

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi- Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En Sciences Biologiques
Option : Biochimie Appliquée

Thème

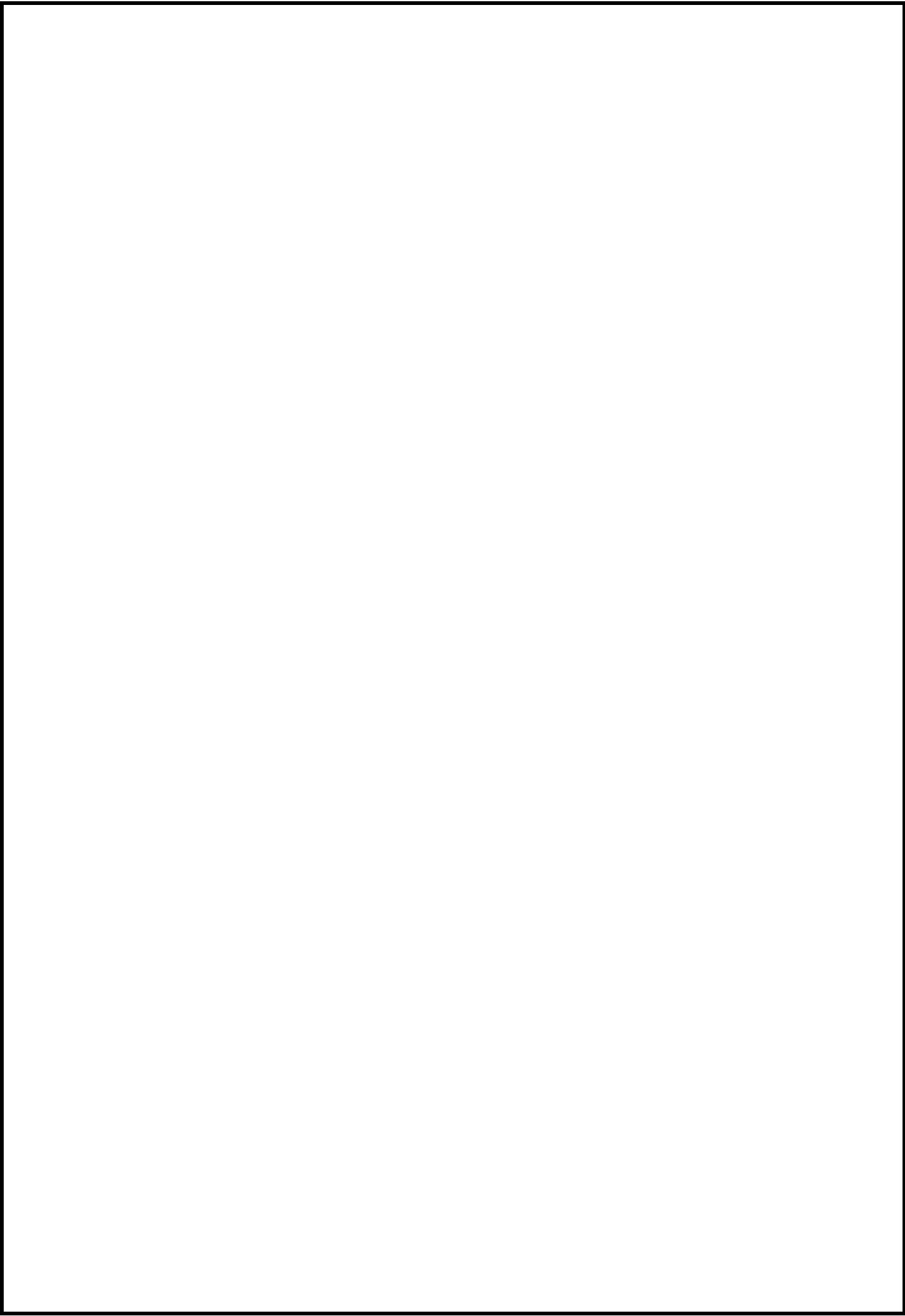
**Capacité anti-oxydante des polyphénols issus de l'olive et des margines
sur les fonctions du neutrophile humain dans les conditions de stress
oxydatif: Identification des cibles moléculaires de l'oleuropeine et de
l'hydroxytyrosol**

Présentée par : **BEDOUHENE-FENANE Samia**

Soutenue publiquement le : 17/ 01/ 2018

Devant le Jury :

Président	: Mr Karim HOUALI	Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Directrice de thèse	: Mme Farida MOULTI-MATI	Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Co-directeur	: Mr Jamel EL BENNA	Directeur de recherche (INSERM U1149), Faculté de Médecine Xavier Bichat, paris
Examineurs	: Mme Farida BENDALI	Professeur à l'université Abderrahmane Mira de Bejaia
	Mme Rosa BENABDESSALAM	Maitre de conférences Classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
	Mr Abdelouahab NOUANI	Professeur à l'université M'Hamed Bougara de Bumerdes



Remerciements

Je remercie ma directrice Farida MOULTI – MATI, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour m'avoir accepté de diriger mon travail de thèse, je tiens à lui adresser mes profonds remerciements pour son encouragement permanent, sa souplesse et sa disponibilité. Merci aussi pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ma thèse.

Je voudrais exprimer ma plus grande gratitude envers le Docteur Jamel El BENNA, Directeur de recherche Inserm U 1149, au sein du centre de recherche sur l'inflammation, laboratoire d'excellence. Faculté de Médecine Xavier Bichat à Paris pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de son dans le centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon à Paris sans aucune condition. Je le remercie infiniment pour sa disponibilité, sa générosité illimitée et sa patience incomparable. Ce fut un honneur pour moi de travailler dans une équipe où les valeurs humaines règnent.

Je remercie monsieur Abderrahmane MATI, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, et directeur du laboratoire de Biochimie Analytique et de biotechnologie. Je le remercie également pour les moyens qu'il a mis à ma disposition pour le bon déroulement de ma thèse, ses précieux conseils et sa bonne humeur.

Je dois remercier le docteur Oliver Nüsse pour m'avoir initié au monde du neutrophile et pour m'avoir orienté vers Jamel.

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce travail, pour vos propositions d'amélioration du manuscrit :

Je commence par le professeur Karim HOUALI, de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, que je remercie pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et pour ses conseils et encouragements.

Mme Farida BENDALI, Professeur à l'université Abderrahmane Mira de Bejaia pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Mme Rosa BENABDESSELAM Maître de conférences classe A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour avoir aimablement accepté de juger mon travail.

Mr Abdelouahab NOUANI Professeur à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes pour l'honneur qu'il me fait de faire partie du jury de ma thèse.

Je remercie les membres du labo d'accueil de l'unité 1149 de l'Inserm, centre de recherche sur l'inflammation et l'équipe de l'hôpital Bichat Bichat-Beaujon :

My Chan, je te remercie pour ta collaboration, tes précieux conseils et les questions scientifiques toujours enrichissantes que tu as su prodiguer face à nos résultats expérimentaux. Merci pour ton calme et ta discrétion. Merci également à Jean Claude Marie, Axel Périanin pour leurs discussions.

Merci à Margarita pour sa collaboration, sa gentillesse et son sourire permanent. Merci à l'équipe du laboratoire d'immunologie de l'hôpital Bichat-Beaujon pour leur disponibilité à chaque fois qu'ils sont sollicités.

Coralie Pintard, j'ai beaucoup apprécié ta compagnie, ta bonne humeur et ta gentillesse. Je suis ravie de t'avoir rencontré et je te remercie pour ta tolérance, ta générosité et ton amitié.

Je tiens également à remercier Viviana Marzaioli, post-doc, pour m'avoir initié au western Blot, les doctorants que j'ai croisé au cours de mes stages au labo : Loic, Tarek, Sahra, Abdelali, Hanane et Hasna.

Je remercie l'équipe du LABAB également pour leur agréable compagnie et leurs humeurs exceptionnelles: Dalila, Chahra, Djamila, Sarah, Lydia, Souad, Amel, Assia, Nassima, Samia,

Merci à mes amies kahina Ladj, Rym Tazdait, Lamia Bouadjla et samia Chabi pour leurs soutien permanent et leurs corrections.

Je n'oublie pas de remercier mes amies qui m'ont soutenue énormément au cours de Mes séjours à Paris particulièrement :

Claudette Hallery, merci énormément à toi et Sylvain pour tout ce que vous avez fait pour moi, merci Clo pour ton encouragement, le jardinage et les promenades distractives au parc de sceaux ...

Fabienne Pierre, un grand merci pour ton amitié inconditionnelle, ton écoute et soutien permanents et toutes les discussions professionnelles ou personnelles qu'on a eues.

Sophie Nicoleau Causse, un grand merci pour ton soutien, aide et ta gentillesse. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi.

Enfin, Je tiens à remercier tous les membres de ma famille qui m'ont épaulé et soutenu au cours de ces années de thèse :

Je remercie mon époux pour son soutien sa patience et sa compréhension. Merci pour ta précieuse présence à mes côtés et ton soutien dans tout mes choix. Merci d'être là pour moi. A mes parents, je vous remercie pour votre soutien au cours de cette thèse, pour votre compréhension et votre écoute.

Merci à mon papa et ma maman qui sont ma véritable source de force et d'énergie. Merci pour leur amour, leur soutien, vous êtes des parents exceptionnels. Mes sœurs Nadia, Rezika et Thanina merci pour vos conseils en toutes circonstances, votre soutien et votre précieuse amitié. Vous êtes et vous resterez les meilleures sœurs. Je remercie également mes deux frères Said et Massinissa pour leur présence à mes côtés à chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci pour tous les moments de bonheur que je partage avec vous au quotidien.

