possède qu'un seul groupement hydroxyle dans sa structure. Ainsi, l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant.

II.3.1.2. Test de blanchissement du β -carotène

Dans ce système, l'oxydation de l'acide linoléique donne naissance à des radicaux libres peroxydes (ROO^\cdot), due à l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir de leurs groupements méthylène diallylique (Kumaran et Karunakaran, 2006). Ces radicaux attaquent et oxydent la molécule du β -carotène, extrêmement insaturée, entraînant ainsi la disparition rapide de sa couleur orange, qui peut être suivie par spectrophotométrie (Jayaprakasha, 2001). La présence d'antioxydants (AH) donneur d'hydrogène retarde et minimise la décoloration du β -carotène (Shon et al., 2003) par neutralisation des radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et d'autres radicaux libres formés dans ce système (Kamath et Rajini, 2007). Les antioxydants

compétent avec le β -carotène vis-à-vis des radicaux peroxydes, selon la réaction suivante (Terpinc et al., 2009) :



Les résultats de cette réaction sont des radicaux d'antioxydants (A^\cdot) et des dérivés lipidiques (ROOH).

L'effet préventif des trois extraits, d'oleuropéine, de tyrosol et du BHT vis-à-vis de l'oxydation du β -carotène est représenté sur la figure 21.

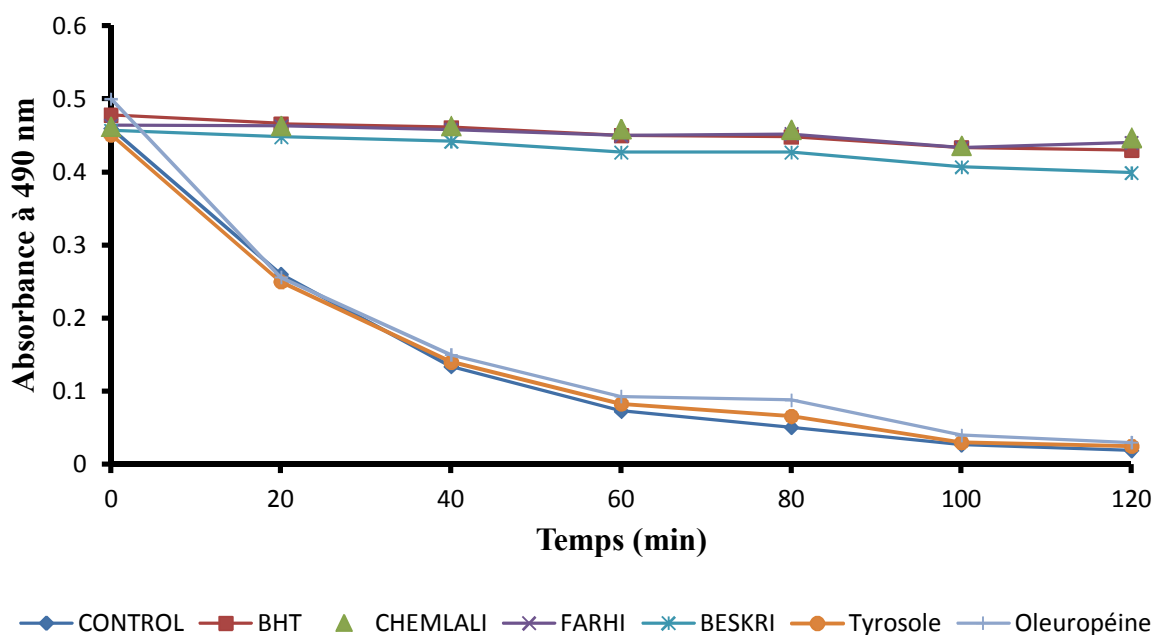


Figure 20: Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence d'extraits d'olive, d'Oleuropéine, du Tyrosol, et du BHT (chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

Il est évident d'après les courbes de la cinétique de blanchissement du β -carotène que tous les extraits ainsi que le BHT exercent un effet préventif significativement efficace ($p < 0.05$) contre l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes, en comparaison avec le contrôle négatif qui a produit une décoloration et une diminution rapide de l'absorption lors des 120 minutes d'incubation. Le Tyrosol et l'Oleuropéine ne manifestent presque aucune différence par rapport la cinétique du contrôle négatif.

Le pourcentage d'inhibition des différents extraits et du BHT rapporté sur la figure 22.

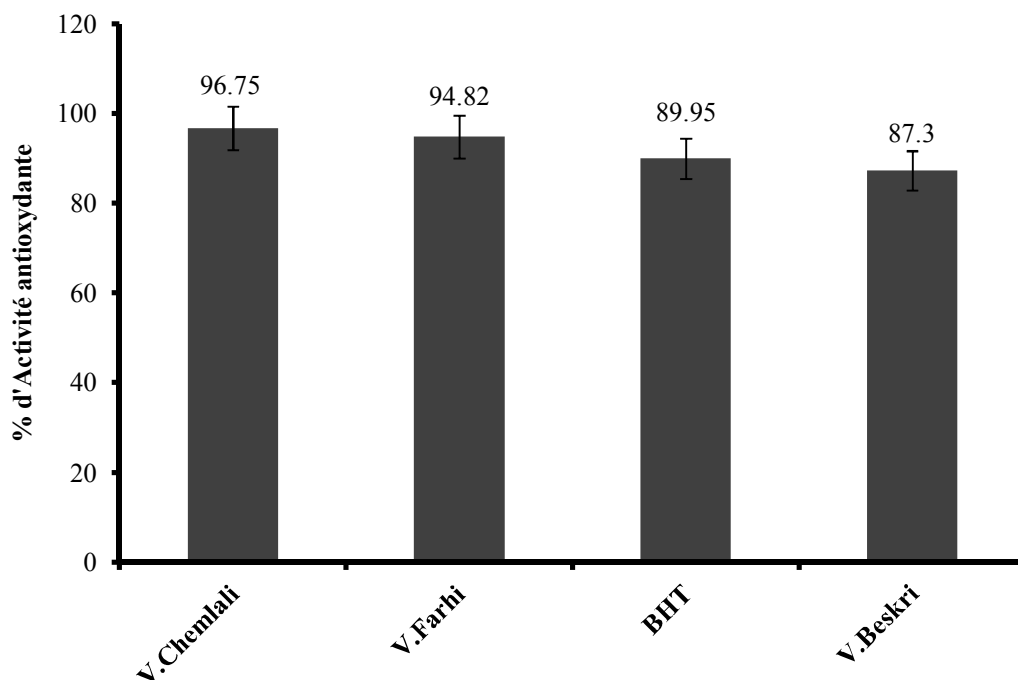


Figure 21: Pourcentage d'inhibition de l'oxydation du β -carotène par l'extract aqueux de la V.Chemlali, V. Farhi et V. Beskri, et par le BHT (les valeurs sont la moyenne de deux mesures \pm SD)

Il apparait évident, d'après la figure 21 que les extraits des variétés Chemlali et Farhi ont donné les plus forts effets inhibiteurs vis-à-vis des radicaux peroxydes avec un pourcentage d'inhibition égal à 96.75% et 94.82%, respectivement. Leur effet est significativement différent et supérieur ($p < 0.05$) à celui du BHT (89.95%), l'extract de la variété Beskri a donné un effet inhibiteur moindre de l'ordre de 87.30% et significativement moindre ($p < 0.05$) à celui du BHT et aux deux autres variétés.

