



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج  
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة و الحياة و علوم الأرض و الكون

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

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Intitulé

**Activité antioxydante des racines et l'écorce d'*olea europaea* L.**

Présenté par:

MOHAMADI Imene & TABABOUCHET Safa .

Devant le jury:

**Président :** M<sup>me</sup> BOULKROUNE Hasna      MCB      (Univ Bordj Bou Arreridj)

**Encadrant :** M<sup>me</sup> MEZITI Asma      MAA      (Univ Bordj Bou Arreridj)

**Examineur :** Mr BELLIK Yuva      MCA      (Univ Bordj Bou Arreridj)

Année universitaire : 2021/2022

## **Remerciement**

*Tout d'abord nous tenons à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a éclairé la voie de savoir et nous a donné la force et la patience d'accomplir cet humble travail.*

*En tout premier lieu nous remercions de tout cœur notre encadreur **M<sup>me</sup> Meziti Asma**, d'avoir accepté de nous encadrer, soutenir et encourager, pour ces précieux conseils et soutien tout au long de notre travail.*

*Nous exprimons nos remerciements aux membres de jury, d'avoir accepté d'examiner ce travail, et tout particulièrement le présidente **M<sup>me</sup>BELKROUNE Hasna** Pour l'honneur qu'elle nous fait en présidant le jury de notre mémoire. Monsieur **BELLIK Yuva** qui a accepté de juger ce travail.*

*Nos sentiments de reconnaissances et nos remerciements vont également à l'encontre de tous les enseignants qui ont contribué à notre formation pendant cinq ans.*

***Dédicace :***

**Je dédie ce travail**

***A ma chère mère Omar Djamila***

*A celle qui été pour moi une vie de tendresse, pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices. Que Dieu te protège et t'accorde-le bonheur, la santé et la longue vie*

***A mon cher Père Kamel***

*A celui qui a été pour moi un ami qui m'a orienté vers le bien et la confiance « Rabi yarhmo ».*

*Merci de m'aider encore aujourd'hui grâce à ton amour infini, Je te dédie ce travail en témoignage de ma grande reconnaissance et mon grand amour, je t'aime.*

***A mon chers frère « Souhaib », et mes sœur « Fatma, Faiza et Zouina »***

***A mon marie« Said»***

*Merci pour les encouragements, grâce à toi j'ai surmonté toutes les difficultés.*

***A mon adorable neveu « Ahmed Kamel »***

***A ma famille***

***A mes amies***

***A mon cher binôme Safa***

***A tous les collègues de ma promotion***

***Imene***

*Je dédie ce travail :*

*à mes très chers parents, à mon frère, à mes sœurs,*

*à mon binôme Imene ,*

*à toute ma famille.....*

*Safa*

## **Résumé :**

Dans les dernières décennies, il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle pour le traitement de diverses maladies. L'olivier ou *Olea europaea L.* constituent une entité indissociable des peuples méditerranéens. Cette plante appartient à la grande famille des oléacées. L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux et méthanoliques des racines et de l'écorce d'olivier (EAqr, EMer, EAqé et EMeé) respectivement.

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé la richesse des extraits EMer et EMeé en composés phénoliques, où les teneurs sont respectivement (509,33 µg EAG/mg) et (387,33µg EAG/mg) d'extrait. L'évaluation quantitative du pouvoir piègeur des extraits vis-à-vis du DPPH confirme que les extraits EMeé et l'EMer sont les plus actifs avec une IC50 de l'ordre (0.404 mg/ml) et (0.525 mg/ml) respectivement. Par ailleurs, dans le teste de blanchissement du β-carotène, les extraits EAqr, EMeé et L'EAqé montrent les plus grandes activités inhibitrices (90.19%), (86.15%) et (78.05%) respectivement. L'activité antioxydante des extraits d'olivier est testée sur des globules rouges, l'EMer est le seul extrait qui a un effet protecteur contre l'hémolyse oxydative induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec un pourcentage d'inhibition de (21%).

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que les racines et de l'écorce d'olivier possèdent une activité antioxydante considérable qui est localisée principalement dans les extraits EMer et EMeé.

## **Mots clés :**

- Activité antioxydante, composés phénoliques, *olea europaea*, piègeur, hémolyse oxydative.

## Table des matières

### Liste des abréviations

### Liste des figures

### Liste des tableaux

Introduction

<b>I. Matériel et méthodes</b> .....	06
I.1. Matériel.....	07
I.1.1. Matériel végétale .....	07
I.1.2. Réactifs chimiques .....	09
I.1.3. Appareillage .....	09
I.2. Méthodes.....	09
I.2.1. Préparation des extraits des racines et l'écorce d' <i>olea europaea</i> L .....	09
I.2.2. Analyse des extraits des racines et l'écorce d' <i>olea europaea</i> L .....	11
I.2.2.1. Dosage des composés phénoliques .....	11
I.2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	12
I.2.3. Tests, in vitro, de l'activité antioxydante.....	12
I.2.3.1. Piégeage du radical DPPH● .....	12
I.2.3.2. Test de blanchissement du β-carotène .....	13
I.2.3.3. Test de l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène .....	14
I.2.4. Analyse statistiques .....	15
<b>II. Résultats et Discussion</b> .....	16
II.1. Rendement .....	17
II.2. Analyse des extraits des racines et l'écorce d' <i>olea europaea</i> L.....	18

II.2.1. Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes .....	18
II.3. Résultats de l'activité antioxydante .....	20
II.3.1. Piégage du radicale DPPH .....	20
II.3.2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène .....	23
II.3.3. Test de l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène.....	24
<b>Conclusion</b> .....	28
<b>Références bibliographiques</b> .....	30

## Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$	Oxygène singulet.
CAT	Catalase.
DPE	3,4-dihydroxyphenyl)ethanol
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EAG	Equivalent d'acide gallique
EQ	Equivalents de quercétine
ERA	Espèces réactives de l'azote.
ERO	Espèces réactives de l'oxygène.
GPX	Glutathion peroxydase.
GR	Glutathion réductase.
GST	Glutathion S-transférase.
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peroxyde d'hydrogène.
$\text{LO}\cdot$	Radical alkoxy.
$\text{LOO}\cdot$	Radical peroxy.
MDA	Malondialdehyde
$\text{NO}\cdot$	Radical oxyde nitrique.
NOS	Oxyde nitrique synthase.
$\text{O}_2\cdot^-$	Anion radicalaire superoxyde.
$\text{O}_3$	Ozone.
$\text{OH}\cdot$	Radical libre hydroxyle.
PBS	Tampon phosphate



SOD

Superoxyde dismutase.

XO

Xanthine oxydase.

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> L'olivier ( <i>Olea europaea</i> L) .....	07
<b>Figure 2 :</b> Carte oléicole d'algérie .....	08
<b>Figure 3:</b> L'écorce d'olivier .....	08
<b>Figure 4:</b> les racines d'olivier.....	09
<b>Figure 5 :</b> Extraction par macération .....	10
<b>Figure 6 :</b> Evaporateur rotatif.....	10
<b>Figure 7 :</b> Changement de couleur due à une réduction du molybdate d'ammonium(Jaune) avec le noyau phénol du réactif de Folin (Bleu) .....	11
<b>Figure 8 :</b> Réaction entre $AlCl_3^+$ et les flavonoïdes.....	12
<b>Figure 9 :</b> Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH● .....	13
<b>Figure 10 :</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique .....	18
<b>Figure 11:</b> Droite d'étalonnage de la quercétine .....	19
<b>Figure 12 :</b> Activité antiradicalaire des extraits des racines et de l'écorce d' <i>olea europaea</i> et de l'acide ascorbique .....	21
<b>Figure 13:</b> IC50 des différents extraits et de l'acide ascorbique.....	22
<b>Figure 14 :</b> Cinétique de blanchissement du $\beta$ carotène en absence et en présence des extraits d'olivier et de l'acide ascorbique .....	23
<b>Figure 15:</b> Les pourcentages d'inhibition de blanchiment de la $\beta$ -carotène des extraits d'olivier et l'acide ascorbique.....	23
<b>Figure 16 :</b> L'absorbance de l'hémoglobine en présence de l'extrait méthanolique des racines en fonction des différentes concentrations de l' $H_2O_2$ .....	26
<b>Figure 17 :</b> Les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse par l'EMer en fonction des différentes concentrations de l' $H_2O_2$ . .....	26

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Classification d' <i>Olea europaea</i> L .....	07
<b>Tableau II :</b> Aspects, couleurs et rendements des extraits d'olivier .....	17
<b>Tableau III:</b> Teneur des polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits des racines et l'écorce d'olivier .....	19

# *Introduction*

L'oxygène est un élément indispensable à la vie de tous les organismes aérobies, parce qu'il permet de produire l'énergie en oxydant la matière organique (**Kalam *et al.*, 2012**), mais l'oxygène peut être une source d'agression pour ces organismes qui convertissent une partie de cet élément en métabolites hautement réactifs : les radicaux libres (**Pandey et Rizvi, 2011**).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques instables, atomes ou molécules, contenant un électron non apparié (célibataire) sur leur couche orbitale externe (**Koechilin-Ramonatxo, 2006**). Ces radicaux peuvent être dérivés de l'oxygène comme l'anion radicalaire superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical libre hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le radical oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ), le radicale alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ) et le radicale peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ) ainsi que des dérivés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) sont appelées espèces réactives oxygénées (ERO) (**Kalam *et al.*, 2012**), ou d'autres atomes comme l'azote (Les espèces réactives azotés (ERA)).