*« Nulle pierre ne peut être polie sans frictions, nul homme ne
peut parfaire son expérience sans épreuve »*

Confucius

Table des matières

TABLES DES MATIERES

	Pages
RESUME.....	1
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	3
LISTE DES FIGURES & DES TABLEAUX.....	5
INTRODUCTION GENERALE	7
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	10
I. Le neutrophile.....	10
1.1. Origine et formation du neutrophile	10
1.2. Les différentes granules du neutrophile.....	12
1.3. Les fonctions du polynucléaire neutrophile	15
1.3.1. Adhérence et migration tissulaire du neutrophile.....	16
1.3.2. Le chimiotactisme du neutrophile.....	18
1.4. Les mécanismes effecteurs des polynucléaires neutrophiles	20
1.5. La phagocytose.....	20
1.6. La bactéricidie.....	22
1.6.1. La production de formes réactives de l’oxygène par la NADPH Oxydase....	22
1.6.2. Les pièges extracellulaires des neutrophiles	27
1.7. Les voies de signalisation activées par le fMLP et le PMA.....	28
II. Les sous produits d’olive, les polyphénols et l’inflammation	31
2.1. Les margines d’olive et leurs intérêts.....	31
2.2. Définition de polyphénols.....	31
2.3. Biodisponibilité des polyphénols	34
2.4. Caractéristiques et propriétés chimiques de l’oleuropeine et de l’hydroxytyrosol.	36
2.5. Le régime méditerranéen, les polyphénols et l’inflammation.....	37
2.6. Les activités biologiques des pp d’olive	38
DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE	40
I. MATERIEL ET METHODES.....	40
1.1. MATERIEL	40
1.1.1. Les polyphénols totaux extraits des margines d’olives.....	40
1.1.2. L’oleuropéine et l’hydroxytyrosol	40
1.1.3. Le sang.....	40
1.2. METHODES	40
1.2.1. Méthodes d’isolement	40
1.2.1.1. Extraction des polyphénols à partir des margines d’olive	40
1.2.1.2. Isolement de neutrophiles	42
1.2.1.2.1. Isolement des neutrophiles par la méthode du Dextran-Ficoll.....	42
1.2.1.2.2. Isolement des neutrophiles par la méthode de l’histopaque	44
1.2.2. Méthodes de quantification	44
1.2.2.1. Détermination de la concentration des polyphénols totaux	45
1.2.2.2. Test de viabilité et de pureté des neutrophiles.....	45

1.2.2.3. Evaluation du pouvoir anti-oxydant des polyphénols d'olive : Mesure des différentes formes réactives de l'oxygène (FRO) produites par le PN en présence de polyphénols d'olive	45
1.2.2.3.1. Mesure de la Mesure de la production des formes réactives de l'oxygène totales par le luminol.....	46
1.2.2.3.2. Mesure de l'explosion oxydative des polynucléaires par réduction du cytochrome c.....	47
1.2.2.3.3. Mesure de l'explosion oxydative des polynucléaires par réduction du cytochrome c	48
1.2.2.3.4. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) dans le système acellulaire	49
1.2.2.3.5. Test de la xanthine oxydase	49
1.2.3. Les techniques évaluant les fonctions du neutrophile	50
1.2.3.1. La technique de dégranulation des neutrophiles.....	50
1.2.3.2. Test de chimiotactisme des neutrophiles	51
1.2.4. Étude des voies de signalisation du neutrophile.....	52
1.2.5. Electrophorèse des protéines (SDS-PAGE)	53
1.2.5.1. Préparation des échantillons et le gel d'électrophorèse.....	53
1.2.5.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose et révélation des protéines	54
1.2.5.3. Détection des protéines par des anticorps primaires spécifiques	54
1.2.5.4. Fixation des anticorps secondaires.....	54
1.2.5.5. La révélation des protéines à l'ECL (Enhanced Chemiluminescence)	55
1.2.5.6. Révélation des protéines à la phosphatase alcaline	55
1.2. 6. Analyse statistique des résultats	55
II. Résultats & discussion	57
2.1. Extraction et dosage des polyphénols d'olive issus des margines.....	57
2.2. Test de cytotoxicité de l'extrait total de polyphénols	57
2.3. Le pouvoir antioxydant de l'extrait phénolique de margines d'olive montré au niveau cellulaire « le neutrophile » et acellulaire	59
2.3.1. Effet de l'extrait de polyphénols sur la production des formes réactives de l'oxygène totales.....	59
2.3.2. Effet de l'extrait phénolique de margines d'olive sur la production de l'anion superoxyde au niveau du neutrophile	60
2.3.3. Effet des polyphénols sur la la production du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) intracellulaire par la cytométrie en flux.....	62
2.3.4. Piégeage de l'H ₂ O ₂ par l'extrait phénolique dans le système acellulaire.....	63
2.3.5. Effet de l'extrait phénolique sur l'O ₂ ^{-°} produit par xanthine oxydase	64
2.4. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la dégranulation, le	

chimiotactisme des neutrophiles et les voies signalisation dans les neutrophiles « AKT, p38MAPK et ERK1/2 ».....	65
2.4.1. Effets de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la viabilité des neutrophiles	65
2.4.2. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la production des FRO totales produites par les PN stimulés au fMLP	67
2.4.3. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la dégranulation des granules azurophiles par les neutrophiles mesurée par l'activité de la myéloperoxydase.....	69
2.4.4. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la libération des granules azurophile (Myéloperoxydase) et des granules spécifiques (Lactoferrine)	70
2.4.5. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur le chimiotactisme des neutrophiles	71
2.4.6. Effet de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sur les voies de signalisation impliquées dans l'activation du neutrophile « AKT, p38MAPK et ERK1/2 »	74
III. DISCUSSION GENERALE	77
IV. CONCLUSION & PERSPECTIVES	84
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	87
ANNEXE	
Article 1	
Article 2	

Résumé

Résumé

Les margines d'olive sont produits de façon saisonnière, par les pays producteurs d'huile d'olive. Ces déchets aqueux produits en masse suite au processus de trituration, sont très riches en matière organique et renferme énormément de molécules intéressantes et bioactives, entre autres les polyphénols (pp). Les pp contenus dans ces margines posent un problème de pollution pour les sols et de phytotoxicité, leur extraction de ces eaux peut en effet améliorer leur biodégradation. L'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sont des composants biologiques majeurs présents dans l'olive, les feuilles, l'huile d'olive et les margines. Ils présentent de nombreux avantages pour la santé et présentent des effets pharmacologiques intéressants. L'effet anti-inflammatoire de ces molécules a été largement décrit, mais le mécanisme par lequel ils agissent n'est pas encore bien clair, ainsi que leurs cibles spécifiques. L'objectif de cette thèse est de valoriser les pp présents dans les margines et montrer leur intérêt dans le contexte inflammatoire, notamment en les testant sur les fonctions du polynucléaires neutrophiles (PN) humain, à savoir la production des formes réactives de l'oxygène (FRO), la dégranulation et le chimiotactisme. Sur des PN isolés à partir de sang de volontaire sains, nous avons investigué l'effet des pp totaux et les effets des molécules pures de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur les FRO produites par le PN, notamment par la méthode de chimioluminescence pour les FRO, le test de réduction du cytochrome C par spectrophotométrie pour l'O₂⁻ et enfin la cytométrie en flux pour l'H₂O₂. D'après nos résultats l'extrait de pp issu des margines d'olive inhibe les FRO produits par les PN stimulés et il piègerait particulièrement l'H₂O₂. Dans cette première partie, nous avons montré que l'extrait phénolique exerce un effet antioxydant, en piégeant l'H₂O₂, mais n'a pas d'effet sur la production de l'anion superoxyde de l'oxygène, produit direct de la NADPH oxydase. En second lieu, nous avons observé que l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine inhibent de manière significative l'activité de la myéloperoxydase, induite physiologiquement par le peptide bactérien N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP), sans aucune cytotoxicité au moins pour les concentrations testées. Nous avons confirmé par SDS-PAGE et immunoblot que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine diminuent de manière significative la libération des granules azurophiles et spécifiques au niveau des PN. Nous avons également montré que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine réduisent la migration des PN sous agarose. Il est intéressant de noter que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine inhibent l'activité des MAP kinases impliquées dans des voies de signalisation des réponses immunologiques chez les PN. Nos données suggèrent que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sont capables de moduler la réponse inflammatoire et réduire les pathologies associées à l'hyper activation des PN, tels que l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde.

Mots clés : Margines d'olive, hydroxytyrosol, oleuropeine, neutrophiles, FRO, dégranulation, chimiotactisme, signalisation.

Summary

Olive mill wastewater (OMW) is produced seasonally by the olive oil-producing countries. A large amount of liquid waste results from olive oil extraction, with a very high organic load which renders it difficult to treat. Wastewater represents also a significant source of polyphenols (pp). Oleuropein and hydroxytyrosol are polyphenols which are major biological active components of olives, olive oil and OMW. The extraction of polyphenols will improve the wastewater biodegradation and reduce its phytotoxicity.

The aim of this study was to extract pp from OMW and investigate the effect of this extract, hydroxytyrosol and oleuropein on human polynuclear neutrophil (PN) functions such as reactive oxygen species (ROS) production, degranulation and chemotaxis.

PN were isolated from healthy donors and were incubated with increased concentrations of polyphenol extract or hydroxytyrosol and oleuropein. ROS production was measured by luminol-amplified chemiluminescence, cytochrome c reduction, and flow cytometer. Hydroxytyrosol and oleuropein are tested on other PN functions: degranulation was assessed by measuring myeloperoxidase activity and Western blots, chemotaxis was assessed by the under-agarose chemotaxis assay. Phosphorylated proteins were assessed by gel electrophoresis and Western blots.

Our results showed that pp extracted from OMW exerts a strong antioxidant effect and they could have an anti-inflammatory effect by inhibiting PN ROS production by scavenging hydrogen peroxide, thus limiting their toxic effects. We show that in addition to their ROS scavenging effect, oleuropein and hydroxytyrosol significantly inhibited the bacterial peptide N-formyl-methionyl-leucylphenylalanine (fMLF)-induced degranulation of azurophilic and specific granules as measured by myeloperoxidase and lactoferrin release, respectively. We also show that oleuropein and hydroxytyrosol reduced fMLF-induced neutrophil chemotaxis. Interestingly, both agents impaired the fMLF-induced AKT, p38MAPKinase, and ERK1/2 phosphorylation, signaling molecules that are involved in pathways regulating PN functions. Our data suggest that the anti-inflammatory properties of olive pp are not only restricted to their ROS scavenging effect, but also involve the inhibition of two other major pro-inflammatory PN functions.

In conclusion, the low cost and low toxicity of olive polyphenols make their use as immune-modulating and anti-inflammatory molecules which are a promising therapy for inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, septic shock.

Keywords: OMW, hydroxytyrosol, oleuropein, neutrophils, ROS, degranulation, chemotaxis, Signaling.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACD	Acid Citrate Dextrose
AKT	Serine-threonine protein kinase (Protéine Kinase B)
AM	Acetoxy Methylesters
APS	Persulfate d'ammonium
BCIP	-5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate p-toluidine
BPI	Bactericidal Permeability Increasing Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
β -ME	β -mercaptoéthanol
CD	Cluster de Différenciation
CGD	Chronic Granulomatous Disease (Granulomatose septique chronique)
COI	Conseil Oleicole International
CDCDHFDA	Carboxy-H2-DiChloro DiHydro Fluorescein DiAcetate
Cpm	Coup par minute
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
DFP	Diisopropyl Fluro-Phosphate
DMSO	Di Methyl Sulf Oxide
DO	Densité Optique
DPI	Diphenylene iodonium (inhibiteur de la NAFPH oxydase à citer texte)
DTT	DiThioThreitol
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
Erk	Extracellular Signal Regulated kinase
FAD	Flavin adenine dinucleotide
fMLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FPR	Récepteur du fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine)
FRO	Formes Réactives de l'Oxygène
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HOCl	Acide Hypochloreux
GAR-AP	Goat Anti-Rabbit Alcaline Phosphatase
GAR-HRP	Goat Anti-Rabbit Horse Radish Peroxidase
GAM-AP	Goat Anti-Mouse Alcaline Phosphatase
GAM-HRP	Goat Anti-Rabbit Horse Radish Peroxidase
GTP	Guanosine Triphosphate
GM CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	Acide (N-[2-HydroxyEthyl]Pipérazine-N'-[2-Ethane-Sulfonique])
HRP	Horse Radish Peroxidase
IgG	Immunoglobuline G
kDa	kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
MIF	Moyenne de l'intensité de fluorescence
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBT	Nitro-Bleu de Tétrazolium