La détermination de l'activité antioxydante de l'oleuropéine et du Tyrosol par ce test a révélé qu'ils n'ont pas d'effets préventifs significatifs vis-à-vis de la peroxydation du β -carotène, ils manifestent presque la même cinétique de blanchissement du β -carotène avec celle du contrôle négatif. Ce résultat est probablement dû à la haute spécificité de l'essai du blanchissement du β - carotène pour les composés lipophiles (Gachkar et al., 2007). Ainsi, l'extract qui contient la quantité la plus élevée en polyphénols ou d'autres composés hydrophobes est le plus actif dans ce test. Par contre, l'apparition d'une activité antioxydante significative d'oleuropéine et du Tyrosol dans le test de DPPH car ce test est indépendant de la polarité des échantillons (Kartal et al., 2007), ce qui confirme en partie comme on l'a signalé précédemment, que chaque polyphénol répond différemment dans l'essai mis en œuvre.

Récemment, il a été mis en évidence que la polarité et l'hydrophobicité des agents antioxydants sont deux facteurs importants dans les systèmes de biomembranes (Terpinc et al., 2009). le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène, paraît très utile comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria et al., 2006).

Par conséquent, l'inhibition de la peroxydation des lipidiques par les extraits polyphénoliques de l'olive reflète son potentiel thérapeutique. D'autre part, les flavonoïdes contenus la pulpe d'olive constituent une des classes de polyphénols connus par leur capacité à terminer la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique par piégeage du radical peroxy LOH (Takahama, 1983).

II.3.1.3. Test du potentiel réducteur

Le test du potentiel réducteur est souvent employé comme indicateur de capacité à donner des électrons, qui est un mécanisme important pour examiner l'action antioxydante des composés polyphénoliques (Yildirim et al., 2001). Dans ce test, la présence d'un réducteur (antioxydant) dans l'extrait à tester va réduire le complexe Fe^{3+} /ferricyanide [$FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$] à la forme ferreuse (Fe^{2+}) qui s'accompagne par le passage de la couleur jaune à la couleur verte ou bleue qui absorbe à la longueur d'onde de 700 nm, ainsi, une couleur intense signifie un puissant effet réducteur (Oliveira et al., 2008).

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux de trois variétés par ce test révèle que ces derniers possèdent un potentiel réducteur dose-dépendant significatif ($p < 0.05$) (figure 22).

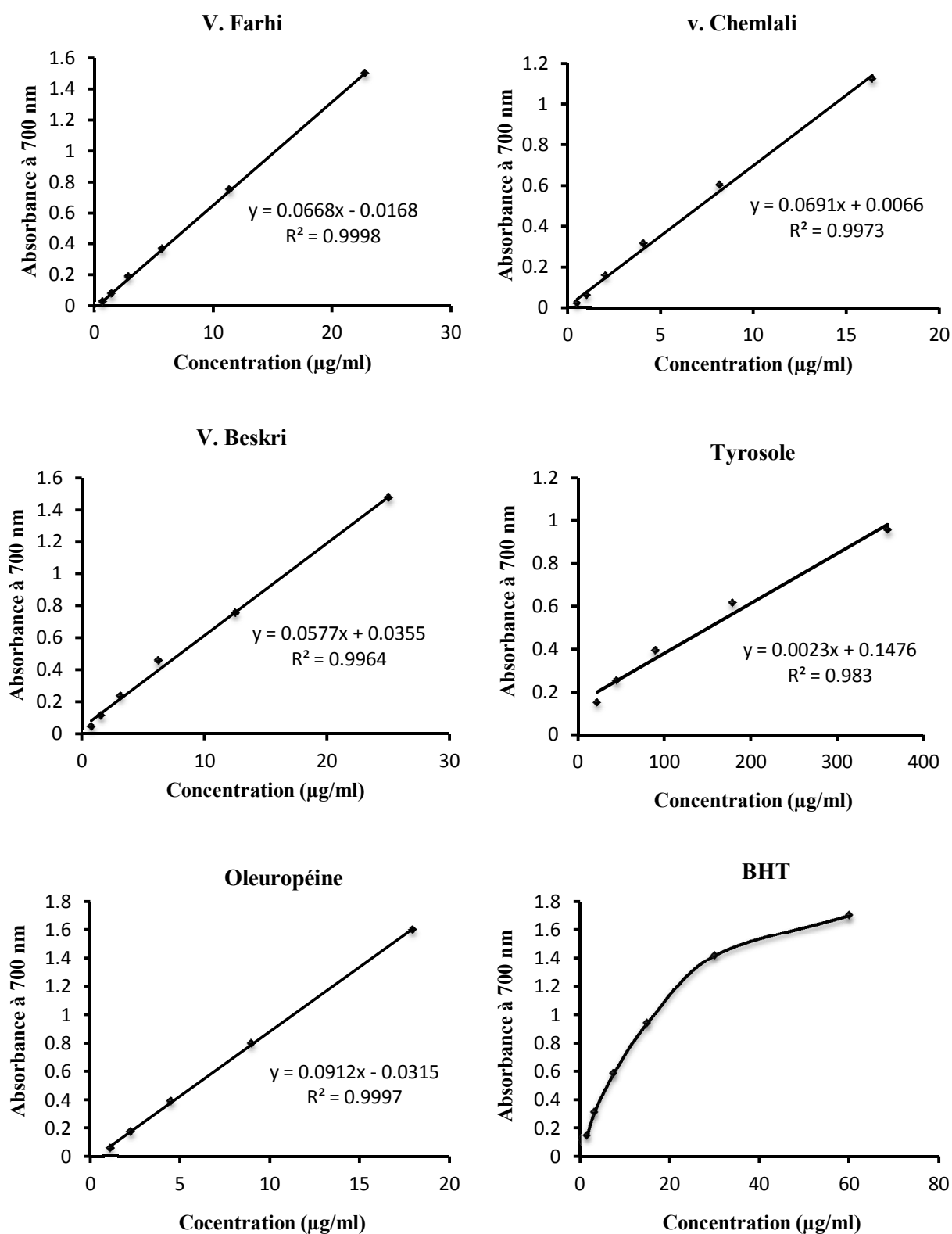


Figure 22: Pouvoir réducteur d'extraits de trois variétés d'olive (Chemlali, Farhi, et Beskri) de l'Oleuropéine, du Tyrosol, et du BHT (Les valeurs sont la moyenne de deux essais (n=2)).

Le potentiel réducteur des extraits par ce test est exprimé par la valeur de la concentration effective à 50% (CE_{50}) qui correspond à la concentration des polyphénols nécessaire pour donner une absorbance égale à 0.5 à 700 nm. Une CE_{50} faible représente un potentiel réducteur élevé (Molyneux, 2004). Les CE_{50} des extraits, de l'oleuropéine, du Tyrosol, et du BHT rapportés sur le tableau 8 montrent que les trois extraits présentent un potentiel réducteur significatif et différent ($p < 0.05$) avec des CE_{50} de 7.16 $\mu\text{g/ml}$, 8.12 $\mu\text{g/ml}$, et 9.22 pour les variétés Chemlali, Beskri, et Farhi, respectivement. Ce pouvoir réducteur est égal ou légèrement inférieur à celui du BHT.