Les sources endogènes des radicaux libres comprennent la chaîne respiratoire dans les mitochondries, les réactions immunitaires, les enzymes telles que la xanthine oxydase (XO) et l'oxyde nitrique synthase (NOS) et l'oxydation médiée par les métaux de transition (**Lykkesfeldt J, 2007**), la gamme variée de sources exogènes de ROS englobe les rayonnements ionisants ( rayons X) et non ionisants, les polluants, les gaz toxiques naturels tels que l'ozone ( $O_3$ ), les médicaments et les toxines (**Pandey et Risvi, 2009; Pandey et Risvi, 2010**).

Les radicaux libres, le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. L'augmentation de la production des radicaux libres dans la cellule provoque le stress oxydant (**Powers *et al.*, 2011**), qui est un déséquilibre de la balance physiologique entre les systèmes de défenses antioxydants et la production d'ERO (**Deaton et Marlin, 2003**).

Lors d'un stress oxydant, L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (**Curtin *et al.*, 2002**). Il a été rapporté que le stress oxydatif joue un rôle important dans le développement et la progression de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète. Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (**Pandey et Risvi, 2010**).

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou inhiber la génération d'un oxydant toxique, d'arrêter ceux qui sont déjà produits et de les inactiver, bloquer de ce fait la réaction en chaînes de propagation produite par ces oxydants (**Tang et Halliwell, 2010**). Ces antioxydants peuvent être de deux natures différentes ; des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques. Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) (**Hermes-Lima, 2005**). Les antioxydants non-enzymatiques renferment des substances endogènes comme le glutathion, la bilirubine l'acide urique et des substances exogènes apportées par l'alimentation comme la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les polyphénols (**Leverve, 2009 ; Pandey et Rizvi, 2011**).

De nombreuses études ont montré que les plantes possèdent des propriétés antioxydantes dues en grande partie à leurs composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes (**Hama et al., 2019**). Ils peuvent prévenir la modification oxydative par neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène ou décomposition des peroxydes par l'intermédiaire de leurs activités antioxydantes (**Ladoh et al., 2014**). Les plantes médicinales contiennent une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse des médicaments utiles (**Sofowora et al., 2010**).

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve l'espèce *Olea europaea* L connue sous le nom d'olivier. Ce dernier constitue l'une des principales espèces fruitières plantées en Algérie. Elle couvre une superficie de 350000 ha avec 23 millions d'arbres, soit plus de 50 % du patrimoine arboricole national (**Missat, 2012**). C'est un arbre de la famille des oléacées, cultivé surtout dans le bassin méditerranéen depuis au moins 3500 ans avant notre ère. Il était dans l'antiquité grecque et romaine, un emblème de fécondité et un symbole de paix et de gloire. Le nom scientifique de l'arbre "Olea" vient d'un mot qui signifiait "huile" chez les grecques de l'antiquité (**Loussert et Brousse, 1978**).

*Olea europaea* est un arbre polymorphe qui peut atteindre 15 à 20 mètres de hauteur et vivre très longtemps, parfois jusqu'à 1.000 ans ou plus. L'olivier est très rameux, il dispose d'un tronc noueux et d'une écorce brune crevassée. Il s'adapte dans des conditions d'environnements extrêmes comme la chaleur et la sécheresse. C'est un arbre qui pousse bien dans un sol aéré, néanmoins, il est capable de s'adapter à plusieurs types de sols. La

distribution du système racinaire est en fonction du type de sol. Dans les sols aérés, les racines peuvent atteindre 6 à 7 mètres ou plus. Pour des sols moins aérés, l'olivier adapte le système racinaire latéral est plus développé. Dans un sol lourd et non aéré, en développant un réseau de racines superficielles (**Kasraoui, 2010**). Ses feuilles, persistantes en hiver, sont opposées, ovales, allongées, portées par un court pétiole, coriaces, entières, enroulées sur les bords, d'un vert foncé luisant sur la face supérieure et d'un vert clair argenté avec une nervure médiane saillante sur la face inférieure (**Amouretti, 1985**). Ses fleurs printanières, regroupées en petites grappes, sont blanches avec un calice, deux étamines, une corolle à quatre pétales ovales et un ovaire de forme arrondie (**Roque, 1959**). Ses fruits, les olives, d'abord verts, deviennent noirs à maturité complète (**Rol et Jacamon, 1988**).

L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production d'huile d'olive utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. L'*Olea europaea* est largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour un large éventail de maladies dans divers pays. L'écorce, les fruits, les feuilles, le bois, les graines et l'huile sont utilisés sous différentes formes, seuls ou parfois en combinaison avec d'autres herbes. Les habitants de la mer Méditerranée utilisent les feuilles d'olivier, les racines et même l'écorce de l'olivier comme remèdes maison depuis plus de 2 000 ans. À l'époque de la Grèce antique, on employait les feuilles pour désinfecter les blessures cutanées. Les Anciens leur attribuaient des vertus antiseptiques et la propriété de combattre toutes sortes d'infections. Au XX siècle, le botaniste français Paul-Victor Fournier ajoute les effets diurétiques des feuilles et de l'écorce et l'action hypotensive des feuilles chez les patients hypertendus.

*Olea europaea* est largement utilisé pour traiter la diarrhée, les infections des voies respiratoires et urinaires, les maladies de l'estomac et de l'intestin, et comme nettoyant pour la bouche par différentes communautés à travers le monde. En Afrique de l'Est, l'infusion de l'écorce d'*Olea europaea* est prise pour l'infestation par le ténia (**Hashmi, 2015**). Les feuilles d'*Olea europaea* sont utilisées pour traiter des problèmes de santé tels que les maux de dos ou de tête, les infections oculaires, les maux de gorge, les infections des voies urinaires et les problèmes rénaux. Ils fonctionnent également comme hypotenseur, émollient, fébrifuge et styptique (**Somova et al., 2003**). En fait, les feuilles de l'arbre ont été efficacement utilisées pour le traitement du paludisme en 1854. L'extrait de feuilles d'olivier aurait également une forte action antibactérienne et antifongique (**Peraira et al., 2007**) et hypoglycémiant (**Ghedira, 2008**). L'huile d'olive présente essentiellement des propriétés antioxydantes, anti-

hypertensives, anti-agrégation plaquettaire, anti-cardiovasculaire, antiviellissement, anti-cancérogène et gastro-protective (**Ghedira, 2008**).

La plus part des travaux de recherche sont réalisés sur les feuilles et les fruits de l'olivier, ils révèlent la présence de polyphénols comme l'oleuropéine, hydroxytyrosol, les flavonoïdes, les pycnogénols, les glucosinolates, les isoprénoïdes, les caroténoïdes, les tocotriénols et les proanthocyanadines. (**Bouaziz et Sayadi, 2003 ; Yuhong et al., 2006 ; Khayat et al., 2018**).

Cependant très peu d'études sont effectuées sur la phytochimie et les propriétés biologiques des racines et de l'écorce d'olivier, ce qui justifie le choix de ce sujet.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif essentiel est l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des racines et écorce d'*olea europaea L.*

Cette étude englobe deux volets :

- Le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction, La détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits obtenus à partir de l'écorce et des racines d'olivier.
- Le second est consacré à l'évaluation de l'activité antioxydante par le test de DPPH, blanchissement de B carotène et l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène.



# *Chapitre I : Matériel et Méthodes*

## I.1 MATERIEL

### I.1.1. Matériel végétal

L'olivier est un arbre typiquement méditerranéen, qui appartient à la famille des Oleaceae.

#### Figure 1.

Dans le genre *Olea*, l'olivier (*Olea europaea* L.) possède la plus grande distribution géographique, et plusieurs sous-espèces ont été décrites (Médail *et al.*, 2001). La classification botanique de l'arbre de l'olivier selon (Ghedira, 2008 ; Basim *et al.*, 2017) est la suivante :