NGal	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
NOX	NADPH Oxydase
nm	Nanomètre
NP-40	Nonidet P-40 (Nonylphenoxy polyethoxy ethanol)
O ₂ ⁻	Anion superoxide
OH [°]	Radical Hydroxyle
PBS	Phosphate Buffered Saline /tampon phosphate salin
Phox	Phagocyte oxydase
PI 3-kinase	phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol Myristate Acétate
PMSF	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
PN	Polynucléaires Neutrophiles
PP	Polyphénols
PtdIns(3,4,5)P3/ PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PX	Phox homology domain
RPM	Rotation par Minute
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SDS	Dodécyl Sulfate de Sodium
SH3	Src-homolgy 3
SOD	Superoxyde dismutase
TBS-Tween	Tris-buffered saline, Tween
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène-diamine
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1. Origine des cellules sanguines (EDWARDS, 1996)	11
Figure 2. Schéma récapitulatif des différentes fonctions du neutrophile (PEROBELLI et <i>al.</i> , 2015)	16
Figure 3. Migration du neutrophile du vaisseau sanguin vers le site infectieux (Adapté de FILIPPI, 2015).	17
Figure 4. Signalisation cellulaire au cours du chimiotactisme des PN (BILLADEAU, 2008)	19
Figure 5. Phagocytose et activation du système microbicide dans le neutrophile (KOBAYASHI et <i>al.</i> , 2005)	21
Figure 6. Structure et activation de la NADPH oxydase phagocytaire (LAMBETH, 2004)	24
Figure 7. Les différentes formes d'oxydants issus à partir du singulet de l'oxygène (DELBOSC et <i>al.</i> , 2001)	26
Figure 8. Les pièges extracellulaires des neutrophiles (Neutrophil Extracellular Trap) (MANTOVANI et <i>al.</i> , 2011)	28
Figure 9. Les voies de signalisation mobilisées suite à l'activation du PN par le fMLP et le PMA (adaptée de SHIMADA et <i>al.</i> , 2015)	30
Figure 10. Diagramme résumant les classes de pp et leurs structures chimiques de base (ABDAL DAYEM et <i>al.</i> , 2016)	33
Figure 11. Formation de hydroxytorosol à partir de l'hydrolyse de l'oleuropeine (Adapté de GRANADOS-PRINCIPAL et <i>al.</i> , 2010 ; YUAN et <i>al.</i> , 2015)	36
Figure 12. Diagramme résumant les étapes de purification des polyphénols à partir des margines (DE MARCO et <i>al.</i> , 2007)	42
Figure 13. Diagramme résumant les étapes d'isolement des neutrophiles à partir de sang humain	44
Figure 14. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	46
Figure 15. Réaction de chimioluminescence	48
Figure 16. Mesure de la production de l'anion superoxyde (HOLLMANN et <i>al.</i> , 2001)..	50
Figure 17. Schéma représentant le test de chimiotactisme	53
Figure 18. Photographies des neutrophiles	58
Figure 19. Test de cytotoxicité des polyphénols de margines sur les neutrophiles humains	59
Figure 20. Inhibition de production de FRO totales	60
Figure 21. Effet des polyphénols sur la production de l'anion superoxyde par les neutrophiles.....	61
Figure 22. Effet de l'extrait phénolique sur la production du peroxyde d'hydrogène intracellulaire	62

Figure 23. Effet de l'extrait phénolique sur le piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	63
Figure 24. Effet de l'extrait phénolique des margines sur la production de l'anion superoxyde produit par le système xanthine-xanthine oxydase.....	65
Figure 25. Effets de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la viabilité des neutrophiles	66
Figure 26. Structure chimique et effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la production des FRO.....	68
Figure 27. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la dégranulation des granules azurophiles mesurée par l'activité de la myéloperoxydase.....	70
Figure 28. Effets de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sur la libération du contenu des granules azurophiles et des granules spécifiques	72
Figure 29. Inhibition du chimiotactisme des neutrophiles par l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine	73
Figure 30. Les composés d'huile d'olive inhibent la phosphorylation d'AKT et des MAP Kinases au niveau du neutrophile.....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Le contenu des granules de neutrophiles (selon FAURSCHOU et <i>al.</i> , 2003 ; GOUGEROT-POCIDALO et HURTADO-NEDELEC, 2011)	14
Tableau II. Quelques techniques de mesure de formes réactives de l'oxygène produites par le neutrophile (Adapté à partir de FREITAS et <i>al.</i> , 2009)	27
Tableau III. Concentration des polyphénols présents dans les margine d'olive (Adapté de AZAIZEH et <i>al.</i> , 2012)	35
Tableau IV. Activités biologiques des polyphénols d'olive.....	39

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

L'olivier « *Olea europaea L.* » est cultivé dans plusieurs régions du monde, mais la région méditerranéenne est de loin le premier producteur d'huile d'olive. L'oléiculture en Algérie est ancestrale, c'est une pratique traditionnelle en région de Kabylie. La variété la plus répandue dans cette région est l'olive « *Chamlal* », connue pour son bon rendement en huile et sa résistance au climat sec et sa facilité d'entretien. Actuellement, cette culture se voit pousser ses frontières vers d'autres parties de l'Algérie.

La surface occupée par les oliviers représente environ 288 442 hectares et avoisine actuellement les 389 000 hectares soit 38,7% de la surface arboricole nationale. La production d'olives de table a plus que quadruplé, entre 2000 et 2011, passant de 34 673 tonnes à plus de 1400 000 tonnes en 2012, alors que celle de l'huile d'olive a doublé, atteignant un total de 728×10^5 litres en 2011. Le plan de développement national de l'oléiculture a eu comme objectif d'atteindre un potentiel d'un million d'hectares à l'horizon 2014 pour une production annuelle de 100 000 tonnes d'huile d'olive. D'après le bulletin du Conseil Oléicole International (COI) en 2014 et 2015, l'Algérie aurait augmenté sa consommation en huile d'olive ces dernières années passant de 140 000 à 231 500 tonnes, avec une production de 83 500 tonnes, et qui aurait connue une baisse comparée aux années précédentes. L'Algérie serait le troisième pays le plus consommateur de l'huile d'olive précédée par l'Egypte et la Turquie et aussi le deuxième dans la consommation mondiale de l'olive de table avec une moyenne de 5kg/an par habitant.

L'oléiculture a beaucoup d'avantages pour la population, de part la qualité de vie et le régime bénéfique pour la santé qu'elle leur offre, mais engendre par l'industrie oléicole des déchets ayant un impact très négatif sur l'environnement, notamment sur les nappes phréatiques, les cours d'eau, les sols et végétaux. La transformation des olives en huile génère des déchets solides (grignons) et des déchets liquides issus des lavages appelés « margines ». La région méditerranéenne produit 95% de margines mondiales (NAFZAOU, 1991; KAPELLAKIS *et al.*, 2006). Ces eaux de végétations sont toxiques à cause de leur charge élevée en matière organique particulièrement en polyphénols (pp) en concentration relativement importante. Cependant ces pp présents également dans l'huile d'olive, jouent un rôle important

dans sa conservation et sa stabilité dans le temps, leur concentration varie en fonction de la maturité de l'olive pressé, mais aussi des conditions de trituration. La présence de pp dans les margines en fait une source non négligeable de molécules anti-oxydantes. Le régime méditerranéen est connu pour sa richesse en molécules bioactives telles que les polyphénols et de nombreuses vitamines. L'huile vierge d'olives, largement utilisée dans cette région, représente une source potentielle de ces molécules bioactives à savoir l'acide caféique, l'acide ferulique, l'hydroxytyrosol, l'oleuropeine... sachant que les deux derniers (l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine) sont les pp majoritairement présents dans les olives, les feuilles et aussi dans les margines (DE MARCO et *al.*, 2007).

Afin de comprendre les effets bénéfiques des produits de l'olivier sur la santé nous avons voulu étudier les effets des pp sur les fonctions du polynucléaire neutrophile, une cellule clé de l'immunité et l'inflammation. Ce modèle cellulaire du système immunitaire représente une cellule multifonctionnelle et une référence en matière de production de radicaux libres et de molécules oxydantes, pour évaluer le potentiel oxydatif des molécules bioactives de l'olive et de ses sous produits.

Les polynucléaires neutrophiles (PN) humains ont un rôle primordial dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes (WITKO-SARSAT et *al.*, 2000 ; NATHAN et *al.*, 2006). Le neutrophile a la propriété de se déplacer vers le foyer infectieux suivant un gradient de facteurs chimio-attractants, phagocyter les pathogènes et les détruire. Le mécanisme par lequel l'agent pathogène est éliminé commence par son englobement dans une vacuole appelée le phagosome, suivie d'une production de formes réactives de l'oxygène (FRO). En outre, les neutrophiles libèrent certaines enzymes protéolytiques dans le phagosome pour détruire l'agent pathogène, ce mécanisme est communément appelé la dégranulation. Les neutrophiles contiennent des granules, de composition différente, parmi ces granules, on distingue les granules azurophiles qui contiennent entre autre de la myéloperoxydase, les granules spécifiques contenant de la lactoferrine, de la lipocaline, les granules tertiaires qui contiennent la gélatinase et les granules sécrétoires. La libération de ces granules est un processus important pour la réponse immunitaire. Une fois activés, les neutrophiles libèrent le contenu de ces granules dans le phagosome qui devient riche en enzymes et en molécules protéolytiques, ce qui contribue à éliminer l'agent pathogène. Alors que l'activation excessive du neutrophile par la libération de

ces produits oxydatifs peut être à l'origine de maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin, l'asthme et le choc septique etc. (BABIOR, 2000; PAIGE, 2006). Dans ce contexte, l'évaluation de la capacité anti-oxydante des pp dans des conditions de stress oxydatif du PN est l'un des objectifs assigné à ce travail.

Actuellement, on connaît certains effets biologiques des pp en général mais beaucoup moins à l'échelle moléculaire. D'où notre préoccupation d'étudier en particulier deux molécules prépondérantes dans l'olive; l'oleuropeine et l'hydroxytyrosol. Les effets de ces deux molécules sur la fonction oxydative du neutrophile sont connus, mais leur impact sur d'autres fonctions à savoir la dégranulation et le chimiotactisme et leurs mécanismes d'action restent inconnus.

Ce travail de thèse se divise en deux parties :

1. Une première partie concerne l'étude des effets de l'extrait de margines d'olive sur la fonction oxydative du neutrophile par un stimulant de synthèse, qui est un ester de phorbol (le PMA pour Phorbol Myristate Acétate) et la confirmation les effets précédents en utilisant des molécules pures de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la production des formes réactives de l'oxygène (FRO) par le neutrophile dans des conditions plus physiologiques en utilisant un peptide bactérien (le fMLP pour formyl-Methionyl-Leucyl-Phénylalanine).
2. Une deuxième partie est portée sur l'étude des molécules pures de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la dégranulation, le chimiotactisme des neutrophiles humains, et l'analyse des cibles moléculaires de ces deux molécules au sein de la cascade de signalisation liée aux fonctions du neutrophile.