D'autre part, l'Oleuropéine et le Tyrosol manifestent également un potentiel réducteur significatif ($p < 0.05$). En effet, l'oleuropéine possède toujours une bonne activité antioxydante, plus élevée que celle du BHT ($p < 0.05$) avec une CE_{50} de 5.88 $\mu\text{g/ml}$ alors que le Tyrosol est toujours moins actif comme dans le test de DPPH avec une CE_{50} de l'ordre de 176.25 $\mu\text{g/ml}$.

Tableau 8. Potentiel réducteur des trois extraits, du Tyrosol, de l'oleuropéine et du BHT.

Variété/ Composés testés	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
V.Chemlali	7.16 ± 0.21
V.Farhi	9.22 ± 0.02
V.Beskri	8.12 ± 0.12
Oleuropéine	5.88 ± 0.134
Tyrosol	176.25 ± 0.353
BHT	7.161 ± 0.007

D'une manière générale, le potentiel réducteur des extraits végétaux est dû à la présence de molécules capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres et les convertir en produits stables, terminant de ce fait les réactions en chaîne (Ferreira et al., 2007).

A la lumière de tous les résultats obtenus concernant l'activité antioxydante des extraits des trois variétés étudiés mis en évidence par les différents tests utilisés, soit dans le milieu hydrophile (test de DPPH et de potentiel réducteur), ou dans le milieu hydrophobe (test de β -carotène), il ressort que l'olive de ces variétés à travers leur composition qualitative et quantitative possèdent une activité antioxydante très importante et notable comparable à celle du BHT. Cette activité confère aux polyphénols de l'olive un potentiel thérapeutique très important dans les maladies provoquées par le stress oxydatif à travers leur présence ou ingestion quotidienne dans notre ration alimentaire (olive de table).

II.3.1.2. Evaluation de l'activité inhibitrice vis à vis de l'élastase

L'activité accrue de l'élastase du neutrophile est impliquée dans la pathogenèse de plusieurs maladies dangereuses, telles que l'emphysème, l'athérosclérose et certains types de cancers. Le développement d'inhibiteurs de cet enzyme présente un intérêt certain dans le domaine de la recherche pharmaceutique. Les plantes médicinales restent le premier réservoir de la recherche de nouvelles molécules à potentialités thérapeutiques. Dans ce contexte, nous avons évalué l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'élastase de différentes concentrations d'extrait polyphénolique de trois variétés d'olives algériennes en utilisant la méthode décrite par La Barre et al (1996). Cette étude a révélé que ces extraits manifestent une activité inhibitrice dose dépendante significativement ($p < 0.05$) efficace vis-à-vis de l'effet amidolytique de l'élastase sur substrat chromogène N-Succinyl-(Ala)₃- para- nitroanilide (figure 23). Par la même, les deux polyphénols (Oleuropéine et Tyrosol) ont montré à leur tour un effet inhibiteur significatif ($p < 0.05$). L' α_1 - antitrypsine, l'inhibiteur endogène spécifique de l'élastase a été utilisé comme standard dans cette étude.

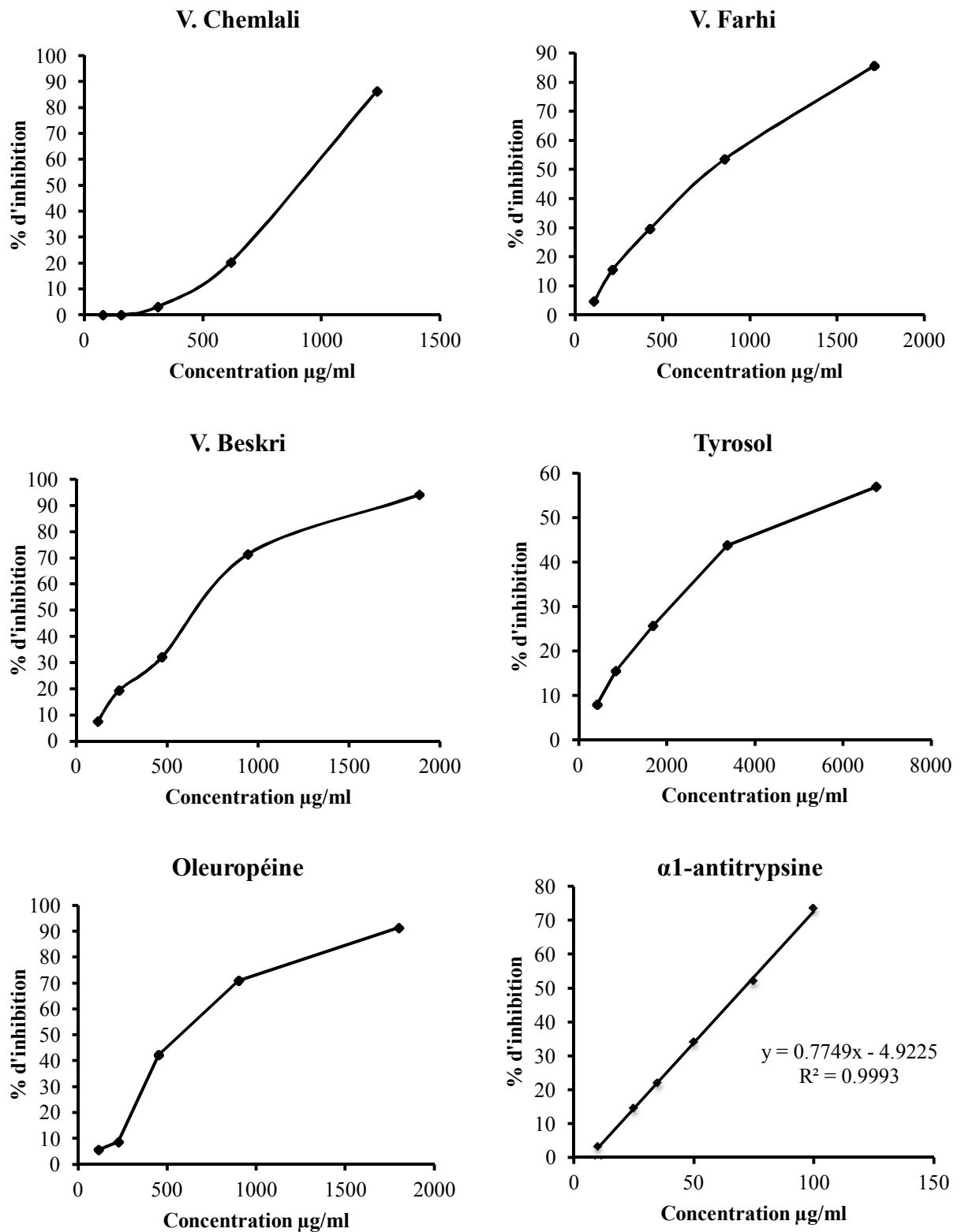


Figure 23: Activité inhibitrice vis-à-vis de l'élastase d'extrait polyphénolique de la V. Chemlali, V. Farhi et V. Beskri, des polyphénols : Oleuropéine, Tyrosol, et de l'inhibiteur α_1 -antitrypsine (chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD).