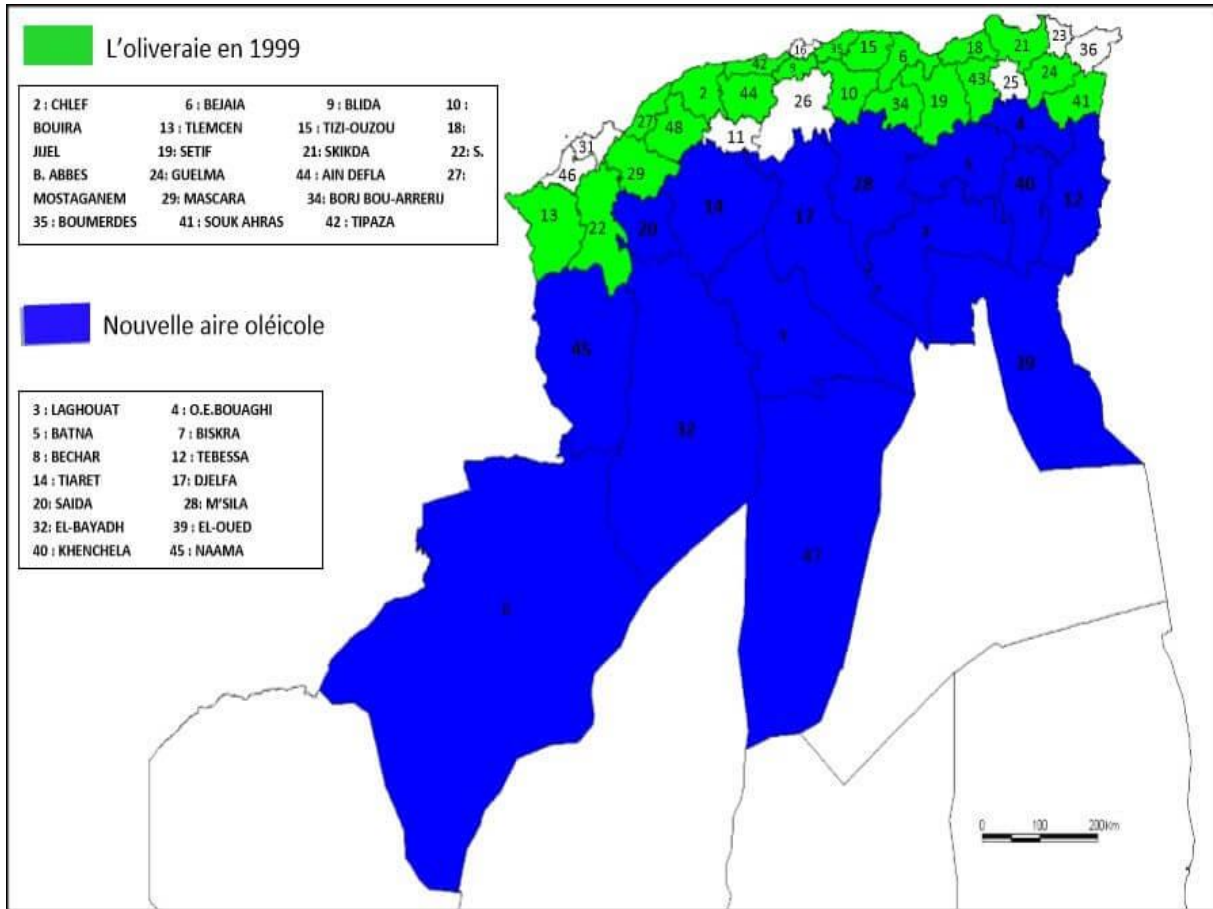
**Tableau I** : Classification d'*Olea europaea* L (Ghedira, 2008 ; Basim *et al.*, 2017)

Règne	<b>Plantae.</b>
Embranchement	Magnoliophyta.
Sous – embranchement	Magnoliophytina.
Classe	Magnoliopsida
Sous Classe	Dialypétales
Ordre	Lamiales
Famille	Oleaceae
Genre	<i>Olea</i>
Espèce	<i>Olea europaea</i> L.



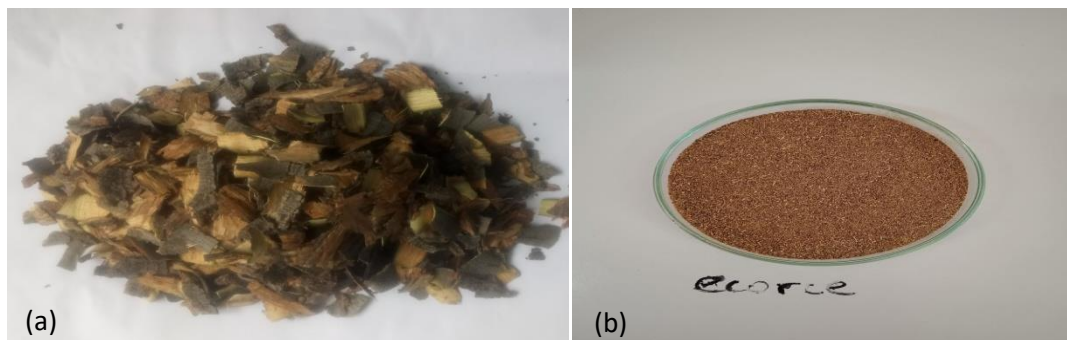
**Figure 1** : (a) l'olivier (*Olea europaea* L.) ; (b) les racines et l'écorce, (Originale 2022).

Les racines et l'écorce d'olivier sont récoltées en mars 2022 de la région de Mansoura (wilaya de Bourj Bou Arreridj).

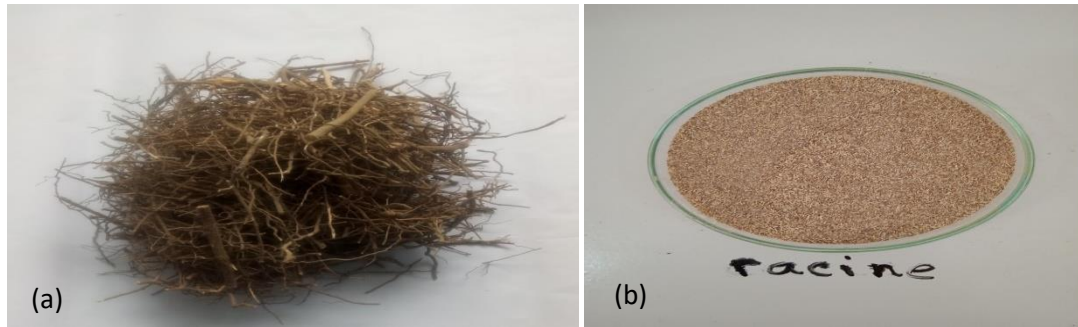


**Figure2** : Carte oléicole d'Algérie (Source : Institut Technique des Arbres Fruitiers, ITAF, 2008).

L'écorce et les racines fraîches lavées à l'eau claire et séchées à l'air libre pendant une semaine puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Les poudres obtenues sont tamisées à l'aide d'un tamiseur et conservées dans des boîtes à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à leur utilisation ultérieure.



**Figure 3:** (a) Ecorce d'olivier ; (b) poudre d'écorce .



**Figure 4:** (a) les racines d'olivier ; (b) Poudre des racines.

### **I.1.2. Réactifs chimiques**

Acide ascorbique, Acide linoléique, Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Chloroforme, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), Folin-ciocalteu, Quercétine, Acide gallique, Méthanol, Trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), Tween 40,  $\beta$ -carotène, Tampon phosphate (Dihydrogénophosphate de sodium  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ; Hydrogénophosphate de sodium  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ) et Peroxyde d'hydrogène 30% ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### **I.1.3. Appareillage**

- Rotavapeur (BÜCHI).
- Spectrophotomètre UV-visible.
- Centrifugeuse
- Etuve.
- Agitateur magnétique.
- Vortex.
- Micropipettes
- Balance de précision.
- Différents verrerie (ballon, bécher, entonnoirs, erlenmeyer...etc).

## **I.2. METHODES**

### **I.2.1. Préparation des extraits**

Les extraits méthanolique et aqueux sont préparés par la méthode de macération à froid.

Une quantité de 15g de la poudre des racines ou de l'écorce est immergée dans 150ml méthanol ou l'eau distillée. Le mélange est agité pendant quelques minutes puis incubé à l'obscurité pendant 24 h. Les extraits sont récupérés après filtration du mélange à l'aide d'un



papier filtre (filtration deux fois), les filtrats obtenus sont ensuite concentrés avec un évaporateur rotatif à 40°C. Les extraits sont séchés dans l'étuve à 39°C pendant 2-3 jours.



**Figure 5 :** Extraction par macération.



**Figure 6 :** évaporateur rotatif

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait brute et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$\% = (\text{Poids d'extrait brut} / \text{Poids de la plante sèche}) \times 100$$

## **I.2.2. Analyse des extraits d'olivier**

### **I.2.2.1. Dosage des composés phénoliques**

L'estimation de la teneur en composés phénoliques contenus dans les extraits est déterminée par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de (Li *et al.*, 2007), avec quelques modifications.

#### **❖ Principe**

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968).

Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé *et al.*, 2005).



**Figure 7:** Changement de couleur due à une réduction du molybdate d'ammonium(Jaune) avec le noyau phénol du réactif de Folin (Bleu) (Agbor *et al.*, 2014).

#### **❖ Mode opératoire**

1ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200  $\mu$ l d'échantillon avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800  $\mu$ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 90 min d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

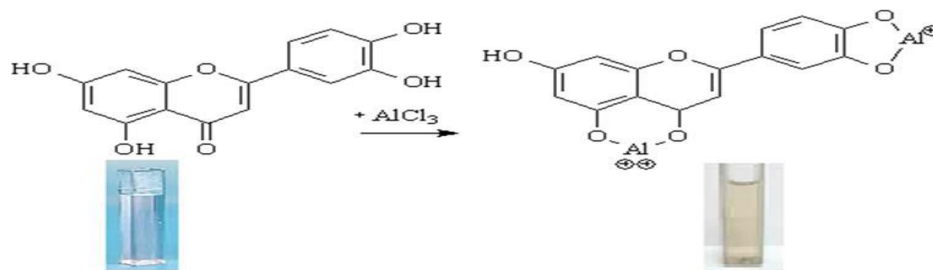
La droite d'étalonnage a été réalisée par l'acide gallique (5-200 $\mu$ g/ml), en suivant les mêmes étapes de dosage. Les teneurs en polyphénols totaux sont déterminées à partir de la droite de régression de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en  $\mu$ g équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EAG/mg d'extrait).