Les résultats de ces travaux sont précédés par une synthèse bibliographique faisant le point sur le fonctionnement du neutrophile et les données connues sur les effets des pp d'olives.

Revue
Bibliographique

I. Le neutrophile

1.1. Origine et formation du neutrophile

Le polynucléaire neutrophile (PN) est une cellule leucocytaire circulante, il représente la majorité des globules blancs circulants pour environ 50 à 70% (GOLDSBY et *al.*, 2001). Le PN est de forme arrondie ayant entre 10 à 14 μm de diamètre, un noyau polylobé (2 à 5 lobes), et des granulations cytoplasmiques spécifiques. Le neutrophile a une demi-vie de 6 à 12h dans le sang circulant. Il a un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux et il est impliqué dans le processus inflammatoire infectieux et non infectieux. La réponse immunitaire dépendant du neutrophile implique plusieurs mécanismes fondamentaux essentiellement le chimiotactisme, la phagocytose, la production de molécules oxydantes et la dégranulation, ayant en finalité une action lytique du pathogène.

Le PN appartient à la lignée dite granulocytaires, il se distingue par son noyau polylobé et par la présence de quatre différents types de granules et vésicules dans son cytoplasme. Les PN dérivent des cellules souches du tissu hématopoïétique de la moelle osseuse, ces cellules souches se différencient sous le contrôle de facteurs de croissance (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF) d'interleukines (IL-3 et IL-6) en pré-géniteurs de la lignée myéloïde. D'autres signaux permettent la différenciation en progénitures des granulocytes et macrophages, puis en polynucléaire neutrophile (EDWARDS, 1996 ; ST-ONGE, 2005) (Figure 1).

Les granules cytoplasmiques apparaissent progressivement en parallèle avec le processus de maturation du neutrophile. Les granules azurophiles ou primaires s'individualisent en premier stade, puis les granules spécifiques ou secondaires qui caractérisent le type du polynucléaire. A la fin de la différenciation, le PN mature se distingue par un noyau polylobé et plusieurs granules, c'est ce qui le différencie du PN immature. Une fois mature, les PN sont acheminés dans la circulation, où ils y séjournent environ 7 à 12 heures. En absence de stimulus, la durée de vie des PN est courte, ils meurent par apoptose dite passive et sont phagocytés par les macrophages. Dans le cas d'une infection, les PN sont activés par des agents chimio-attractants, leur apoptose est alors retardée, ceci leur permet d'être recrutés au niveau du foyer infectieux.

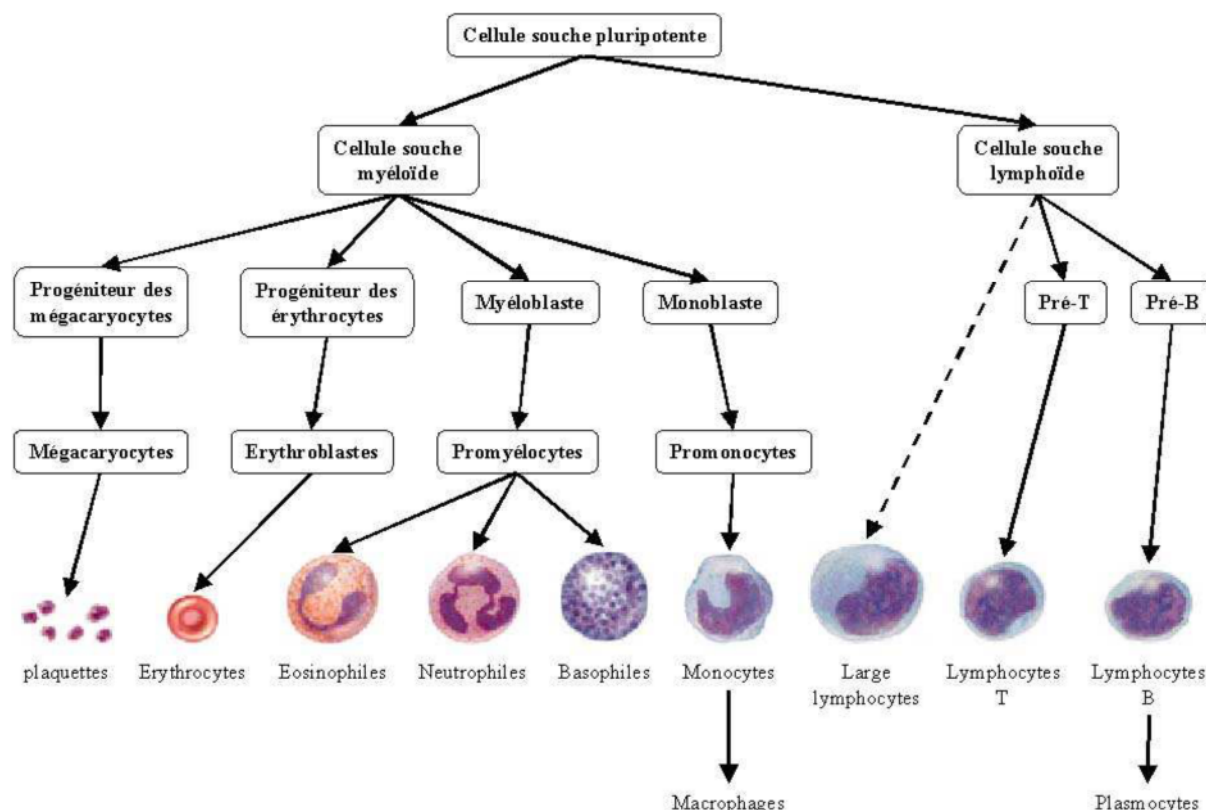


Figure 1. Origine des cellules sanguines (EDWARDS, 1996). Le développement des cellules sanguines se déroule dans la moelle osseuse. Toutes ces cellules résultent de la différenciation des cellules souches pluripotentes, qui ont une capacité de renouvellement. Seules les caractéristiques morphologiques des cellules matures sanguines sont représentées.

Les PN sanguins se trouvent répartis entre partie circulante et partie marginée par le fait de leur adhérence à l'endothélium et leur migration au niveau de veinules, sachant que la répartition est équivalente entre les deux compartiments.

Les PN exercent leurs fonctions physiologiques dans les tissus en réponse à différents stimulus, à savoir les cytokines, les chimiokines et les médiateurs de l'inflammation (lipides et peptides). Les PN physiologiquement inactifs, circulent dans le sang et adhèrent à la paroi vasculaire, à la suite d'un stimulus, le PN pré-activé franchit la barrière endothéliale et migre de manière orientée vers le foyer infectieux, suivant un gradient de substances chemo-attractantes, dont des dérivés bactériens tels que le formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine (fMLP), les composants du complément comme le C5a, des dérivés lipidiques tels que le leucotriène (LTB4) et le

facteur activateur des plaquettes (PAF), ou des chimiokines tels que l'IL-8 (KOLACZKOWSKA et KUBES, 2013). Une fois sur le site infectieux, le neutrophile déploie son arsenal de molécules microbicides particulièrement les formes réactives de l'oxygène (FRO) et ses protéases. Une réponse inflammatoire excessive pourrait aboutir à la destruction des tissus avoisinants, d'où la nécessité d'une régulation de ce processus, d'ailleurs le PN activé est éliminé par apoptose dite accélérée, déclenché par une production excessive de FRO.

L'enzyme responsable de la production des FRO dans les PN est la NADPH oxydase, elle est composée de deux protéines membranaires, la gp91phox et la p22phox qui forment les sous-unités α et β du cytochrome b_{558} et d'autres protéines cytosoliques qui sont la p47phox, la p67phox, la p40phox et une protéine G (de type rac1 ou rac2) (BABIOR, 2004). L'activation de la NADPH oxydase nécessite la phosphorylation de ses composants, principalement la sous unité cytosolique p47phox. Une fois activé, ce complexe produit des formes réactives de l'oxygène (FRO), qui contribuent vivement à l'élimination du pathogène. Les FRO ont un rôle essentiel dans la défense immunitaire, mais produits excessivement, elles peuvent être délétères pour les tissus environnants d'où la nécessité d'une régulation très fine et précise de leur production. De nombreuses études sont dédiées à la recherche de nouvelles molécules capables de réguler la réponse immunitaire et l'inflammation, notamment celle liée au neutrophile. D'où notre intérêt pour les extraits phénoliques d'olive, connus pour être très bénéfiques pour la santé de l'homme.

1.2. Les différentes granules du neutrophile

Le neutrophile est une cellule compartimentée, contenant plusieurs molécules stockées dans des granules qui jouent un rôle important dans ses fonctions. Ces vésicules se forment durant la granulopoïèse. Il en existe quatre types détaillés dans le tableau I: Les granules azurophiles, les granules spécifiques qui définissent le type du polynucléaire les granules gélatinases et les vésicules sécrétoires (BORREGAARD et COWLAND, 1997 ; GULLBERG, 1999). Le contenu de ces granulations est mobilisé suite à un stimulus dégranulant, et se trouve libéré dans le milieu extracellulaire au niveau du phagosome ou en surface des membranes. Les premières vésicules à être libérées en premier sont les vésicules sécrétoires, les

gélatinases, puis les granules spécifiques et les granules azurophiles (GOUGEROT-POCIDALO et HURTADO-NEDELEC, 2011).

-Les granules primaires ou azurophiles. Ce sont les premières à apparaître durant la phase de maturation du neutrophile mais aussi les plus difficiles à mobiliser, elles représentent un tiers des granulations des PN, et sont révélées grâce à leur affinité au colorant basique azure. La matrice des granules contient essentiellement de la myéloperoxydase (MPO), le lysozyme, la cathepsine G, les défensines, l'élastase, la β glucuronidase et la BPI (Bactericidal Permeability Increasing Protein). Leur membrane contient le CD63, le CD68 et des pompes à protons (H^+ -ATPase) qui participent à l'acidification de la matrice des granulations.

-Les granules secondaires ou spécifiques. Ce sont des peroxydases négatives, elles contiennent en majorité du lysozyme, de la lactoferrine, la lipocaline NGAL, la N-acétylglycosaminidase, la transcobalamine II (la protéine liant la vitamine B12). Leur membrane contient des récepteurs de facteurs chimio-attractants tels que le récepteur au peptide bactérien le fMLP, le cytochrome b558, sous unités catalytique de la Nicotine Amide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné (NADPH) oxydase (BAINTON, 1987 et FLETCHER et *al.*, 1982).

-Les granules tertiaires ou riches en gélatinases. Ce sont des vésicules qui apparaissent tardivement et sont caractérisée par leur richesse en gélatinases, et de protéines dégradant la matrice interstitielle, notamment la collagénase. Elles contiennent également de la β -glycérophosphatase, la N-acétyl- β -glucosaminidase et des protéines membranaires à savoir le récepteur du fMLP, le cytochrome b558, CD11b et le CD18 (BORREGAARD et COWLAND, 1997 ; GOUGEROT-POCIDALO et HURTADO-NEDELEC, 2011).