Les résultats de l'activité inhibitrice exprimés en CI_{50} mentionnés dans le tableau 9 montrent que parmi les trois variétés étudiées, l'extrait de la variété Beskri semble le plus actif avec une CI_{50} = 672.18 $\mu\text{g/ml}$ en comparaison avec les variétés Farhi et Chemlali dont les CI_{50} sont de l'ordre de 787.07 $\mu\text{g/ml}$ et 865.76 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Les deux polyphénols (oleuropéine et Tyrosol) manifestent également une activité inhibitrice significative vis-à-vis de l'élastase où l'Oleuropéine est toujours la plus active (CI_{50} = 613.99 $\mu\text{g/ml}$) par rapport au Tyrosol (CI_{50} = 3981.14 $\mu\text{g/ml}$) qui présente une activité biologique toujours très faible, que ce soit pour l'activité antioxydante ou pour l'activité anti-élastase.

Tableau 9: Effet inhibiteur vis-à-vis de l'élastase des trois extraits, du Tyrosol, de l'oleuropéine, et de l' α_1 - antitrypsine,

Variété/ Composés testés	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
V.Chemlali	865.76 \pm 23.68
V.Farhi	787.07 \pm 6.68
V.Beskri	672.18 \pm 6.26
Oleuropéine	613.99 \pm 4.46
Tyrosol	3981.14 \pm 63.08
α_1 -antitrypsine	70,88 \pm 0,56

Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD

Tous les extraits testés dans cette étude présentent une bonne corrélation entre leurs effets inhibitrice vis-à-vis de l'élastase et leur teneur en composés phénoliques et leur taux en flavonoïdes avec des coefficients de corrélation de 0.866 et 0.997 respectivement.

Les études sur l'effet inhibiteur des polyphénols vis-à-vis de l'élastase sont rares. Melzig et ses collaborateurs (2001) ont montré l'effet inhibiteur significatif de 40 polyphénols vis-à-vis de l'élastase de neutrophile où les flavonoïdes avec une structure catéchol étaient les plus actifs. Sartor et al. (2002) ont montré par leur part que cette activité est due d'une part au groupement hydroxyle du C3 et C4' aux trois groupements hydroxyle portés sur le cycle B et à la double liaison C2-C3.

Ainsi, et à la lumière de ces résultats promoteurs on peut dire que l'olive fruit de l'olivier constitue une source importante de micronutriments capables par leur activité antioxydante et inhibitrice de l'élastase de lutter contre toutes les maladies où les ERO et l'élastase sont impliquées telles que l'athérosclérose, le cancer et l'emphysème.

Conclusion et perspectives

Le présent travail a été fait pour étudier et évaluer des variétés d'olives algériennes (V. Chemlali, V. Farhi et V. Beskri) provenant de l'est d'Alger (wilaya de Batna) à travers leurs caractères pomologiques, leurs teneurs en polyphénols et en flavonoïdes, et à travers l'estimation de l'activité antioxydante et de l'effet inhibiteur vis-à-vis de l'élastase.

La caractérisation pomologique des trois variétés nous a montré la présence d'une différence inter-variétale pour le poids frais, l'humidité, le rapport pulpe/noyau et même pour la teneur en huile, qui est le principal sous-produit du fruit de l'olivier, cette plasticité de ces caractères peut être expliquée en partie par le facteur génétique. Généralement les trois variétés étudiées ont des fruits relativement petits ($< 3\text{g}$), et une teneur en huile élevée ($> 45\%$) elles sont ainsi classées comme des variétés à huile.

La caractérisation quantitative des polyphénols des trois variétés nous a révélé la richesse et la différence de ces variétés en ces composés, qui est de l'ordre de $2931.86\text{ mg EAG}/100\text{ g}$, $2664.88\text{ mg EAG}/100\text{ g}$, et $1919.29\text{ mg EAG}/100\text{ g}$, pour les variétés Beskri, Farhi, et Chemlali respectivement, alors que la teneur en flavonoïdes est moindre importante par rapport aux polyphénols, elle est de l'ordre de $35.47\text{ mg ER}/100\text{ g}$, $30.62\text{ mg ER}/100\text{ g}$ et $29.62\text{ mg ER}/100\text{ g}$ pour les variétés Farhi, Beskri, et Chemlali respectivement, Les résultats obtenus nous laissent à constater que cette plante constitue une source importante de polyphénols

La caractérisation qualitative des extraits polyphénoliques de ces trois variétés par CCM a révélé la présence de nombreux constituants parmi lesquels l'oleuropéine, le Tyrosol la Catéchine, et la vanilline.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire de ces extraits en utilisant le test de DPPH suggère qu'ont un pouvoir anti-radicalaire significative et différent avec des CI_{50} de l'ordre de $5.63\text{ }\mu\text{g/ml}$, $6.38\text{ }\mu\text{g/ml}$, et $10.09\text{ }\mu\text{g/ml}$ pour les variétés Chemlali, Farhi, et Beskri, respectivement. De même, le test de β -carotène/acide linoléique a confirmé l'effet antioxydant significative de ces mêmes extraits via l'inhibition de la peroxydation lipidique dont les pourcentages d'inhibition ont été estimés à 96.75% , 94.82% , et 87.30% , pour les trois variétés Chemlali, Farhi, et Beskri. Le pouvoir réducteur de ces extraits a permis, d'autre part, de montrer une capacité antioxydante appréciable avec des CE_{50} de l'ordre de $7.16\text{ }\mu\text{g/ml}$ pour la variété Chemlali, $8.12\text{ }\mu\text{g/ml}$ pour la variété Farhi, et 9.22 pour la variété Beskri.

L'évaluation de l'activité antioxydante des deux polyphénols d'olive, l'oleuropéine et le tyrosol, par les trois tests a montré que l'oleuropéine possède une très bonne activité antioxydante avec une CI_{50} de 7.59 $\mu\text{g/ml}$ pour le test de DPPH, et avec une CE_{50} de 5.88 $\mu\text{g/ml}$ pour le test de potentiel réducteur, tandis que le tyrosol est faiblement actif avec CI_{50} et CE_{50} très élevés de l'ordre de 1201.8 $\mu\text{g/ml}$ et 176.25 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. D'autre par, les deux polyphénols n'ont pas manifesté un effet préventif significatif vis-à-vis de la peroxydation du β -carotène.

Enfin, la détermination de l'effet inhibiteur des extraits polyphénolique de ces variétés, vis-à-vis de l'élastase nous a montré que les trois variétés manifestent une activité inhibitrice efficace vis-à-vis cet enzyme avec des CI_{50} de l'ordre de 672.18 $\mu\text{g/ml}$, 787.07 $\mu\text{g/ml}$, et 865.76 $\mu\text{g/ml}$ pour les variétés Beskri, Farhi, et Chemlali, respectivement. Par ailleurs, les deux polyphénols, l'oleuropéine et le tyrosol, ont montré également un effet inhibiteur significatif vis-à-vis de l'élastase, l'oleuropéine est toujours le plus actif avec un CI_{50} de 613.99 $\mu\text{g/ml}$, par contre le tyrosol est toujours moins actif avec un CI_{50} de 3981.14 $\mu\text{g/ml}$. À notre connaissance, il s'agit de la première mention de l'activité anti-élastase *in vitro* des polyphénols d'olives.