### I.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun *et al.*, 1996**).

#### ❖ Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Mbaebie *et al.*, 2012**).



**Figure 8** : Réaction entre  $\text{AlCl}_3^+$  et les flavonoïdes

#### ❖ Mode opératoire

1ml d'échantillon est ajouté 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (1.5-40  $\mu\text{g/ml}$ ). Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait).

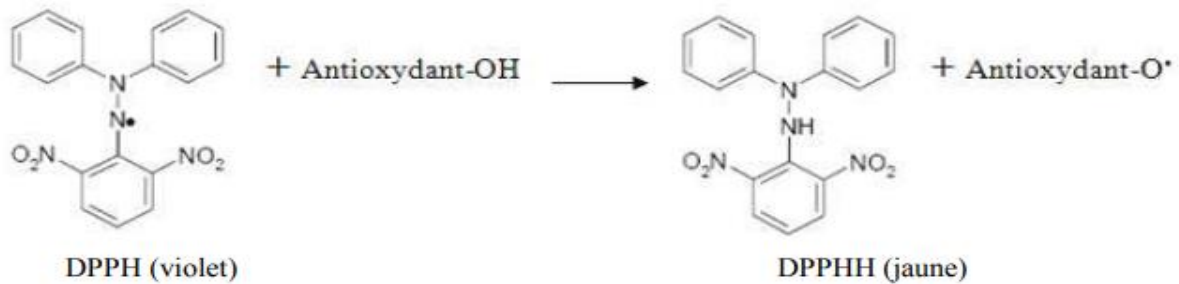
### I.2.3. Etude de l'activité antioxydante

#### I.2.3.1. Piégeage du radical DPPH•

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH• comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri *et al.* (2005) avec quelques modifications.

## ❖ Principe

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazol (DPPH) est un radical libre stable. L'effet des antioxydants sur ce radical se traduit par leurs capacités à lui donner un atome d'hydrogène. La réduction de DPPH est déterminée par le changement de couleur du violet vers le jaune, le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazine.



**Figure 9** : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH• (Congo, 2012)

## ❖ Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 50  $\mu$ L des solutions d'extraits ou standards (Acide ascorbique) sont ajoutés à 1950  $\mu$ L DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{d'activité antiradicalaire} = \left[ \frac{\text{Abs contrôle}(-)_{517} - \text{Abs échantillon}_{517}}{\text{Abs contrôle}(-)_{517}} \right] \times 100$$

### I.2.3.2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits est déterminée selon la méthode de Kartal et al (2007) avec quelques modifications.

## ❖ Principe

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$  carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est mesurée à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux



libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$  carotène.

#### ❖ **Mode opératoire**

L'émulsion de  $\beta$ -carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 2 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml du chloroforme, 25  $\mu$ l de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. 350  $\mu$ L des solutions d'extraits ou d'antioxydants de référence (Acide ascorbique) solubilisé dans du méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350 $\mu$ l de méthanol) est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant les 4 premières heures, puis après 24 heures et 48 heures.

Les pourcentages d'inhibition de blanchiment de la  $\beta$ -carotène ont été calculés par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{Abs E}_{t=48h} - \text{Abs C}_{t=48h}) / (\text{Abs C}_{t=0h} - \text{Abs C}_{t=48h})] \times 100$$

Tel que :

**Abs E<sub>t=48h</sub>**: Absorbance de l'échantillon à T = 48 h

**Abs C<sub>t=48h</sub>**: Absorbance du contrôle négatif à T= 48h

**Abs C<sub>t=0h</sub>**: Absorbance du contrôle négatif à T = 0h

#### **I.2.3.3. Test de l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène.**

L'effet protecteur des extraits des racines et de l'écorce d'olivier contre l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène est évalué selon le protocole décrit par Manna et *al.* (2002) avec quelques modifications.

❖ **Prélèvement sanguin et préparation de l'hématocrite**

Le sang humain utilisé dans ce test est obtenu par prélèvement veineux au pli du code de volontaires seins et non fumeurs. Le sang collecté dans un tube hépariné est centrifugé à 3900rpm/12min/ à température ambiante, après élimination du plasma, le culot est lavé deux fois par un tampon phosphate (NaCl 125 mM, phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4). Pendant chaque lavage, la suspension est homogénéisée par un simple retournement du tube. Le surnageant et la couche d'interface sont éliminés juste après la centrifugation. À l'issue de la dernière centrifugation le culot cellulaire obtenu est dilué avec le même tampon phosphate pour obtenir un hématocrite de 2%.

❖ **Mode opératoire**

200µl d'extrait (2mg/ml) sont ajoutés à 200µl de la suspension érythrocytaire préalablement préparée, mélangée avec 100µl de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 et 6mmol/L) dissous dans PBS. Après 90 min d'incubation à 37C°, 8ml de PBS sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange réactionnel est centrifugé à 3900rpm/12min/ à température ambiante et l'hémolyse (libération d'hémoglobine) est évaluée en mesurant l'absorbance du surnageant à 540 nm. Le tube contrôle contient le même milieu réactionnel sauf l'extrait qui est remplacé par le même volume de PBS.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse (IH) est calculé à partir de l'équation suivante :

$$\% \text{ IH} = [(\text{Abs}_{\text{contrôle(-)}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}) / \text{Abs}_{\text{contrôle(-)}}] * 100$$

**I.2.4. Analyses statistiques**

Les résultats des tests sont exprimés en moyenne ± SD. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les analyses statistiques sont effectuées par le logiciel (Graph Pad Prism9). Le test t de Student a été utilisé lorsque seulement deux groupes de traitement sont comparées. La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test ANOVA univariée suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de  $p \leq 0.05$  sont considérées statistiquement significatives.

## ***Chapitre II : Résultats et Discussion***

## II.1. Les rendements.

Quatre différents extraits ont été obtenus : l'extrait méthanolique des racines (EMer), l'extrait aqueux des racines (EAqr), l'extrait méthanolique de l'écorce (EMeé) et l'extrait aqueux de l'écorce (EAqé). Les rendements sont donnés dans le **Tableau II**

**Tableau II** : Aspects, couleurs et rendements des extraites d'olivier.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
			poids/poids sec de la plante
EMer	Poudre	Orange	8,53
EAqr	Poudre	Marron foncé	7,46
EMeé	Poudre	Marron	8,86
EAqé	Poudre	Marron foncé	9,13

Les données du **tableau II** montrent que le rendement *des* extraits aqueux et méthanolique des racines et de l'écorce sont rapproché, cela s'explique probablement par le fait que le méthanol possède un degré de polarité proche à celui de l'eau distillée. L'extrait EAqé représente le rendement le plus élevé (9,13%), suivi par l'EMeé (8,86 %), l'EMer (8,53%) puis l'EAqr (7,46%).

Des résultats similaires sont rapportés par Faraone et son équipe (2021) qui ont préparé les extraits hydro éthanolique (éthanol: eau) (70:30 v/v) de bois et de l'écorce par macération. Les résultats obtenus montrent que le rendement d'extraction de l'écorce (8 %) est très proche à celui obtenu dans notre étude.

Mohareb et ses collègues (2017) ont préparé des extraits acétonique à partir de l'écorce d'olivier provenant de différentes régions, les résultats obtenus montrent que le rendement varie selon l'altitude (les rendements sont 4,80%, 4,88% et 3,85% à 125m, 391m et 851m d'altitude respectivement).

De ce fait, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relative et semble être lié aux propriétés génétiques ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées (le type de solvant, température et durée d'extraction, le rapport soluté solvant).

## II.2. Analyse des extraits d'olivier

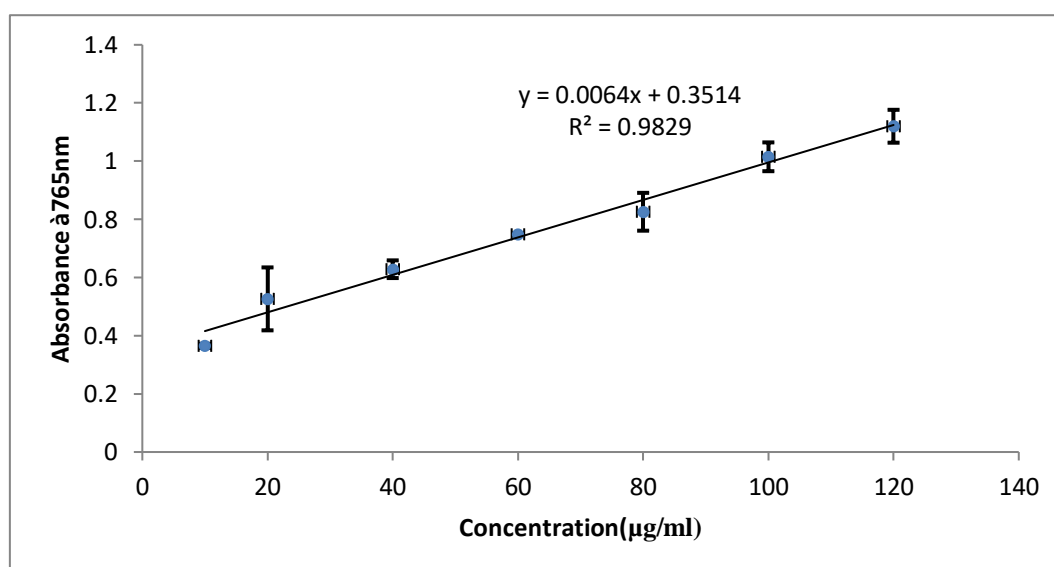
### II.2.1. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes.