Tableau I. Le contenu des granules de neutrophiles (selon FAURSCHOU et al., 2003 ; GOUGEROT-POCIDALO et HURTADO-NEDELEC, 2011).

<i>Granulations azurophiles</i>	<i>Granulations spécifiques</i>	<i>Granulations gélatinase</i>	<i>Vésicules sécrétoires</i>
Protéines ancrées dans la membrane			
V-type H ATPase CD63 CD68	CD11b/ CD18 Cytochrome b558 fMLF-R CD66, CD67, CD15 TNF-R, IL10R, uPAR Fibronectine-R Laminine-R Thrombospondine-R Vitronectine-R SNAP23, VAMP2, stomatine Sous-unité de protéine G SCAMP Rap1, Rap2	CD11b/ CD18 Cytochrome b558 fMLF-R CD67 TNF-R MMP25 SNAP23, VAMP2, Nramp1	CD11b/ CD18 Cytochrome b558 fMLF-R CD67 CD35 MMP25 SNAP23, VAMP2, CD10, CD13, CD16 Clq-R Phosphatase alcaline
Protéines liées à la matrice			
Lysozyme Élastase Cathepsine G Protéinase A-défensines BPI Sialidase Azurocidine β-glucuronidase MPO	Lysozyme Collagénase, gélatinase uPA, cystatine Cc, cystatine Fc hCAP18, NGAL B12BP Lactoferrine Haptoglobine Pentraxine 3, prodéfensine Orosomucoïde Héparanase β2-microglobuline CRISP3	Lysozyme EGélatinase Arginase1 β2-microglobuline CRISP3	Tétranectine

ATPase : adénosine triphosphate; fMLF-R: formyl-leucyl- phenylalanin receptor; TNF-R: tumor necrosis factor; IL: interleukin; uPAR: urokinase-type plasminogen activator receptor; SNAP23: synaptosome-associated protein de 23kDa; VAMP2: vesicle-associated membrane protein 2; SCAMP: secretory carrier membrane proteins; MMP: métalloprotéine; Nramp1: natural resistance-associated macrophage protein 1; BPI: bactericidal/permeability increasing; MPO: myéloperoxidase; uPA: urinary plasminogen activator; hCAP18: human cathelicidin antimicrobial protein; NGAL neutrophil gelatinase-associated lipocalin; B12BP: vitamin B12-binding protein; CRISP3: cystein-rich secretory protein 3.

-Les vésicules sécrétoires. Ce sont les granules les plus faciles à mobiliser, parfois, il suffit d'incuber les PN à 37°C pour les libérer (SENGELOV et al., 1994). Elles sont riches en récepteurs membranaires, impliqués dans l'activation du neutrophile, notamment ceux des molécules du complément et des molécules chimio-attractantes (récepteur du fMLP).

Suite à une stimulation, la dégranulation permet la libération des molécules liées à la matrice des granules dans le phagosome et dans le milieu extracellulaire, qui jouent un rôle dans les fonctions mêmes du neutrophile à savoir la myéloperoxydase, les médiateurs de l'inflammation, les cytokines pro et anti-inflammatoires (NATHAN, 2006).

1.3. Les fonctions du polynucléaire neutrophile

Le polynucléaire neutrophile (PN) est considéré comme un pilier de l'immunité innée, vu les fonctions précises et importantes qu'il accomplit. Du point de vue des propriétés, le PN est une cellule capable de se déplacer, ce qui lui permet de rejoindre le foyer infectieux et d'éliminer le pathogène. Le neutrophile intervient dans la réaction inflammatoire par trois fonctions principales, dans l'ordre ; le neutrophile migre par chimiotactisme vers le foyer infectieux, une fois sur place, il internalise le pathogène par phagocytose puis libère des granules contenant des molécules protéolytiques et des enzymes pour l'éliminer, il produit aussi différentes formes réactives de l'oxygène (FRO) suite à l'explosion oxydative menée par la NADPH oxydase (Figure 2).

Le PN est capable de libérer son ADN, un processus appelé NET pour « neutrophil extracellular traps ». En outre, le neutrophile serait impliqué également dans l'immunité acquise par la production des cytokines et des chimiokines qui régulent les fonctions des lymphocytes et des cellules dendritiques (WITKO-SARSAT et al., 2000).

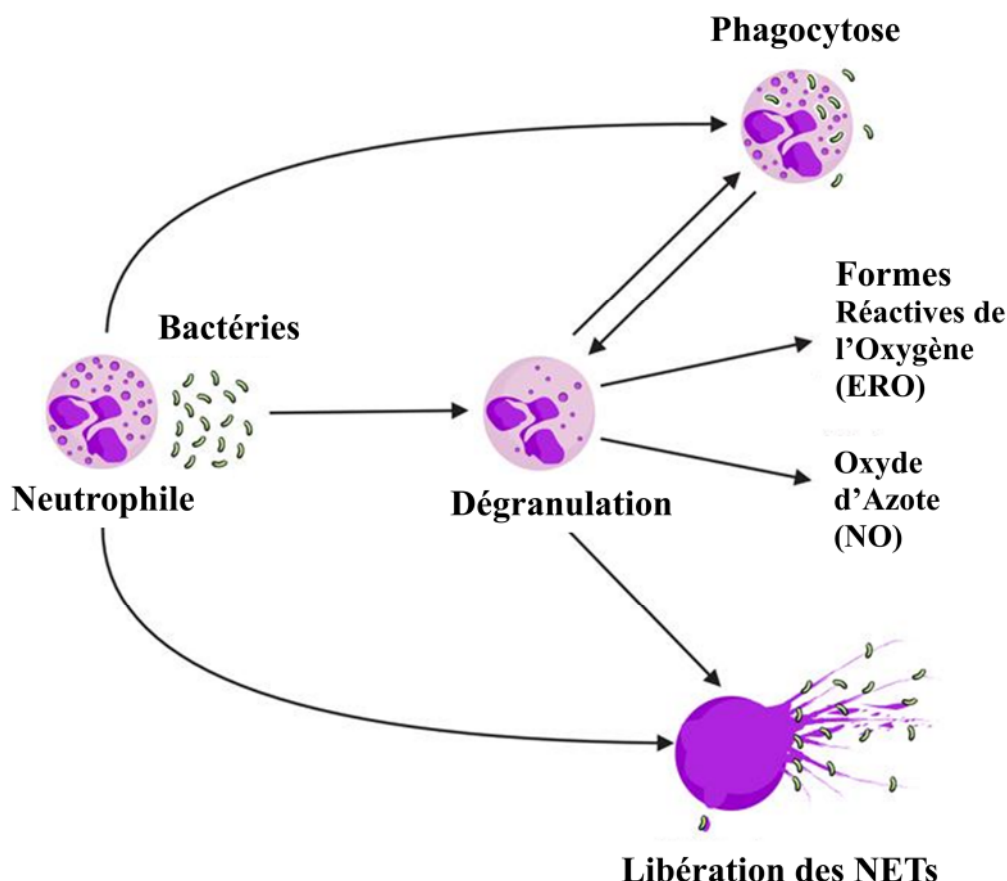


Figure 2. Schéma récapitulatif des différentes fonctions du neutrophile (PEROBELLI et al., 2015). Le neutrophile phagocyte le pathogène et produit des formes réactives de l'oxygène. Il dégranule en libérant des enzymes protéolytiques et peut également libérer le contenu nucléaire, qui s'associe au contenu des granules pour former des pièges aux microorganismes (NET).

1.3.1. Adhérence et migration tissulaire du neutrophile.

Le neutrophile est physiologiquement inactif dans la circulation sanguine, mais sous l'influence de différents stimuli provenant du foyer inflammatoire, il devient une cellule active. Le neutrophile roule le long de l'endothélium vasculaire, auquel il s'attache de manière lâche et réversible (Figure 3). L'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales est de faible affinité, assurant ainsi l'attachement et le détachement du neutrophile sur l'endothélium par « rolling ». Il adhère aux cellules endothéliales et se glisse entre elles par diapédèse, il migre de façon orientée vers sa cible.

Les interactions sont catalysées par les L-sélectine (CD62L), protéines d'adhésion exprimées de manière constitutive à la surface du neutrophile et qui se lient à leur

ligand au niveau des cellules endothéliales, notamment les E et les P-sélectines exprimées à la surface des cellules endothéliales (BORREGAARD, 2010).

L'adhésion entre le neutrophile et la cellule endothéliale fait intervenir en plus des sélectines, les $\beta 2$ intégrines, dont par exemple les CD11b/CD18. Les molécules CD11b sont stockées dans les granulations des neutrophiles, et leur expression augmente en réponse à des stimulants, tels que les esters de phorbol, les peptides formylés, le GM-CSF et l'IL-8. Les $\beta 2$ -intégrines activées se lient à leurs ligands au niveau des cellules endothéliales, les Molécules d'Adhésion Intercellulaire (ICAM). La diapédèse des neutrophiles fait intervenir les molécules d'adhésion PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) et les JAM (Junctional Adhesion Molecule).

D'autres molécules contenues dans les granules du neutrophile participent aussi au déplacement du neutrophile, à savoir l'élastase qui permet la rupture des jonctions inter-endothéliales, et les métalloprotéases qui dégradent la membrane basale pour permettre au neutrophile d'atteindre le foyer inflammatoire (BORREGAARD et COWLAND, 1997 ; WOODFIN et *al.*, 2010).

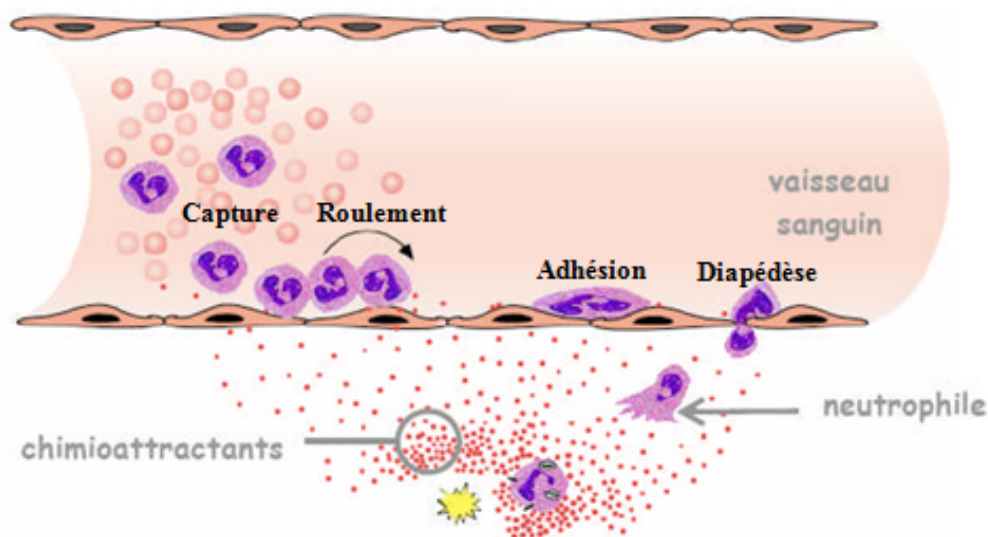


Figure 3. Migration du neutrophile du vaisseau sanguin vers le site infectieux (Adapté de FILIPPI, 2015). En réponse aux signaux chimioattractants, les neutrophiles initialement circulants deviennent adhérents. Le PN émet des pseudopodes, se déforme en cellule allongée et migre en passant entre deux cellules endothéliales pour atteindre le foyer infectieux par diapédèse, suivant le gradient de molécules chimioattractantes.