Ainsi, ces résultats conséquents nous ont permis de dire que cette plante constitue une source thérapeutique importante par son activité antioxydante et anti-élastase contre toutes les maladies qui impliquent une activité accrue des ERO et de l'élastase tels que l'athérosclérose, l'emphysème, et le cancer, ...etc.

Les importantes activités efficaces de cette plante nous encouragent à sélectionner cette dernière comme une source prometteuse pour des études chimiques approfondies afin de caractériser les molécules naturelles responsables de ces activités. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Une étude complémentaire approfondie concernant l'identification des polyphénols par des méthodes plus performantes est nécessaire
- Détermination de l'activité antioxydante par d'autres tests.
- Etude de l'effet de ces extraits sur d'autres protéases (Collagénase, Métalloprotéases)
- Etude de l'activité des polyphénols séparés et détermination des plus actifs d'entre eux.

- Etude de ces activités *in-vivo* en vue de faire une corrélation avec les résultats obtenus *in-vitro*.

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A. (2007) Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, 74, 636–643.
- Afonso, V., Santos, G., Collin, P., Khatib, AM., Mitrovic, D., Lomri, N., et al. (2006). TNF- α down-regulates human Cu/Zn superoxide dismutase 1 promoter via JNK/AP-1 signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 41, 709–21.
- Alasbahi. R., Melzig, M. (2008). The *In Vitro* Inhibition of Human Neutrophil Elastase Activity by some Yemeni Medicinal Plants. *Pharmaceutical Sciences*, 76, 471–483.
- Allen, D.H., Tracy, P.B. (1995). Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 1408-1415.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S. (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits *CUMINUM CYMINUM* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1), 69-81.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *The journal of Food Chemistry*, 89, 27–36.
- Bahorun, T., Soobrattee, MA., Luximon-Ramma, V., Aruoma, OI. (2006). Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medicinal Update*, 1, 1-17.
- Barja, G. (2004) Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences*, 27(10), 595-600.
- Barnes, PJ. (2004). Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacological Reviews*, 56, 515-48.
- Barnes, PJ., Shapiro, SD., Pauwels, RA. (2003). Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal*, 22, 672-688.
- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences*, 22, 266-272.
- Barroso, B., Abello, N., Bischoff, R. (2006). Study of Human Lung Elastin Degradation by Different Elastases using High-Performance Liquid Chromatography / Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 358(2), 216-224.
- Beaudeux, J.-L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., Peynet, J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21, 144–150.
- Bedard, M., McClure, CD., Schiller, NL., Francoeur, C., Cantin, A., Denis, M. (1993). Release of interleukin-8, interleukin-6 and colony stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 9, 455–462.
- Belaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T. J., Abraham, S. N., et al. (1998). Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against Gram negative bacterial sepsis. *Nature Medicine*. 4, 615–618.
- Ben Othman, N., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P., Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116, 662–669.
- Beretz, A., Cazenave, JP. (1991). Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. *Planta Medica*, 57 (7), 68-72.
- Berger, M.M. (1997). Role antioxidant des micronutriments: pertinence en épidémiologie et réanimation. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11, 125-132.
- Berger, M.M. (2006). Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 48–53.
- Bjorneboe, A., Bjorneboe, GA., Drevon, CA. (1990). Absorption, transport and distribution of vitamin E. *Journal of Nutrition*, 120, 233-242.

- Blazquez J. (1997). Encyclopédie mondiale de l'olivier. Conseil oléicole international, éditions EGEDSA, pp: 61-62.
- Boizot, N., Charpentier, J-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.
- Bonnefont-Rousselot, D., Collin, F. (2010). Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278, 55–67.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2007). Stress oxydant et vieillissement. *Spectra biologie*, 157, 23-26.
- Boskou, D., Tsimidou, M., and Blekas, D. (2006 a). Olive Oil, Chemistry and Technology, Ed., AOCS Press, Champaign, IL, 41–92.
- Boskou, G., Salta, F.N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., Andrikopoulos, N. K. (2006b). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, 94, 558–564.
- Boskou, D. (2009). Olive Oil—Minor Constituents and Health, Ed, CRC Press. Boca Raton London New York, pp: 1–246.
- Brenes, M., Rejano, L., García, P., Sánchez, H., & Garrida, A. (1995). Biochemical changes in phenolic compounds during spanish-style green olive processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2702–2706.
- Breton, C. (2006). Reconstruction de l'histoire de l'olivier et de son processus de domestication. Thèse de doctorat, Université Paul Cézanne AIX-MARSEILLE, France.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales. 3^{ème} édition. Ed. Technique & Documentation, Paris, 603p.
- Campbell, E.J., Campbell, M.A., Boukedes, S.S. and Owen, C.A. (1999). Quantum proteolysis by neutrophils: implications for pulmonary emphysema in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 337–344.
- Cavaillès, H. (1938). L'olivier dans le bassin méditerranéen. *Annales de Géographie*, 47 (270), 617-620.
- Chang, H.-Y., Ho, Y.-L., Sheu, M.-J., Lin, Y.-H., Tseng, M.-C., Wu, S.-H., et al. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. *Botanical Studies*, 48, 407–417.
- Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., et al. (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochemical pharmacology*, 32 (13), 1995-1998.
- Chua, F., and Laurent, G.J. (2006). Neutrophil Elastase: Mediator of Extracellular Matrix Destruction and Accumulation. *Proceedings of the American thoracic society*, 3, 424-427.
- Cohen, A. (1997). Cardiologie et pathologie vasculaire. Paris: ESTEM.
- Covas, M.I., de la Torre, K., Farre-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., et al. (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans, *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 608–616.
- Crea, F et al. (1997). Role of Inflammation in the Pathogenesis of Unstable Coronary Artery
- Dacosta, Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. (Ed)Paris, 317p.
- Dahlen, J.R., Foster, D.C., Kisiel, W. (1999). Inhibition of neutrophil elastase by recombinant human proteinase inhibitor 9. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1451, 233-241.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., & Linssen, P. H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 140–146.

- Deby-Dupont, G., Deby, C., Lamy, M. (2002). Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *Réanimation*, 11, 28-39.
- Defeng, Wu., Cederbaum, A.I. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health*, 27, 277-284.
- DeJong, S., Lanari, M.C. (2009). Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: Contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. *Food Chemistry*, 116, 892–897.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., et al. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, 65 (4), 337-53.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–66.
- Dobo, J., and Gettins, P. G. (2004). alpha1-Proteinase inhibitor forms initial non-covalent and final covalent complexes with elastase analogously to other serpin-proteinase pairs, suggesting a common mechanism of inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 9264-9269.
- Dollery, C. M., Owen, C. A., Sukhova, G. K., Krettek, A., Shapiro, S. D., Libby, P. (2003). Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation*. 107 (22), 2829–2836. Disease. *American Journal of Cardiology*, 80(5A), 10E-16E.
- Droge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82, 47–95.
- Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5, 264–270.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-74.
- Evans, MD., Dizdaroglu, M., Cooke, MS. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567, 1–61.
- Favier, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108-115.
- Feenstra, TL., van Genugten, ML., Hoogenveen, RT., Wouters, EF., Rutten van Molken, MP. (2001). The impact of aging and smoking on the future burden of chronic obstructive pulmonary disease: a model analysis in the Netherlands. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164, 590–596.
- Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, M.L.M., Araujo, M.E.M. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, 108, 31-37.
- Ferreira, I C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100, 1511–1516.
- Floyd, R, A. (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. The *federation of societies for experimental biology Journal*. 4, 2587-2597.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh S.A., Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102, 898-904.
- Galati, EM., Monforte, MT., Kirjavainen, S., et al. (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid.(Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco*, 40 (11), 709-712.
- Gapor Md Top, A. and Abd Rahman, H. (2000). Squalene in oils and fats. *Palm Oil De*, 32, 36–39.