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des racines et de l'écorce *d'olea europaea* un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués (Zhang et Tsao, 2016).

La méthode de dosages des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium en utilisant comme standard la quercétine.

Les courbes d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine sont identifiées dans les figures 10 et 11, respectivement.

Les résultats des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits sont résumés dans le tableau III.



**Figure 10 :** Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne  $\pm$  SD de deux essais).

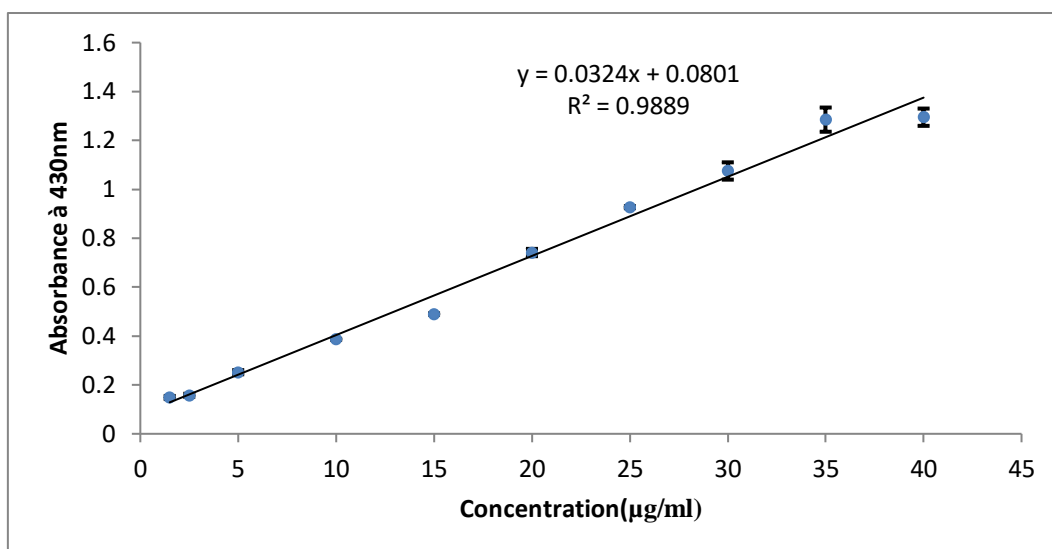


Figure 11 : Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne  $\pm$  SD de deux essais).

Tableau III : Teneur des polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extrais des racines et l'écorce d'olivier.

Extrait	Polyphénols (a)	Flavonoïdes (b)
EMer	509,33 $\pm$ 199,87	2,97 $\pm$ 1,87
EAqr	167,5 $\pm$ 6,36	8,40 $\pm$ 1,90
EMeé	387,33 $\pm$ 48,08	7,41 $\pm$ 1,04
EAqé	210 $\pm$ 27,81	7,92 $\pm$ 0,93

(a)  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

(b)  $\mu\text{g}$  d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne 2 à 3 mesures  $\pm$  SD.

Les résultats obtenus montrent que le taux des polyphénols totaux varie entre les quatre extraits. En effet, l'extrait méthanolique des racines est le plus riche en polyphénols totaux avec une teneur de (509.33 $\pm$ 199.87  $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait) suivi par l'extrait méthanolique de l'écorce (387.33 $\pm$ 48.08  $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait), l'extrait aqueux de l'écorce contient (210 $\pm$ 27.81  $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait), tandis que l'extrait aqueux des racines ne contient que (167.5 $\pm$ 6.36  $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait).

Les résultats du dosage des flavonoïdes montrent que les EAqr, EAqé et EMeé sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs de ( $8.40 \pm 1.90 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$ ), ( $7.92 \pm 0.93 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$ ) et ( $7.41 \pm 1.04 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$ ) respectivement. Cependant seulement ( $2.97 \pm 1.87 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$ ) sont trouvés dans l'EMer.

Faraone et son équipe (2021) ont mesuré la teneur de l'extrait hydroéthanolique de bois et de l'écorce en polyphénols. Les résultats obtenus montrent une faible quantité des polyphénols par rapport aux résultats obtenus dans le présent travail ( $130\text{mgEAG/g}$  et  $125\text{mgEAG/g}$ ) respectivement.

Cependant, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction (Trabelsi *et al.*, 2010), des courbes d'étalonnage (quercétine, rutine, cathéchine) et les parties des plantes étudiées, réduisent la fiabilité de la comparaison entre les études. Des études récentes ont montré que les teneurs en composés phénoliques changent de façon considérables d'une espèce à une autre et à l'intérieur de la même espèce (Ksouri *et al.*, 2009), à cause des facteurs extrinsèques (température, climat...) (Ksouri *et al.*, 2008), génétiques (la variétés et l'origine d'espèces) (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008), physiologiques ( le degré de maturation de la plante, nature des organes) et de la durée de stockage (Maisuthisakul *et al.*, 2007).

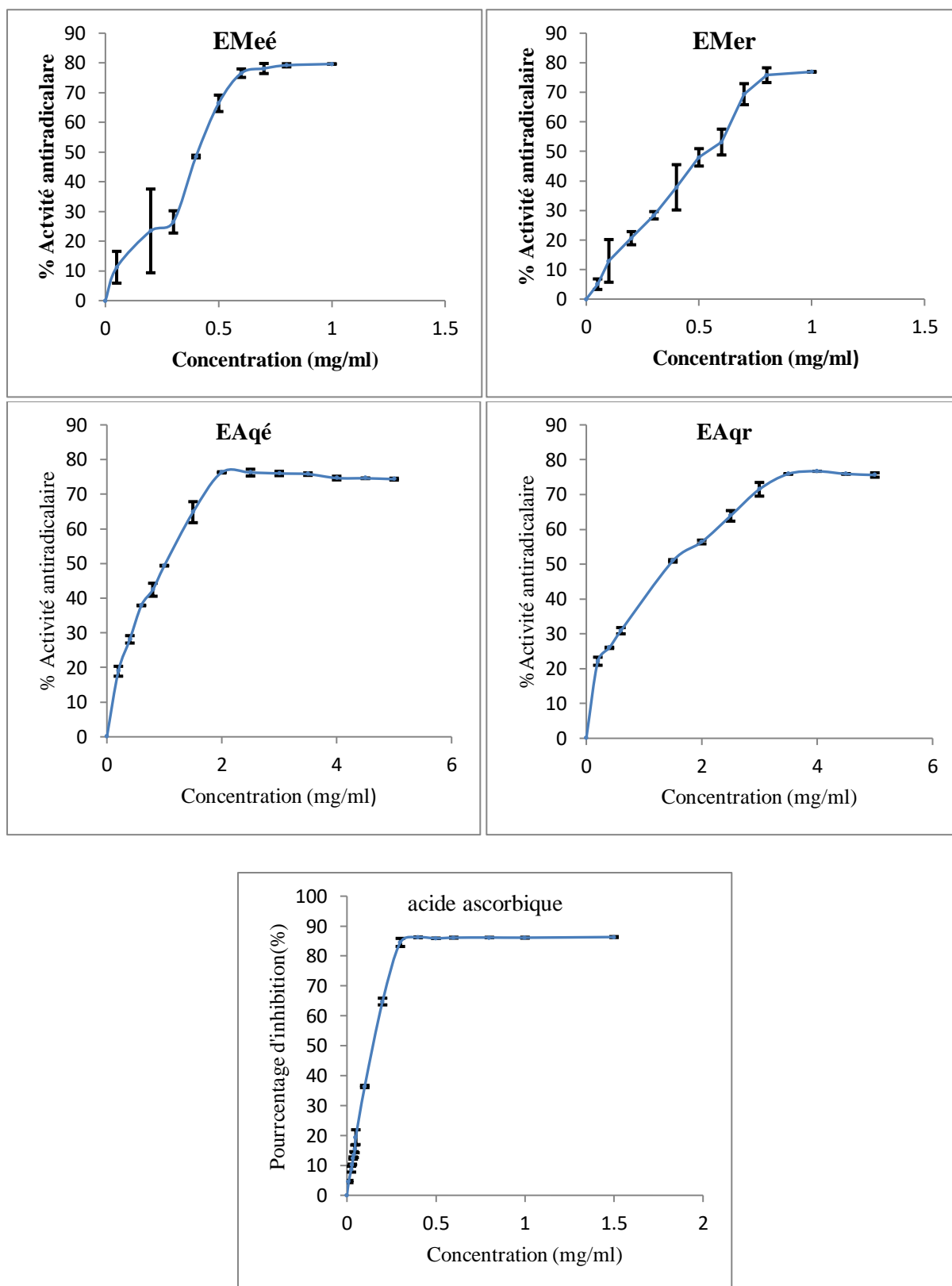
### II.3. Tests, *in vitro*, de l'activité antioxydante

#### II.3.1. Piégeage du radical DPPH•

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical synthétique présentant, à l'état oxydé, une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturée en contact d'antioxydants, ce qui explique la disparition de sa coloration. Cette décoloration explique le pouvoir de l'antioxydant à piéger ce radical (Ghazghazia *et al.*, 2013).