La régulation de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des neutrophiles se traduit par une adhérence ferme et non réversible, due à une forte affinité. En conséquence, le roulement du neutrophile s'arrête et l'ancrage du neutrophile se consolide grâce au réarrangement du cytosquelette autour de la partie intracytosolique des $\beta 2$ - integrines.

1.3.2. Le chimiotactisme du neutrophile

Au cours du processus inflammatoire, des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et des facteurs chimioattractants sont libérés en créant un gradient de concentration décroissant provenant du foyer infectieux. Ces agents pro-inflammatoires agissent sur les cellules endothéliales qui vont exprimer des molécules d'adhérence et d'autres récepteurs. En réponse à ces signaux, les PN passent de leur état de cellules circulantes en cellule adhérentes (Figure 3). Les PN vont alors passer entre deux cellules endothéliales pour atteindre le foyer infectieux par diapédèse.

Lors de sa migration le neutrophile change sa morphologie en émettant des pseudopodes et passe d'une cellule ronde à une cellule allongée. La migration du neutrophile implique plusieurs processus cellulaires et moléculaire, notamment le remodelage du cytosquelette, l'expression des molécules de surface et une signalisation intracellulaire intense (Figure 4). Le processus de mobilité est lié au remaniement. Le processus de mobilité est lié remaniements du cytosquelette et de l'adhésion cellules-matrice, il se résume en quatre étapes ordonnées et répétées de façon cyclique : la protrusion, l'adhésion de la membrane vers l'avant, le déplacement de la cellule, et finalement la rétraction en arrière.

Les différents mécanismes et les molécules qui contrôlent les mouvements spatio-temporels de la cellule ne sont pas complètement élucidés. Néanmoins, certaines études ont montré la forte implication des GTPases Rho, Cdc42 et Rac1. La protéine Rac serait impliquée dans la formation du front de migration en réponse à l'activation de la PI3K (la phosphatidylinositol 3-phosphate Kinase), par des signaux chimiotactiques (ETIENNE-MANNEVILLE et HALL, 2002 ; WONG et *al.*, 2006 ; MAKNI-MAALEJ et *al.*, 2013), elle serait suffisante pour maintenir les mouvements dirigés de la cellule, Rac semble être concentrée au niveau du lamellipode (RORTH, 2011). Rac et Cdc42 seraient aussi à l'origine de la polymérisation des

microfilaments d'actine et de myosine ainsi dans l'émission des pseudopodes qui poussent la cellule vers l'avant, et leur activité est contrôlée par la GTPase Rho (BENSEDDIK et *al.*, 2013).

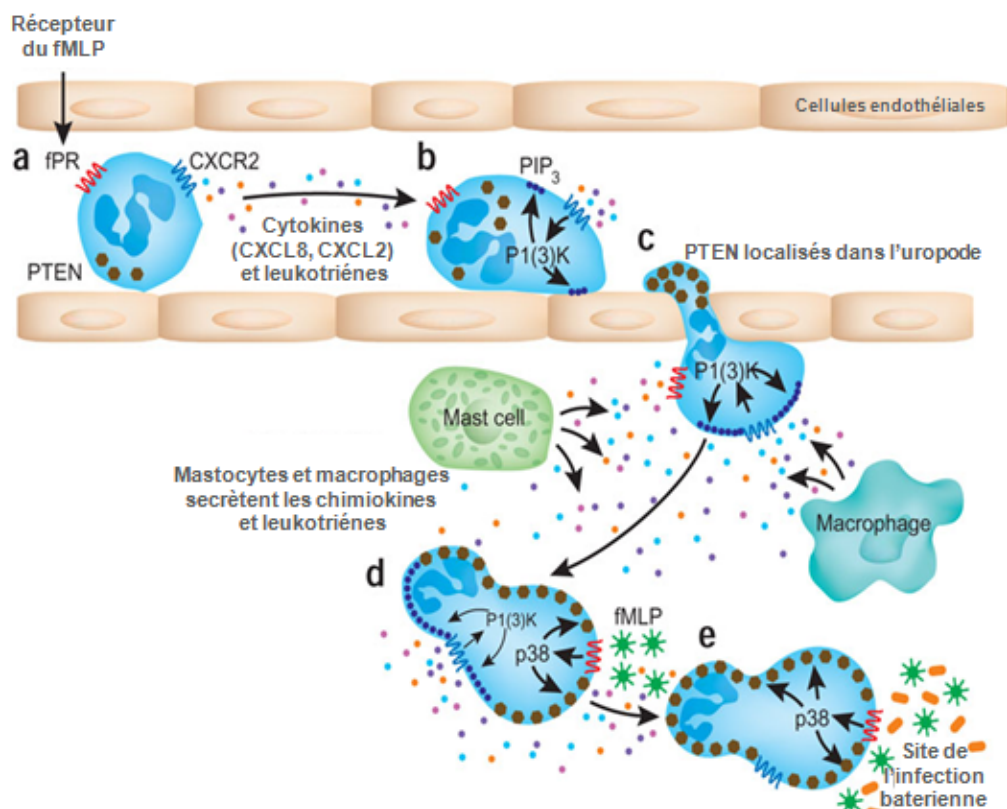


Figure 4. Signalisation cellulaire au cours du chimiotactisme des PN (BILLADEAU, 2008). Le neutrophile exprime à sa surface des récepteurs du fMLP FPR (formyl peptide receptor) et des récepteurs de chimiokines. La phosphoinositide 3-kinases (PI 3-kinases) génère le PIP3 qui se concentre au front de la cellule, fournissant une motilité directionnelle induite par les chimiokines. La phosphatase PTEN (Phosphatase and tensin homologue), est localisée dans l'arrière de la cellule au niveau de l'uropode. La stimulation du FPR active la p38MAPkinase, qui maintient PTEN dans l'uropode pour étirer le corps de la cellule lors de la migration.

La cellule adopte une morphologie polarisée grâce à la polymérisation d'actine vers le sens du gradient et une contractilité à l'arrière suivant les facteurs qui contrôlent la direction comme Ras et PIP3, qui sont orientés vers le sens du gradient de chimiotactisme, alors que la phosphatase PTEN (Phosphatase and tensin homologue), qui converti le PIP3 en phosphatidylinositol 2-phosphate (PIP2), régule négativement le taux cellulaire du PIP3 et la voie de signalisation impliquant AKT

(ARICO et *al.*, 2001; GEORGESCU, 2010, TEIMOURIANA et MOGHANLOO, 2015). PTEN est localisée en arrière de la cellule dans l'uropode (FUNAMOTO et *al.*, 2002, SENOO et IJIMA, 2013).

1.4. Les mécanismes effecteurs des polynucléaires neutrophiles

La fonction immunitaire bactéricide du PN se manifeste par deux mécanismes majeurs finement régulés. Un premier mécanisme dépendant de l'oxygène, caractérisé par une production massive des formes réactives de l'oxygène (FRO), dont l'anion superoxyde (O_2°) et ses dérivés tels que le radical hydroxyle (OH°) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces FRO particulièrement leur précurseur l'anion superoxyde est produit par un complexe enzymatique nommé la NADPH oxydase, phagocytaire NOX2. Le second détaillé ci-dessus, la dégranulation consiste à la libération du contenu des granules du PN à l'intérieur du phagosome et contribuent à une activité lytique de l'agent pathogène.

1.5. La phagocytose

Au niveau du foyer infectieux, les neutrophiles se lient aux microorganismes, les internalisent par un processus appelé la phagocytose. La phagocytose se déroule en trois étapes qui commencent par l'adhérence, l'englobement du pathogène puis sa digestion. Les PN détruisent le pathogène en déversant dans le phagosome des protéases, le lysozyme et des agents oxydants antimicrobiens (Figure 5) : les formes réactives de l'oxygène (FRO), produites par le complexe enzymatique NADPH oxydase (QUINN, 2004).

La maturation du phagosome passe par la fusion des granulations qui déversent des protéases, des lysozymes de molécules antimicrobiennes dans la lumière du phagolysosome. En parallèle se fait l'assemblage de la NADPH-oxydase sur la membrane interne du phagolysosome à l'origine des agents oxydants antimicrobiens : les formes réactives d'oxygène (FRO). Ces deux mécanismes conjoints assurent un environnement toxique pour les agents pathogènes. L'autre caractéristique intéressante du neutrophile c'est la régulation du pH à l'intérieur du phagosome, le maintien d'un pH alcalin est nécessaire pour l'activation des sérines protéases et qui est maintenu par le biais de l'activité de la NADPH-oxydase ce qui tamponne l'acidité due à la libération continue des granulations (NORDENFELT et TAPPER, 2011).

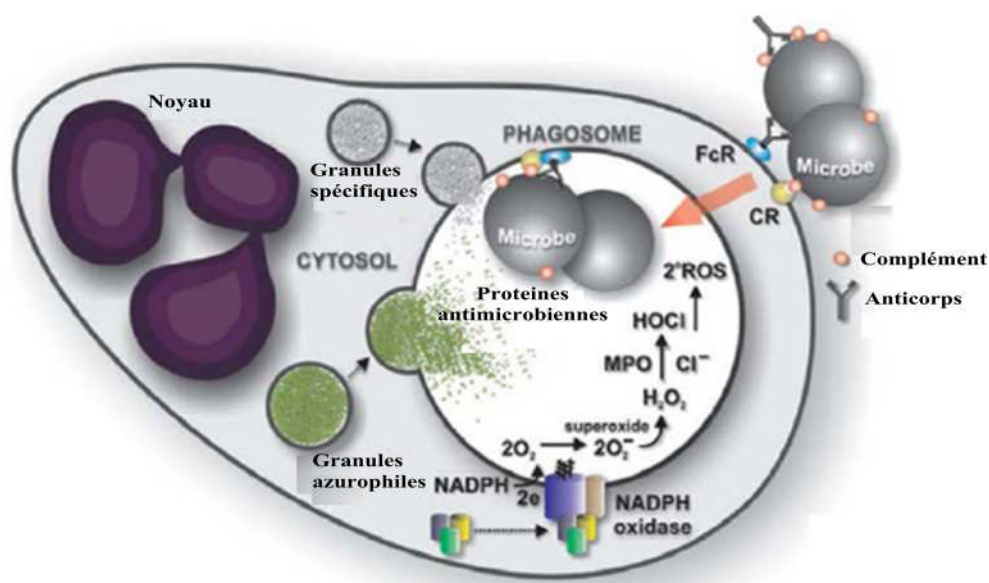


Figure 5. Phagocytose et activation du système microbicide dans le neutrophile (KOBAYASHI et al., 2005). Les microbes opsonisés avec les protéines du complément (complément) et/ou les anticorps spécifiques se lient efficacement aux récepteurs du complément (CR) et aux récepteurs Fc (FcR) des immunoglobulines, situés à la surface des phagocytes. La liaison à ces récepteurs induit le processus de phagocytose, par lequel les microorganismes sont internalisés et séquestrés dans le phagosome.