- Garcia, R., Gusmani, L., Murgia, R., Guarnaccia, C., Cinco, M., Rottini, G. (1998). Elastase is the only human neutrophil granule protein that alone is responsible for the *in vitro* killing of borrelia burgdoferi. *Infection and Immunity*, 66, 1408–1412.
- Gervaise, Y. (2004). polyphénols - Euroforum, Paris, 10 P.
- Ghafourifar, P., Cadenas, E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26, 190–195.
- Ghedira, K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie*, 6, 83-89.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4, 162-169.
- Gilani, A. H., Janbaz, K. H., Shah, B H. (1997). Quercetin exhibits hepatoprotective activity in rats. *Biochemical Society Transactions*, 25 (4), S619.
- Giral, P. (1998), Athérome : anatomie pathologique, physiopathologie, épidémiologie et facteurs de risque, prévention. *La Revue du praticien*, 48, 99-106.
- Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Gruffat, D., Bauchart, D., Durand, D. (2007). The antioxidative effect of plant extracts rich in polyphenols differs between liver and muscle tissues in rats fed *n*-3 PUFA rich diets. *Animal Feed Science and Technology*, 139, 257–272.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41, 433–440.
- Gougerot-Pocidallo, M.-A., Halbwachs-Mecarelli, L. (2005). L'activation du polynucléaire neutrophile dans la synovite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme*, 72, 303–309.
- Guignard, J. L., Cosson, L., et Henry, M. (1985). Abrégé de phytochimie. Ed. Masson, 244 p.
- Gul, M.K., and Seker, M. (2006). Comparative analysis of phytosterol components from rapeseed (*Brassica napus* L.) and olive (*Olea europaea* L.) varieties. *European Journal of Lipid Technology*, 108, 759–765.
- Hadi, M. (2004). La quercétine et ses derives: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 155p.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press.
- Hannachi, H., Msallem, M., Ben Elhadj, S., El Gazzah, M. (2007). Influence du site géographique sur les potentialités agronomiques et technologiques de l'olivier (*Olea europaea* L.) en Tunisie. *Comptes Rendus Biologies*, 330, 135–142.
- Harris, E.S., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. (2000). The leukocyte integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 23409–23412.
- Havsteen, BH. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.
- He, Z., Xia, W. (2007). Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC–DAD–ESI–MS. *Food Chemistry*, 105, 1307–1311.
- Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Henrotin, Y., Kurz, B., and Aigner, T., and al. (2005) Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?. *OsteoArthritis and Cartilage*, 13, 643-654.
- Henriksen, P.A., Sallenave, J.-M. (2008). Human neutrophil elastase: Mediator and therapeutic target in atherosclerosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 1095–1100.
- Henrotin, Y.E., Bruckner, P., Pujol, JP. (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 11, 747–55.

- Huet, O., Duranteau, J. (2008). Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres Endothelial dysfunction: Involvement of reactive oxygen species. *Réanimation*, 17, 387-392.
- Hyaden, MR., Tyagi, SC. (2003). Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycaemia a late manifestation? The role of NOS, NO and redox stress. *Cardiovascular Diabetology*, 2, 2-9.
- Iserin, P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparation, soins. Ed. Larousse. Hong Kong, 240 p.
- Ishikawa, NK., Kasuya, MCM., Vanetti, MCD. (2001). Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Microbiol*, 32, 206-210.
- Jacotot, B., Henri, H. (1997). Intérêt nutritionnel de la consommation de l'huile d'olive. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 4 (5), 373-4.
- Jadhav, D., Rekha, B.N., Gogate, P. R., Rathod, V.K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *The Journal of Food Engineering*, 93, 421-426.
- James, RW. (1993). L'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL). *Medicine and Hygiene*, 51, 2894-6.
- Jassim, SA., Naji, MA. (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Applied Microbiology*, 95 (3), 412-27.
- Jayaprakasha, G.K., Singh, R. P., & Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry*, 73, 285-290.
- Kamath, V., Rajini, P.S. (2007). The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. *Food Chemistry*, 103, 428-433.
- Kamikura, Y., Wada, H., Noboria, T., Matsumoto, T., Shikub, H., Ishikura, K., Yamada, N., Nakanoc, T., Kazahayad, Y., Sawaid, T., Matsuda, M. (2005). Elevated plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with deep vein thrombosis. *Thrombosis Research*, 115, 53-57.
- Kanter, M. (1998). Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 57, 9-13.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100, 584-589.
- Kawabata, K., Hagio, T., Matsuoka, S. (2002). The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *European Journal of Pharmacology*, 451, 1-10.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, 165-177.
- Kojo, S. (2004). Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1041-1064.
- Kol, A., et al. (1999). Chlamydial Heat Shock Protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*, 98, 300-307.
- Korkmaz, B., Moreau, T., Gauthier, F. (2008). Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie*, 90, 227-242.
- Kouakou-Siransy, G., Sahpaz, S., Irié-Nguessan, G., Datte, Y.J., Kablan, J. b., Gressier, B., Bailleul, F. (2010). Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West African plants. *Food Chemistry*, 118, 430-435.

- Krisa, S., Teguo, P. W., Decendit, A., Deffieux, G., Huguet, F., Fauconneau, B., Mirillon, J.-M. (1997). production, purification et activité biologique des piceides (Stilbenes) extraits de cultures cellulaires *VITIS VINIFERA* L. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 136, 7-18.
- Kumaran, A., & Karunakaran, J. R. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97, 109–114.
- La Barre, S., Ongeon, A., Barthélémy, M., Guyot, M., le Caer, J-P., Bargibant, G. (1996). Characterization of a novel elastase inhibitor from a *fan coral*. *comptes rendus de l'académie des sciences de paris, Sciences de la vie*, 319, 365-370.
- L'Allemain, G. (2002). L'élastase du polynucléaire neutrophile est un anti-facteur de virulence bactérienne, *Multiple Sclerosis Journal*, 18, 1064-1065.
- Larbre, JP., Moore, AR., Da Silva, JA., Iwamura, H., Ioannou, Y., Willoughby, DA. (1994). Direct degradation of articular cartilage by rheumatoid synovial fluid: contribution of proteolytic enzymes. *Journal of Rheumatology*, 21, 1796–801.
- Larrauri, J. A., Ruperez, P., & Saura-Calixto, F. (1996). Antioxidant activity of wine pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(4), 369–372.
- Lee, W. L., Downey, G. P. (2001). Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164, 896–904.
- Lee, Y.J., Erdos, G., Hou, Z., Kim, S.H., Kim, J.H., Cho, J.M., Corry, P.M. (1994). Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 137, 141-154.
- León1, L., Uceda, M., Jiménez, A., Martín, L. M., and Rallo1, L. (2004). Variability of fatty acid composition in olive (*Olea europaea* L.) progenies. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (3), 353-359.
- Le Page, F., Guy, A., Cadet, J., Sarasin, A., Gentil, A. (1998). Repair and mutagenic potency of 8-oxoG:A and 8-oxoG:C base pairs in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 26, 1276–81.
- Li, H-B., Cheng, K-W., Wong, C-C, Fan, K-W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *The journal of Food Chemistry*, 102, 771–776.
- Liau, D.F., Yin, N.X., Huang, J., Ryan, S.F. (1996). Effects of human polymorphonuclear leukocyte elastase upon surfactant proteins *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1302, 117–128.
- Liou, T. G., Campbell, E. J. (2000). Quantum proteolysis resulting from release of single granules by human neutrophils: a novel, nonoxidative mechanism of extracellular proteolytic activity. *Journal of Immunology*, 157, 2624– 2631.
- Lopez, S., Halbwachs-Mecarelli, L., Ravaut, P., Bessou, G., Dougados, M., Porteu, F. (1995). Neutrophil expression of tumour necrosis factor receptors (TNF-R) and of activation markers (CD11b, CD43, CD63) in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*, 101, 25–32.
- Lotito, S.B., Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon?. *Free Radical Biology and Medicine*, 41, 1727–1746.
- Loussert, R., Brousse, G. (1978). L'olivier, techniques agricoles et productions méditerranéennes. Ed. Maisonneuve & larose. France. pp: 57-59.
- Lungarella, G., Cavarra, E., Lucattelli, M., Martorana, P.A. (2008). The dual role of neutrophil elastase in lung destruction and repair. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40, 1287–1296.

- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). Fruit phenolics. FL: CRC Press. Boca Raton, pp: 1–126.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. 7p.
- Macnee, W. (2000). Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 117 (Suppl.1). 303S–317S.
- Magliulo, E., Carosi, PG., Minoli, L., et al. (1973). Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. *Arzneimittelforschung*, 23, 161-167.
- Malencic, D., Maksimovic, Z., Popovic, M., Miladinovic, J. (2008). Polyphenol contents and antioxidant activity of soybean seed extracts. *Bioresource Technology*, 99, 6688–6691.
- Manett, L.J. (2002). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 3, 361–70.
- Manna, C., D'Angelo, S., Migliardi, V., et al. (2002). Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6521-6526.
- Manzi, P., Panfili, G., Esti, M., and Pizzoferrato, L. (1998). Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 115–120.
- Marco, GL. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45, 594-598.
- Marfak, A. (2003). Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 187 p.
- Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., Ismail, N. (2010). Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry*, 118, 120–127.
- Markesbery, WR., Carney, JM. (1999). Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 9, 133-146.
- Marklund, SL. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 79, 7634–8.
- Martel-Pelletier, J., Alaaeddine, N., Pelletier, JP. (1999). Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience*, 4, 694–703.
- Mehri, H., Hellali, R. (1995). Étude pomologique des principales variétés d'olivier cultivées en Tunisie. Numéro spécial, Institut de l'Olivier, Tunisie, 45 p.
- Melzig, MF., Löser, B., Ciesielski, S. (2001). Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie*, 56(12), 967-70.
- Mendham, J. (2006). Analyse chimique quantitative de Vogel. 6^{ème} Ed, de Boek, Belgique. 372 p.
- Miller, H.E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48, 91.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219.
- Monique, G-A., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., et Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *l'actualité chimique*, 91-96.

- Morello, J- R, Romero, M-P., Ramo, T., Motilva, M-J. (2005). Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Science*, 168, 65–72.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6, 173–182.
- Navia, M. A., McKeever, B.M., Springer, J.P., Lin, T.Y., Williams, H., Fluder, E.M., Dorn, C.P., and Hoogsteen, K. (1989). Structure of human neutrophil elastase in complex with a peptide chloromethyl ketone inhibitor at 1.84-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences Biochemistry*, 86, 7-11.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, DEC., et al. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, (4): 418-25.
- Ohlsson, K., Olsson, I. (1974). The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastases. *European Journal of Biochemistry*, 42, 519– 527.
- Okada, Y., Watanabe, S., Nakanishi, I., Kishi, J., Hayakawa, T., Watorek, W., et al. (1988). Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS Letters*, 229, 157–60.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira J. A. (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2326–2331.
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncology*, 1, 107–112.
- Paris, M., et Hurabielle, M. (1981). Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. Ed. Masson ; 339 p.
- Patumi, M., d'Andria, R., Marsilio, V., Fontanazza, G., Morelli, G., & Lanza, B. (2002). Olive and olive oil quality after intensive monoculture olive growing (*Olea europaea* L., cv. *Kalamata*) in different irrigation regimes. *Food Chemistry*, 77, 27–34.
- Pauwels, R.A., Buist, A.S., Calverley, P.M., Jenkins, C.R., Hurd, S.S. (2001). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163, 1256-1276.
- PerezCamino, M.C., and Cert, A. (1999). Quantitative determination of hydroxyl pentacyclic triterpene acids in vegetable oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1558–1562.
- Pérez-Bonilla, M., Salido, S., van Beek, T. A., Linares-Palomino, P. J., Altarejos, J., Nogueras, M., Sanchez, A. (2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *Journal of Chromatography A*, 1112, 311–318.
- Perona, J.S., Cabello-Moruno, R., and Ruiz-Gutierrez, V. (2006). The role of virgin olive oil consumption in the modulation of endothelial function. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 17, 429–445.
- Pham, C.T. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 6, 541-550.
- Picard, S. (1998). LDL oxydées et athérosclérose. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 10, 15-20.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63, 1035-1042.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J.O. (1999). Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention. *Carcinologie*, 95.

- Plantier, L. (2008). Réparation alvéolaire et emphysème pulmonaire : Rôle des systèmes d'alvéologénèse. Thèse de doctorat. Université Paris XII-Val de Marne.
- Prasad, K. (1997). Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flaxseed. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 168, 117–123.
- Prasad, K. N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H., Jiang, Y. (2009). Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 627–632.
- Pratt, D., Miller, E. (1984). A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 1064–1067.
- Pryor, W.A. (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 141–164.
- Puel, C., Quintin, A., Agalias, A., et al. (2004). Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *British Journal of Nutrition*, 92(1), 119–27.
- Ribeiro, J.K.C., Cunha, D.D.S., Fook, J. M.S.L.L., Sales, M. P. (2010). New properties of the soybean trypsin inhibitor: Inhibition of human neutrophil elastase and its effect on acute pulmonary injury. *European Journal of Pharmacology*, 644, 238–244.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). les composés phénoliques des végétaux. Editions dunod, paris. 254 pp
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 797–807.
- Rochette, L. (2008). Stress oxydant et sepsis. *Reanimation*, 3, 1–4.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., Cimato, A. (1999). Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 964–967.
- Romero, C., Brenes, M., Garc_ia, P., & Garrido, A. (2002). Hydroxytyrosol 4-b-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3835–3839.
- Roberto Lo, S. (2008). Organic acids influence on DPPH_ scavenging by ascorbic acid. *Food Chemistry*, 107, 40–43
- Rodriguez-Bernaldo de Quirós, A., Lage-Yusty, M.A., López-Hernandez, J. (2009). HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, 42, 1018–1022.
- Ross, I.A. (2005). Plant medicinal of the world, Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey. USA, 373 p.
- Russo-Marie, F., Peltier, A., Polla B.S. (1998). L'inflammation. John libbey Eurotext. France. pp. 319–320.
- Ryan, D., Robards, K., & Lavee, S. (1999). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 265–274.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., et al. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, 621–632.
- Saïle, R., Taki, H. (2007). Cholestérol, lipoprotéines et athérosclérose : de la biochimie à la physiopathologie. *Les technologies de laboratoire*, 2, 4–11.
- Sanchez, C.J., De miguel gordillo, C., Marin exposito, J. (1999). La qualité de l'huile d'olive provenant de variétés en Estrémadure en fonction de la composition et la maturation de l'olive. *Olivae*, 79, 38–40.
- Sartor, L., Pezzota, E., Dell'aica, I., Caniato, R., Biggin, S., and Garbisa, S. (2002a). Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochemical pharmacology*, 64(2), 229–237.