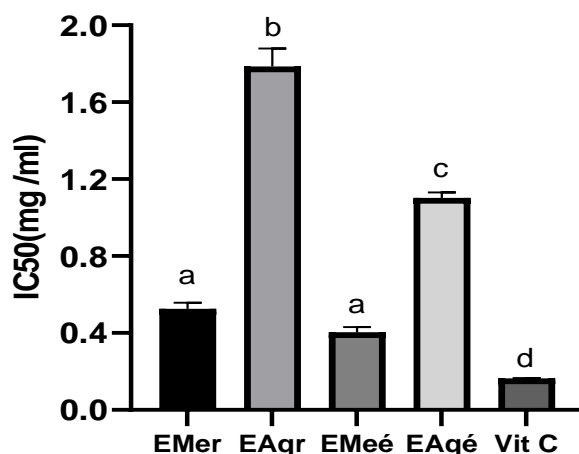
L'activité antioxydante des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus (Figure 12) révèlent que les extraits de racines et de l'écorce possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les  $IC_{50}$  de chacun des extraits ont été déterminées (figure 13).



**Figure 12 :** Activité antiradicalaire des extraits des racines et de l'écorce *d'olea europaea* et de l'acide ascorbique (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais  $\pm$  SD).





**Figure13:** IC50 des différents extraits et de l'acide ascorbique. Les barres avec des lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

Les deux extraits méthanoliques EMeé et EMer sont les plus actifs et montrent une activité antioxydante supérieure à celles des extraits aqueux EAqé et EAqr. En effet, l'EMeé et l'EMer montrent des IC50 faibles et statistiquement similaires de l'ordre ( $0.404 \pm 0.02$  mg/ml) et ( $0.525 \pm 0.03$  mg/ml) respectivement. En outre, l'EAqé montre une IC50 de l'ordre de ( $1.102 \pm 0.02$  mg/ml), cette valeur est significativement inférieure ( $P < 0.001$ ) à celle de l'EAqr ( $1.786 \pm 0.09$  mg/ml), qui représente l'extrait le moins actif.

À des fins comparatives, un antioxydant standard a été utilisé (l'acide ascorbique). Il a montré une activité antiradicalaire très puissante statistiquement supérieure à celle des extraits étudiés avec une IC50 très faible de l'ordre ( $0.164$  mg/ml).

ADDAB et ses collaborateurs (2020) ont étudié l'effet antioxydant des extraits éthanoliques des feuilles d'*Olea europaea L.*, récoltées de différentes régions de l'Est algérien sur le radical DPPH. Ils ont trouvé une activité d'oxydation très faible par rapport aux extraits de l'écorce et des racines avec des IC50 élevés de l'ordre ( $84.74$  mg/ml,  $87.02$  mg/ml,  $92.15$  mg/ml et  $102.50$  mg/ml).

L'activité antioxydante des extraits d'olivier est probablement attribuée à leurs richesses en polyphénols. Il existe en fait une corrélation linéaire significative entre l'activité antiradicalaire des quatre extraits étudiés et leur teneur en composés phénoliques ( $r^2 = 0.75$ ,  $P < 0.05$ ).

Les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires (Zhang et Tsao, 2016).

### II.3.2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

La cinétique de blanchissement du  $\beta$  carotène en absence et en présence des extraits d'olivier, de l'antioxydant standard (acide ascorbique) et les pourcentages d'inhibition de blanchiment de la  $\beta$ -carotène des extraits d'olivier et l'acide ascorbique sont représentées dans les figures 14 et 15.

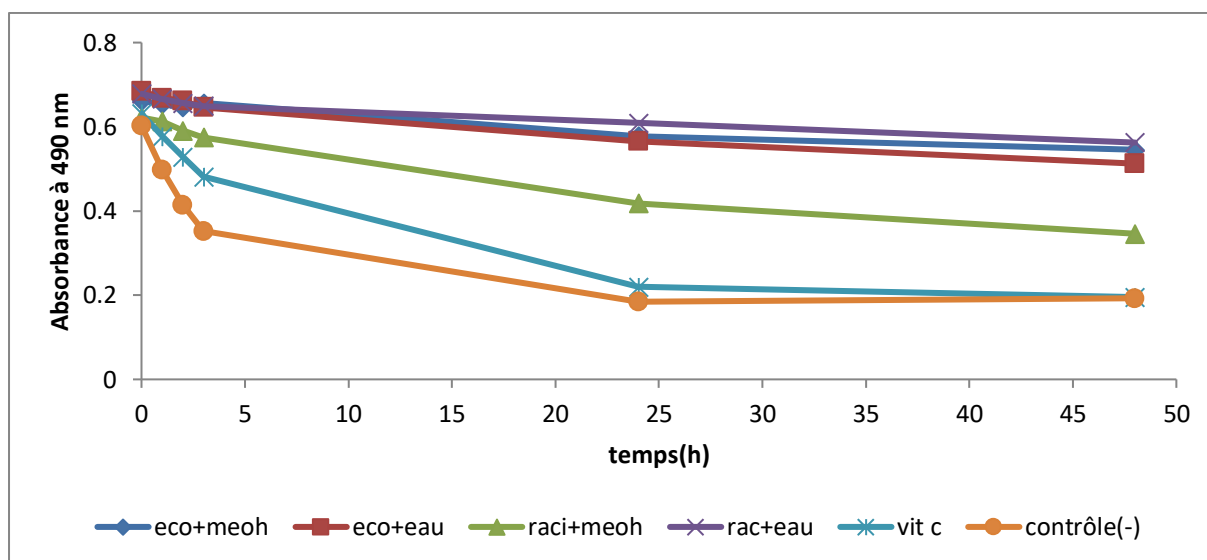


Figure 14 : Cinétique de blanchissement du  $\beta$  carotène à 490nm en absence et en présence des extraits d'olivier et de l'acide ascorbique. (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

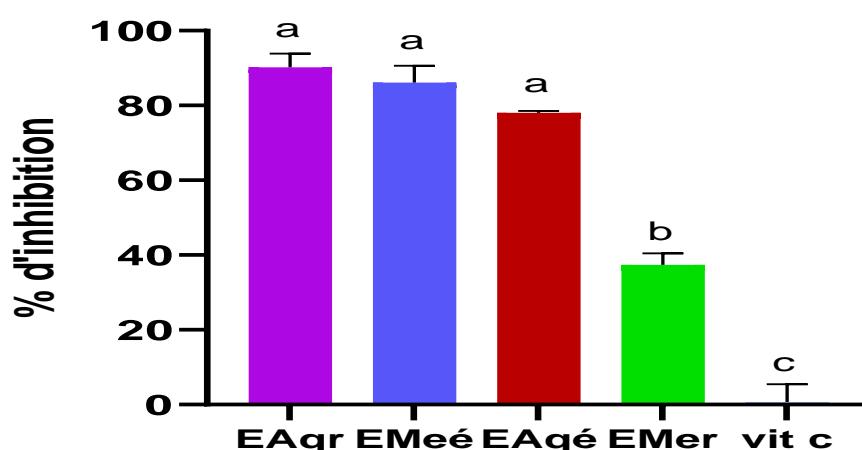


Figure 15 : Les pourcentages d'inhibition de blanchiment de la  $\beta$ -carotène des extraits d'olivier et l'acide ascorbique. Les barres avec des lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ( $P < 0.0001$ ).

D'après ces résultats, il est évident que les quatre extraits testés inhibent d'une manière efficace et significative ( $p \leq 0,01$ ) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$  carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation.

Les extraits EAqr, EMeé et L'EAqé montrent les plus grandes activités inhibitrices ( $90.19 \pm 3.68\%$ ), ( $86.15 \pm 4.49\%$ ) et ( $78.05 \pm 0.5\%$ ) respectivement. Etant donné qu'il n'existe pas une différence significative entre ces trois extraits, la valeur moyenne d'activité est 84.8%, cette activité est significativement supérieure ( $P < 0.001$ ) à celle de l'EMer ( $37.40 \pm 3.06\%$ ) qui représente une activité antioxydante intermédiaire. En effet, une corrélation linéaire remarquable et significative a été mise en évidence entre les pourcentages d'inhibition de blanchiment de la  $\beta$ -carotène des extraits et leurs teneurs en flavonoïdes ( $r^2 = 0.95$  ;  $P < 0.05$ ).

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (**Liyana-Pathirana et al., 2006**). Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (**Ferreria et al., 2006**).

L'activité des quatre extraits d'olivier est statistiquement supérieure à celle de l'acide ascorbique ( $0.67 \pm 4.81\%$ ). La faible activité exercée par l'acide ascorbique (vitamine hydrosoluble) s'explique par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par Frankel et ses collaborateurs (1994). Etant donné que le test de blanchissement du  $\beta$  carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, Frankel et Meyer (2000) ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

### **II.3.3. Test de l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène.**

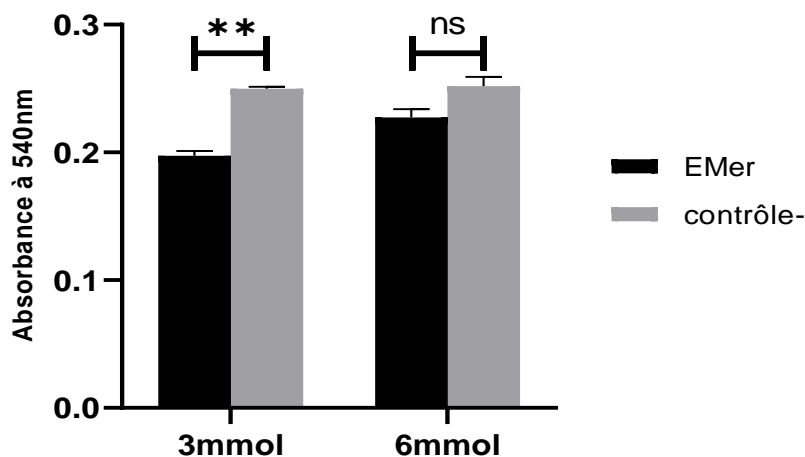
Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydant. En raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en l'hémoglobine, ces cellules sont extrêmement

susceptibles aux endommagements oxydatifs (**Arbos et al., 2008 ; Çimen, 2008**). L'exposition des érythrocytes à une attaque radicalaire conduit donc à la rupture de leurs membranes plasmiques avec libération du contenu cellulaire mesurable à 540 nm.