❖ Les mécanismes moléculaires impliqués lors de la phagocytose

Le neutrophile nécessite une reconnaissance de sa cible afin de la phagocyter, cette étape cruciale se fait grâce aux opsonines, qui se trouvent à la surface des particules à phagocyter. Ces molécules existent en deux types : les immunoglobulines et les molécules du complément. Le neutrophile peut reconnaître la partie Fc des immunoglobulines (IgG), qui représente la chaîne lourde commune aux IgG de la même classe ou les protéines du complément C3b, grâce à des récepteurs spécifiques situés à sa surface cellulaire désignés respectivement par FcR et CR (Figure 5).

Il existe des différences entre la phagocytose dépendante des récepteurs Fc et celle dépendante des récepteurs CR. En effet les voies de signalisation déclenchées par ces 2 types de récepteurs et les mouvements membranaires impliqués sont différents (VIDARSSON, 1998). Le schéma de la figure 5 récapitule les suites des événements consécutifs à une reconnaissance des particules étrangères par l'un ou

l'autre type de récepteurs. La phagocytose FcR dépendante nécessite une formation de pseudopodes, pour entourer la particule à phagocyter et former le phagosome alors que la phagocytose CR dépendante s'apparente plus à un mécanisme d'endocytose (VIDARSSON, 1998).

La formation du phagosome nécessite un apport de membrane *de novo*, sans cet apport, la surface membranaire diminuerait rapidement, et le nombre de particules phagocytées serait très limité. Cet apport de membrane est assuré par les compartiments intracellulaires (Golgi, endosomes de recyclage...), et dans le cas des PN, par la fusion des granules et vésicules avec le phagosome. Plusieurs modèles décrivant les trafics membranaires qui ont lieu lors de la phagocytose ont été proposés.

1.6. La bactéricidie

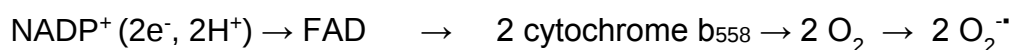
1.6.1. La production de formes réactives de l'oxygène par la NADPH Oxydase

L'explosion respiratoire a été mise en évidence suite à l'observation d'une consommation intense d'oxygène par les phagocytes professionnels, tels que les neutrophiles et les macrophages lorsqu'ils sont exposés à des bactéries. La NADPH oxydase phagocytaire est à l'origine de l'explosion oxydative, elle produit des anions superoxyde, qui sont des précurseurs des autres formes actives de l'oxygène (FRO), libérés dans le milieu extracellulaire ou à l'intérieur du phagosome. Ces FRO participent à la défense immunitaire et l'élimination des pathogènes.

Le complexe oxydatif membranaire catalyse la réduction monoelectronique de l'oxygène moléculaire (O_2) formant ainsi l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), c'est l'explosion oxydative (EO) ou « respiratory burst » en anglais. La source d'électrons est la NADPH cytoplasmique provenant via des hexoses monophosphates, produit par l'oxydation non mitochondriale du glucose.

La réaction conduit à la libération d'un proton (H^+), selon la stoechiométrie suivante :

NADPH Oxydase



❖ Le complexe NADPH Oxydase 2 (NOX2)

La NADPH oxydase 2 ou NOX2 des phagocytes, est un complexe enzymatique formé de six sous unités, dont deux membranaires et quatre cytosoliques (QUINN, 2004). Les deux protéines membranaires sont la p22^{phox} et gp91^{phox} (phox pour phagocyte oxydase, gp pour glycoprotéine) et constituent le cytochrome b₅₅₈ (Figure 6). Cet hétéro-dimère formé de la gp91^{phox} et la p22^{phox} associé par des liaisons non covalentes, son potentiel d'oxydoréduction lui permet de catalyser la réduction mono électronique de l'oxygène en anion superoxyde. Le cytochrome b₅₅₈ est présent majoritairement dans la membrane des granules spécifiques, gélatinase positive et sécrétoires, puis il migre vers la membrane du phagosome ou la membrane plasmique par fusion membranaire lors d'une stimulation de la cellule (QUINN, 2004). Les composants cytosoliques de la NADPH oxydase qui sont complémentaires aux sous unités membranaires sont les protéines p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} ainsi que d'une petite protéine G de type Rac1/2. (NAUSEEF, 2008).

❖ Assemblage et activation de la NADPH Oxydase (NOX 2)

L'activation de la NOX2 est induite par au moins 3 étapes qui résultent de l'assemblage des protéines cytosoliques régulatrices (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} et Rac) avec le flavocytochrome b₅₅₈ (composé des sous-unités membranaires gp91^{phox} et p22^{phox}). Ces étapes font intervenir des protéines kinases, des enzymes du métabolisme lipidique, et des protéines échangeuses de nucléotides qui activent la GTPase Rac. Les protéines kinases catalysent de nombreuses phosphorylations de la région auto-inhibitrice de la p47^{phox}, libérant sa liaison au domaine SH3 (src

homology domain 3), et permettant à la p47^{phox} de se lier à la p22^{phox}. Ceci lève également l'inhibition du domaine PX (phox homology) de la p47^{phox}, permettant la liaison de celle-ci aux phospholipides. La p47^{phox} se liant également à la p67^{phox} a été décrit comme une protéine organisatrice. La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la phospholipase D produisent du phosphatidyl-3-phosphate (PI3P) et de l'acide phosphatidique, respectivement, lipides auxquels se lient les domaines PX de la p40^{phox} et de la p47^{phox}. Dans les cellules au repos, Rac-GDP se trouve lié à la protéine inhibitrice RhoGDI (inhibiteur de dissociation du GDP). L'activation des facteurs d'échange induit la liaison de GTP, un changement de conformation de Rac et la dissociation de RhoGDI. Le changement de conformation favorise également la

liaison de Rac à la région TPR (tetra-tricodecapeptide region) de la $p67^{phox}$, aidant à l'assemblage du complexe (Figure 6).

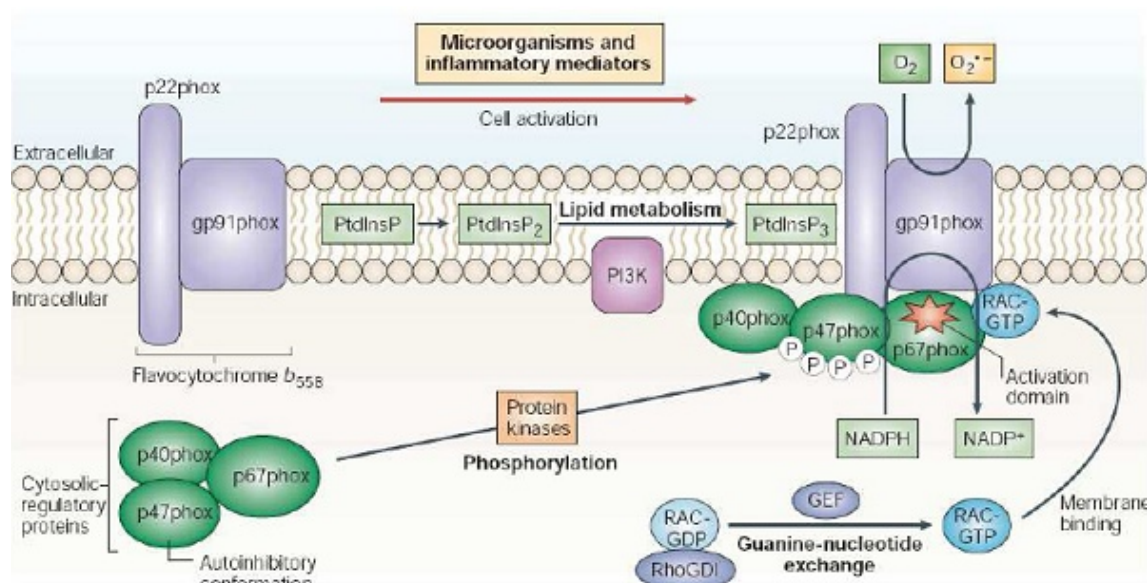


Figure 6. Structure et activation de la NADPH oxydase phagocytaire (LAMBETH, 2004). Association non covalente entre la $gp91^{phox}$ et la $p22^{phox}$ formant la partie membranaire de la NADPH oxydase. Les sites de fixation du NADPH et du FAD sont situés dans la partie C-terminale de la $gp91^{phox}$. Association non covalente entre la $p47^{phox}$, la $p67^{phox}$ et la $p40^{phox}$ dans les cellules au repos. La stimulation des cellules induit la phosphorylation de la $p47^{phox}$ et l'assemblage du complexe actif.

La NADPH oxydase peut être activée expérimentalement *in vitro* dans les neutrophiles isolés ou dans des lignées cellulaires d'origines leucémiques différenciées en neutrophiles :

- 1) par des agents solubles comme des peptides d'origine bactérienne fMLP, ou l'activateur des protéines kinases C (PKC) le phorbol myristate acetate (PMA),
- 2) dans des conditions plus physiologiques par la phagocytose de particules opsonisées.

La NADPH oxydase peut être inhibée *in vitro* par le diphenylene iodonium (DPI) identifié par CROSS et JONES en 1986, cependant il est décrit comme étant irréversible et non sélectif car il agit sur toutes les flavoprotéines. Le DPI est un peu délaissé au profit de l'apocynine (4-hydroxy-3-methoxy-acetophenone), un inhibiteur plus sélectif de la NADPH oxydase, qui est un inhibiteur de la formation des

FRO par inhibition de la translocation intracellulaire de deux sous unités cytosoliques de la NADPH-oxydase vers le complexe membranaire (PETERS et *al.*, 2001).

❖ Régulation de la production des FRO dans le neutrophile

Dans les PN activés, la NADPH-oxydase membranaire dépendante du NADPH produit une grande quantité d'anions superoxyde ($O_2^{\circ-}$) via l'explosion oxydative (EO). Ces anions superoxyde se dismutent rapidement en peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) et en d'autres FRO qui sont des agents microbicides efficaces. L' $O_2^{\circ-}$ est spontanément dismuté en H_2O_2 dans l'environnement acide du phagosome ou sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD) cytoplasmique. Le radical hydroxyle OH° représente la forme la plus réactive des radicaux libres oxygénés. Sa production est stimulée par la transferrine, un enzyme marqueur des granules spécifiques des PN.

La voie oxydative est amplifiée par la myéloperoxydase (MPO), libérée dans le phagosome par fusion des granules azurophiles. La MPO catalyse l'oxydation de l'ion Cl^- en acide hypochloreux (HOCl) en présence de H_2O_2 . L'ion OCl^- oxyde les amines primaires des protéines et phospholipides en dérivés chloramines très toxiques (Figure 7).

D'autres réactions entre HOCl et H_2O_2 peuvent aboutir à la formation d'oxydants tel que le singulet d'oxygène ($O_2^{\circ-}$), cependant une grande partie de HOCl est convertie en chloramines également toxiques.