- Sartor, L., Pezzato, E., and Garbisa, S. (2002b). (-)Epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte elastase: potential of the phyto-factor in hindering inflammation, emphysema, and invasion. *Journal of Leukocyte Biology*, 71, 73-79.
- Sato, T., Takahashi, S., Mizumoto, T., Harao, M., Akizuki, M., Takasugi, M., Fukutomi, T., Yamashita, J.-i. (2006). Neutrophil elastase and cancer. *Surgical Oncology*, 15, 217-222.
- Schorr, K., Rott, A., Da Costa, F., Merfort, I. (2005). Optimisation of a human neutrophil elastase assay and investigation of the effect of sesquiterpene lactones. *Biologicals*, 33, 175-184.
- Scott, P.M., Kennedy, B. P. C., Harwig, J., and Chen, Y-K. (1974). Formation of Diketopiperazines by *Penicillium italicum* Isolated from Oranges. *Apple Microbiology*, 28(5), 892-894.
- Screaton, N. K. (2004). Emphysema and smoking-related lung diseases. *Imaging*, 16, 50-60.
- Seidel, V. (2005). Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds, Humana Press (Totowa). pp: 27-37.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1), 91-1001.
- Shapiro, SD., Goldstein, NM., Houghton, AM., Kobayashi, DK., Kelley, D., Belaaouaj, A. (2003). Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *American Journal of Pathology*, 163, 2329-35.
- Shon, M. Y., Kim, T. H., & Sung, N. J. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chemistry*, 82, 593-597.
- Siems, WG., Grune, T., Esterbauer, H. (1995). 4-hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Science*, 57, 785-789.
- Sies, H., Stahl, W., Sundquist, AR. (1992). Antioxidant function of vitamins, vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of Science*, 669, 7-20.
- Simpson, A. J., Maxwell, A. I., Govan, J. R., Haslett, C., and Sallenave, J. M. (1999). Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Letters*, 452, 309-313.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-153.
- Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P., Almeida, L.M. (1997). Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, 26, 469-478.
- Soler-Rivas, C., Espin, J. C., Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1013-1023.
- Sommerhoff, CP., Nadel, JA., Basbaum, CB., Caughey, GH. (1990). Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *Journal of Clinical Investigation*, 85, 682-689.
- Soni, M.G., Burdock, G.A., Christian, M.S., Bitler, C.M., Crea, R. (2006). Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 903-915.
- Stralin P, Marklund SL. (2000). Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 151, 433-41.
- Sun, Z., and Yang, P. (2004). Role of imbalance between neutrophil elastase and α_1 -antitrypsin in cancer development and progression. *The Lancet Oncology*, 5, 182-190.

- Sternlicht, M. D., Werb, Z. (1999). Neutrophil elastase and cathepsin G. In *Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins* (T. Kreis, R. Vale, eds.), Oxford, Oxford University Press, 543–545.
- Takahama, U. (1983). Redox reactions between kaempferol and illuminated chloroplasts. *Plant Physiology*, 71(3), 598–601.
- Taylor, J.C., Crawford, I.P., Hugli, T.E. (1977). Limited degradation of the third component (C3) of human complement by human leukocyte elastase (HLE): partial characterization of C3 fragments. *Biochemistry*, 16, 3390–3396.
- Ter-Minassian, A. (2006). Cerebral metabolism and brain injury. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 25, 714–721.
- Terpinc, P., Bezjak, M., Abramovic, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, 115, 740–744.
- Thomas, D. (1996). *Cardiologie*. Paris : Ellipses.
- Thring, T.S.A., Hili, P., Naughton, D.P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 27–37.
- Torres de Pinedo, A., Pen˜ alver, P., Morales, J.C. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chemistry*, 103, 55–61.
- Tosi, M.F., Zakem, H., Berger, M. (1990). Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *Journal of Clinical Investigation*, 86, 300–308.
- Travis, J., Salvesen, G.S. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. *The Annual Review of Biochemistry*, 52, 655–709.
- Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., and Trichopoulos, D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *The New England Journal of Medicine*, 348, 2599–2608.
- Tuck, K.L., Hayball, P.J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 636–644.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18, 98–112.
- Trueba, G.P., Sanchez, G., Giuliani, M, A. (2004). Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. *Frontiers in Bioscience*, 9, 2029–2044.
- Tsimidou, M. (2006). Olive oil quality, in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, Ed., AOCS Press, Champaign, IL, pp. 93–112.
- Tuder, R.M., Zhen, L., Cho, C.Y., et al. (2003). Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 29, 88–97.
- Tuppo, E. E., Forman, I. J. (2001). Free radical oxidative damage and Alzheimer's disease. *Journal of American osteopathic association*, 101, 11–15.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncola, J., Izakovic, M., Mazura, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.
- Virot, M., Tomao, V., Ginies, C., Visinoni, F., Chemat, F. (2008). Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *The Journal of Chromatography A*, 1197, 57–64.
- Visioli, F., Bellosta, S., Galli, C. (1998). Oleuropéine, le principe amer des olives, augmente la production d'oxyde nitrique par les macrophages de souris. *Life Sciences*, 62(6), 541–546.

- Voynow, J.A., Young, L.R., Wang, Y., Horger, T., Rose, M.C., Fischer, B.M. (1999). Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 276, 835–843
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.-M. (1983). Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. New York. 163p
- Watorek, W., van Halbeek, H., Travis, J. (1993). The isoforms of human neutrophil elastase and cathepsin G differ in their carbohydrate side chain structures. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 374, 385–393.
- Wei, A.Z., Mayr, I., Bode, W. (1988). The refined 2.3 Å crystal structure of human leukocyte elastase in a complex with a valine chloromethyl ketone inhibitor. *FEBS Letters*, 234, 367–373.
- Wiedow, O., Meyer-Hoffert, U. (2005). Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 257, 319–328.
- Wong, E.T., Jenne, D.E., Zimmer, M., Porter, S.D., Gilks, C.B. (1999). Changes in chromatin organization at the neutrophil elastase locus associated with myeloid cell differentiation. *Blood*, 94 3730–3736.
- Xu, G.-H., Kim, Y.-H., Chi, S.-W., Choo, S.-J., Ryoo, I.-J., Ahn, J.-S., Yoo, I.-D. (2010). Evaluation of human neutrophil elastase inhibitory effect of iridoid glycosides from *Hedyotis diffusa*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20, 513–515.
- Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083–4089.