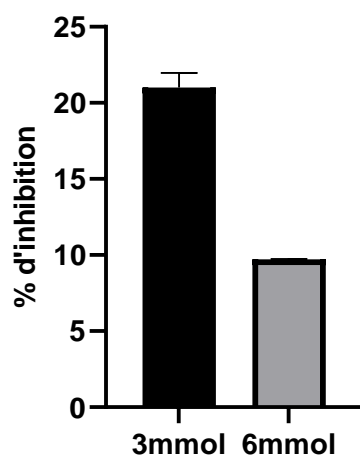
Ce système cellulaire aurait pu être très utile pour l'étude de l'effet protecteur des extraits des racines et de l'écorce d'olivier contre l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène. Cependant, ce test n'a pas pu être réalisé avec les extraits (EAqé, EAqr et EMeé), car on a constaté que ces extraits eux mêmes provoquent une hémolyse importante des erythrocytes avant l'exposition à l'attaque radicalaire. L'effet hémolytique des extraits est probablement attribué à la présence des saponosides, ces résultats se concordent avec les travaux de Mebirouk-boudechiche et son équipe (2014) qui ont mesuré les teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles de neuf arboristes fourragers y compris *olea europeae*. Les résultats montrent que les feuilles d'olivier possèdent une activité hémolytique (16,5 %) avec une teneur en saponines de l'ordre de 19,45 g équivalent diosgénine/kg MS).

Selon la littérature, l'effet hémolytique des extraits de plantes est attribué à la présence des saponosides (**Chwalek, 2004**). Ces composés, connus depuis très longtemps pour leur propriété tensioactive (solution moussante dans l'eau) ou encore leur capacité à lyser les globules rouges, sont des métabolites secondaires de nature amphiphile (**Sparget al., 2004**). Le mécanisme hémolytique des saponosides est dû à la formation d'un complexe avec le cholestérol membranaire formant des structures assimilables à des pores ou des puits, altérant ainsi la perméabilité membranaire et conduisant à la destruction du globule rouge (**Sparget al., 2004**).

Le seul extrait testé dans l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène est l'extrait méthanolique des racines. L'absorbance et le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse de l'extrait méthanolique des racines en fonction des différentes concentrations de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont portés sur les **figure16** et **17**



**Figure 16:** L'absorbance de l'hémoglobine en présence de l'extrait méthanolique des racines en fonction des différentes concentrations de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figure 17:** Les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse par l'EMer en fonction des différentes concentrations de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les résultats obtenus montre que l'EMer exerce une inhibition significative ( $P < 0.01$ ) de l'hémolyse oxydative (21%) induite par 3mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cependant cette inhibition est non significative pour 6Mm de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9.72%).

L'effet antihémolytique de l'EMer est attribué probablement à sa richesse en polyphénols, ce qui est en accord avec les travaux de Manna et ses collaborateurs (1999) ont trouvé que l'hydroxytyrosol d'huile d'olive prévient l'hémolyse des érythrocytes humains induits par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

D'après Bonarska-kujawa et ses collaborateurs (2011), les composés phénoliques s'incorporent dans la couche hydrophile externe et n'ont aucun effet sur la fluidité de la partie hydrophobe. Ainsi l'action protectrice des ces composés en ce qui concerne les membranes biologiques dépend du taux d'incorporation dans la partie hydrophile de cette dernière.

L'incorporation des composés phénoliques de l'extrait dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier protecteur de la cellule vis-à-vis des substance s'agressives exogènes, tels que les radicaux libres (**Louered *et al.*, 2016**).

## *Conclusion et perspectives*

## Conclusion :

En raison de la toxicité des antioxydants synthétiques, il est nécessaire de rechercher des antioxydants naturels . L'olivier est l'une des plantes médicinales les plus utilisées en médecine traditionnelle. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis d'avoir une idée sur le profil phytochimique et la capacité antioxydante des racines et de l'écorce d'olivier

L'estimation quantitative des polyphénols totaux des extraits d'olivier par la méthode de folin-ciocalteu révèle la richesse des extraits EMer et EMeé en polyphénols. Effectivement, le test au DPPH révèle que ces deux extraits sont les plus actifs comme piègeurs du radical DPPH.

L'estimation quantitative des flavonoïdes des extraits d'olivier par la méthode de trichlorure d'aluminium révèle la richesse des extraits EAqr, EAqé et EMeé en flavonoïdes. De même, le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène a montré également que ces trois extraits sont les extraits les plus actifs comme inhibiteurs de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène.

L'EMer possède un effet protecteur contre l'hémolyse oxydative induite par  $H_2O_2$ . Néanmoins, ces résultats obtenus *in vitro* restent préliminaire et ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances bioactives dans les racines et l'écorce d'olivier. Une étude *in vivo* est nécessaire pour obtenir une vue plus approfondie sur les propriétés antioxydantes des extraits étudiés.

Enfin, il faut noter qu'il y a peu de travaux sur les racines et l'écorce d'olivier, ce qui laisse la porte ouverte pour les prochaines recherches afin d'identifier les classes de composés phénoliques impliquées dans l'activité étudiée, identifier et isoler des composés de cette plante par des techniques plus performantes comme HPLC et la spectrométrie de masse actifs, évaluer la toxicité et le dosage appropriés des traitements à base de cette plante.



## *Références Bibliographiques*

**A**

**Addab, N., Fetni, S., Hamlaoui, F., Zerguine, A., Mahloul, K. (2020).** Evaluation comparative de l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques des feuilles d'Olea europaea L. de l'Est Algérien. *Journal de la faculté de médecine d'Oran*. <https://doi.org/10.51782/jfmo.v4i2.106>.

**Agbor G.A., Jeo V.A.&Patreck D.E., 2014:**Folinreagents for polyphenolseassay ,147-156.

**Amouretti, M.C., Comet, G. (1985).** *Le livre de l'olivier*. Paris,France: Edisud. 176 p.

**Arbos, K.A., Claro, L.M., Borges, L., Santos, C.A.M., Weffort-Santos, A.M. (2008).** Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*. **28**: 457–463.

**B**

**Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Basim, E., Basim, H., Abdulai, M., Baki, D., Oztürk, N. (2017).** Identification and characterization of *Alternaria alternata* causing leaf spot of olive tree (*Olea europaea*) in Turkey. *Crop Protection*. (92): 79-88.

**Bonarska-kujawa ,D., Pruchnik, H., Oszmianski, J., Sarapuk, J., Kleszczynska, H. (2011).** Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics*; 6(1), 58–67.

**Bouaziz M. and Sayadi S. (2003).** Hightyield extraction of oleuropein from chemlali olive and leaves and bioconversion to hydroxytyrosol. *Polyphénols actualités* **23**,11-15

**C**

**Chwalek, M. (2004).**Hémisynthèse de saponosides à hédragenine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Reims Champagne-Ardennes. France.

**Çimen, M.Y.B. (2008).** Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. **39**: 1-11.

**Congo M. (2012).** Etude des propriétés anti radicalaire et anti proliférative d'extraits de feuille et de rameausc de *Salvadora perscia* L (*salvadora ceae*). Thèse de pharmacie, université d'Ouagadougou Burkina Faso, p 42.

**Curtin, JF., Donovan, M., Cotter, TG. (2002).** Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J ImmunolMethods*. Jul 1;265(1-2):49-72.

**D**

**Deaton, C-M., Marlin, D-J. (2003).**Exercise-Associated Oxidative Stress.Clinical Techniques in Equine Practice. Vol 2. 3: 278-291.

**E**

**Ebrahimzadeh MA, Pourmorad F, Bekhradnia AR.(2008).** Iron chelating activity screening, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7(18): 3188-3192.

**F**

**Faraone, I., Russo, D., Bruno, M. R., Todaro, L., D’Auria, M., & Milella, L. (2021).** Focus on *Olea europaea* L. pruning by-products : extraction techniques, biological activity, and phytochemical profile. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(6), 1835-1849.

**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.

**Frankel, E. N., Huang, S.-W., Kanner, J., German, J.B. (1994).** Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **42**:1054-1059.

**Frankel, E.N., Meyer, A.S. (2000).** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 1925-1940.

**G**

**Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, J.M. (2005).** Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 1370-1373.

**Ghazghazi H, Chedia A, AbderrazakM ,Brahim H (2013).** Comparaison des contenus en polyphénols et de l’activité antioxydante des extraits méthanolique de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *Microbiol Hyg Alim*. 25(73):37-41.

**Ghedira, K.(2008).** L’olivier, *Phytothérapie*. (6): 83–89.

**H**

**Hama Hamadou, H., Moussa, I., Ikhiri, Khalid.,Ouedraogo, B., Adamou, R. (2019).** Activité Antioxydante des Extraits Méthanoliques de Différents Organes de *Detarium microcarpum* Guill. & Perr. *European Scientific Journal*, 15(12), 159-171.

**Hashmi, M. A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U., & Perveen, S. (2015).** Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea*(Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-29.

**Hermes-Lima, M.( 2005).** Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, 319-368.

**K**

**Kalam, S., Singh, R., Mani,A., Patel, J., Naem,KF., &Pandey,A.(2012).** Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*, 1: 18-34.

**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.

**Kasraoui, F. Med. (2010).** L'olivier. Le site officiel de l'Ing. Med.p2-5.

**Khayat, S., Al-Zahrani, S H., Basudan, N., Al-Zahrani,N.H ., Subahi, J.A. (2018).** Chemical composition and in vitro antibacterial activities of traditional medicinal plant: *Olea* sp. *Biomedical Research*, 29 (5): 1037-1047.

**Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Hamdi B, Chaieb K, Bakhrouf A, Magné C, Abdelly C.( 2009).** Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8): 2083-2091.

**Ksouri , R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C.( 2008).** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus biologies*, 331(11): 865-873.

**L**

**LadohYemeda, C.F., Dibong, S.D., Nyegue, M.A., Djembissi, R.P., Lenta N.B., Mpondo M.E., Yinyang, J., Wansi, J.D. (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmantheracapitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*, 84, 7636-7643.

**Leverve, X. (2009).** Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 44 (5), 219-224.

**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. *Food chemistry*. **102**: 771-776.

**Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2006).** Antioxydant propertes of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivium* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**: 477-485.

**Louered, Y., hadi , R., kaid-harche, M. (2016).** Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale *Haloxylonscoparium* POMEL. *Journal of Bioresources Valorisation*.1(1), 28-33.

**Loussert R., Brousse G. (1978).** L'olivier, techniques agricoles et production méditerranéenne. G.p. Maisonneuve et Lotose, Paris.1-3, 58, 62-77,128-136

**Lykkesfeldt, J. (2007).** Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *ClinChimActa.* 380:50-8.

## **M**

**Maisuthisakul P, Pongsawatmanit R, Gordon MH. (2007).** Assessment of phenolic content and freeradical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100(4): 1409-1418.

**Manna, C., D'angelo, S., Migliardi, V., Loffredi, E., Mazzoni, O., Morrica, P., Galletti, P., Zappia, V. (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.

**Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Montedoro, G., & Zappia, V. (1999).** Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(3), 159-165.

**Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry.* **89:** 411-420.

**Mbaebie B.O., Edeoga H. O. &Afolayan A. J., 2012:** Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotialatifolia*Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*,118-124.

**Mebirouk-boudechiche, L., CHERIF, M., BOUDECHICHE, L., SAMMAR,F.(2014).** Levels of primary and secondary compounds of foliage from fodder shrubs of Algerian wet area. *Revue Méd. Vét.*, 165, 11-12, 344-352.

**Médail, F., Quézel, P., Besnard, G., Khadari, B., Systematics. (2001).** ecology and phylogeographic significance of *Olea europaea* L. subsp. *maroccana* (Greuter&Burdet) P. Vargas et al., a relictual olive tree in south-west Morocco. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 137:249–266.

**Missat, L. (2012).**Perspectives de développement de l'olivier dans les Monts des Ksour .Mémoire d'Ingénieur d'Eta, Université Abou Bekr Belkaid .102 pages.

**Mohareb, A. S., Kherallah, I. E., Badawy, M. E., Salem, M. Z., & Yousef, H. A. (2017).** Chemical composition and activity of bark and leaf extracts of *Pinus halepensis* and *Olea europaea* grown in AL-Jabel AL-Akhdar region, Libya against some plant phytopathogens. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng*, 3, 331-342.

## **P**

**Pandey KB &Rizvi SI. (2011).** Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomedical paper of medicine faculty- University Palacky Olomouc-Czech Republic*, 155: 131-136.

## Références bibliographiques

**Pandey, KB., Rizvi, SI. (2009).** Current Understanding of Dietary Polyphenols and their Role in Health and Disease. *Curr Nutr Food Sci.* 5:249-263.

**Pandey, KB., Rizvi, SI. (2010).** Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 3:2-12.

**Pereira, AP., Ferreira, IC., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, PB., Seabra, R. (2007).** Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molécules.* 12: 1153-1162. DOI: 10.3390/12051153

**Powers, S-K., Bradley, W-N., Hudson, M-B. (2011).** Exercise-induced oxidative stress in human: Cause and consequences. *Free Radical biology & Medicine.* 51: 942-950.

### R

**Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp.

**Rol, R., Jacamon M. (1988).** Flore des arbres, arbustes et arbrisseaux. Ed. La Maison rustique, Paris, p51.

**Roque, S., (1959).** Entomologie oléicole. Ed. COI. p360.

### S

**Sofowora, A., Cepleanu, F., Hostettmann, K. (2010).** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. France : KARTHALA.

**Somova, L.I., Shode, F.O., Ramnanan, P., Nadar, A. (2003).** Antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *J Ethnopharm.* 84: 299-305.

**Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J. (2004).** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology.* 94: 219-243.

### T

**Tang, S. Y., Halliwell, B. (2010).** Medicinal plants and antioxidants : What do we learn from cell. Culture and *Caenorhabditis elegans* studies?. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 394: 1-5.

**Trabelsi N, Megdiche W, Ksouri R, Falleh H, Oueslati S, Bourgou S, Hajlaoui H, Abdelly C, 2010.** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology,* 43(4): 632-639.

**Y**

**Yuhong L., Qingsheng L., Huiqing K., Chen Z., Xiong L., Qiuyan L. and Meiling L. (2006).** Study on using microwave to extract flavonoid antioxidants from olive leaves. *Journal written in Chinese* **8**, 111-114.

**Z**

**Zhang H, Tsao R (2016).** Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci.* 8:33-42.

## Abstract:

In recent decades, there has been a growing interest in the study of medicinal plants and their traditional use for the treatment of various diseases. The olive tree or *Olea europaea* L. is an inseparable entity of the Mediterranean peoples. This plant belongs to the large family of oleaceae. The objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of olive roots and bark (EAqr, EAqé, EMer and EMeé) respectively.

Determination of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method revealed the richness of the EMer and EMeé extracts in phenolic compounds, where the contents are respectively (509.33 µg EAG/ mg) and (387.33µg EAG/mg) of extract. In our work we were interested in the evaluation of the antioxidant activity of the extracts by two tests in vitro, DPPH radical scavenging method and test of bleaching of β-carotene. The quantitative evaluation of the scavenging power of the extracts vis-à-vis DPPH confirms that EMeé and EMer extracts are the most active with an IC50 of the order (0.404 mg/ml) and (0.525 mg/ml) respectively. In addition, in the β-carotene bleaching test, the extracts EAqr, EMeé and L'EAqé show the greatest inhibitory activities (90.19%), (86.15%) and (78.05%) respectively. The antioxidant activity of the extracts is confirmed on red blood cells, EMer is the only extract that has a protective effect against oxidative hemolysis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with a percentage of inhibition (21%)

From the results obtained in this work, it can be said that the roots and bark of olive trees possess a high antioxidant activity.

## Keywords:

- Antioxidant activity, phenolic compounds, olea sp, scavenging, oxidative hemolysis.

## المخلص

في العقود الأخيرة ، كان هناك اهتمام متزايد بدراسة النباتات الطبية واستخدامها التقليدي لعلاج الأمراض المختلفة. شجرة الزيتون أو *Olea europaea* L. هي كيان لا ينفصل عن شعوب البحر الأبيض المتوسط. ينتمي هذا النبات إلى عائلة كبيرة من oleaceae. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المائية والميثانولية لجذور و لحاء شجرة الزيتون (EAqr , EAqé , EMer , EMeé) على التوالي.

كشفت تحديد البوليفينول الكلي بطريقة فولين-سيوكالتيو عن ثراء المستخلصات الميثانولية للجذور و اللحاء بالمركبات الفينولية حيث تحتوي على 509.33 و 387.33 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/مغ مستخلص على التوالي. أكد التقدير الكمي للنشاطية الازاحية تجاه جذر DPPH بان المستخلصين الاكثر نشاطا هما EMer و EMeé (0.404 مغ / مل) و (0.525 مغ / مل) على التوالي. تثبيط الاكسدة المزدوجة لحمض لينولييك و بيتا-كاروتين بطريقة تفسخ بيتا-كاروتين اثبت ان المستخلصات EAqr و Emeé, EAqr هم الاكثر نشاطا (90.19٪), (86.15٪), و (78.05٪) على التوالي.

يتم تأكيد النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات خارج الجسم الحي على خلايا الدم الحمراء ، EMer هو المستخلص الوحيد الذي له تأثير وقائي ضد انحلال الدم التأكسدي الناتج عن H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> بنسبة تثبيط (21٪).

من النتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل، يمكن القول أن جذور و لحاء أشجار الزيتون تمتلك قدرة كبيرة من نشاطية المضاد للأكسدة.

## الكلمات الرئيسية

*olea europaea*, نشاط مضاد للأكسدة ، مركبات فينولية، انحلال الدم التأكسدي . الإزاحة.