Les anions superoxydes sont produits dans le milieu extracellulaire ou à l'intérieur du phagosome, mais certains comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut diffuser librement dans le cytoplasme. Les FRO produites de façon excessive, peuvent aussi induire des lésions tissulaires qui peuvent participer à plusieurs maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (EL-BENNA et *al.*, 2009), d'où la nécessité de leur métabolisme. Des systèmes réducteurs comme la catalase (CAT) régulent la concentration de FRO dans la cellule. Cependant, le débordement de ces systèmes de protection conduit à une élévation de la quantité de FRO intracellulaire, provoquant des dommages importants au niveau cellulaire, ce qui contribuera au déclenchement de l'apoptose des neutrophiles.

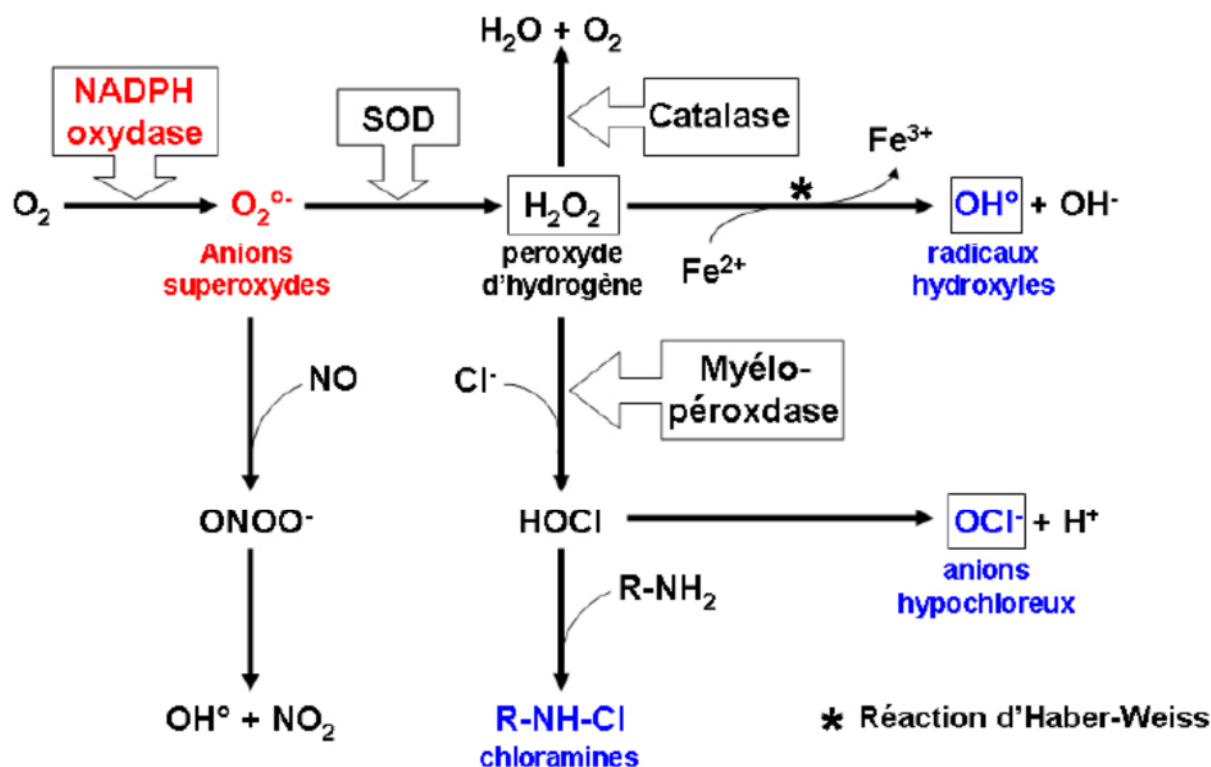


Figure 7. Les différentes formes d'oxydants issus à partir du singlet de l'oxygène (DELBOSC et *al.*, 2001).

❖ La détection des différentes formes réactives de l'oxygène

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron non apparié (GARDES-ALBERT et *al.*, 2003). Dans le PN, la NADPH oxydase produit le radical superoxyde qui est le précurseur de toutes les formes de radicaux libres. De nombreuses méthodes ont été mises au point pour détecter et mesurer les radicaux libres d'oxygène et leurs oxydants dérivés. Ces méthodes sont différentes par leurs niveaux de sensibilité et leur spécificité. Il s'agit notamment de dosages chimiques pour la détection de fluorescence en présence de sondes sensibles à l'oxydoréduction ou en mesurant le signal en présence de sondes chimioluminescentes et également par des mesures en spectrophotométrie. Dans le tableau II, nous avons répertorié quelques techniques fréquemment utilisées pour le dosage des FRO (BOUSSETTA et *al.*, 2010 ; FREITAS et *al.*, 2009 ; DANG et *al.*, 2006). Ces techniques sont classées dans le tableau II en fonction de la nature de la

sonde utilisée et la forme de radical détectée. Certaines sont destinées pour le dosage des FRO intracellulaires et d'autres pour détecter les FRO extracellulaires.

Tableau II. Quelques techniques de mesure de formes réactives de l'oxygène produites par le neutrophile (Adapté à partir de FREITAS et *al.*, 2009).

Sonde	Techniques	FRO détectée	Localisation intra- ou extracellulaire	Avantages et limitations
DCFH-DA	Cytométrie en flux	H ₂ O ₂ , HO°, NO, ONOO ⁻	Intracellulaire	Très sensible et spécifique
Luminol	Chimioluminescence	O ₂ ^{°-} , H ₂ O ₂ , HO°, HOCl, NO, ONOO ⁻	Extracellulaire / Intracellulaire	Très sensible Mesure plusieurs formes de FRO Dépend des peroxydases pour mesurer l'H ₂ O ₂
Iso-luminol	Chimioluminescence	O ₂ ^{°-}	Extracellulaire	Peut être complémentaire au luminol
Lucigenine	Chimioluminescence	O ₂ ^{°-}	Extracellulaire	Très sensible et spécifique
Cytochrome c	Spectrophotométrie	O ₂ ^{°-}	Extracellulaire	Facile à mettre en œuvre Peu sensible mais spécifique
NBT	Spectrophotométrie	O ₂ ^{°-}	Intracellulaire	Facile à mettre en œuvre Le NBT est soluble dans l'eau

1.6.2. Les pièges extracellulaires des neutrophiles (Neutrophil Extracellular Trap)

La Netose (NET pour Neutrophil Extracellular Trap) représente un processus de bactéricidie, BRINKMANN et ZYCHLINSKY (2012) l'ont décrit comme une forme de mort cellulaire caractérisée par une perte d'intégrité des structures intracellulaires, accompagnée d'une rupture de la membrane plasmique (Figure 8). Ce processus libère un mélange de filets extracellulaires d'ADN, de filaments de chromatine dépliée, d'histones et aussi des molécules issues de la dégranulation notamment la lactoferrine, l'élastase, la myéloperoxydase et la gélatinase (BRINKMANN et *al.*, 2004 ; NAUSEEF , 2007; KANTARI et *al.*, 2008).

Comme pour toutes les fonctions du neutrophile, la NETose est déclenchée par des cytokines et aussi par les endotoxines bactériennes. Leur émission dépend de l'activité de la NADPH oxydase, puisque ces pièges n'apparaissent pas quand la

NADPH oxydase est inhibée. Elle serait également indépendante de la phagocytose, il a été montré chez la souris que la génération des NET se produisait lorsque la phagocytose d'agents pathogènes n'était pas possible en raison de leur grosse taille (BRANZK et al., 2014).

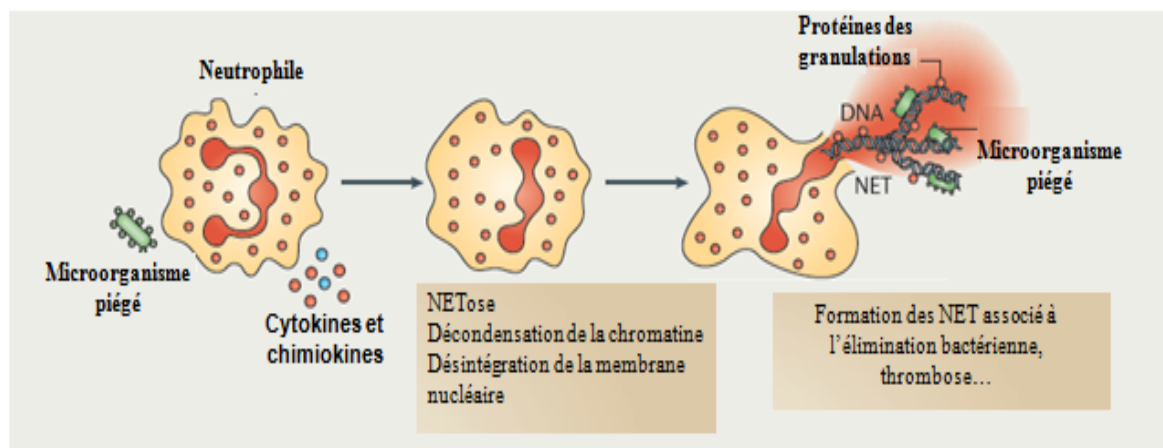


Figure 8. Les pièges extracellulaires des neutrophiles (Neutrophil Extracellular Trap) (MANTOVANI et al., 2011). Les neutrophiles activés englobent les microorganismes et libèrent le contenu antimicrobien de leurs granules dans le phagosome accompagné de chromatine qui, ensemble, forment des fibres extracellulaires qui lient des bactéries.

Jusque là, il est admis que les NET sont de simples pièges à microorganismes capable de rendre efficace la fonction microbicide, grâce à une concentration locale importante en composants antimicrobiens. Récemment, il a été démontré que la NETose participait aussi aux dommages tissulaires au cours des maladies inflammatoires (sepsis, asthme, thrombose...), et que certains de leurs composants étaient à l'origine du développement de maladies auto-immunes telles que le lupus via l'ADN/LL37, les vascularites dues à la protéinase 3, ils sont probablement impliqués dans le cancer (KNIGHT et KAPLAN, 2012; BARNADO et al., 2016 ; LIU et al., 2017).

1.7. Les voies de signalisation activées par le fMLP et le PMA

Les neutrophiles sont des cellules capables de reconnaître plusieurs types de stimuli, qu'ils soient exogène ou endogène de nature synthétique ou naturelle, les réponses restent très spécifiques et ciblées grâce aux récepteurs de surface. Le neutrophile est activé naturellement par des bactéries, levures, complexe immuns. Dans les

conditions non physiologiques, particulièrement dans l'étude de l'explosion oxydative, il peut être activé par des agents solubles notamment le fMLP et le PMA (Figure 9).

La voie activée par le peptide d'origine bactérienne le fMLP mobilise des récepteurs de surface les « formyl peptides receptors » ou FPR auxquels il se lie et active les protéines G trimériques. Les récepteurs aux protéines G « RCPG », les FPR contrôlent plusieurs réponses dans le neutrophile, allant de la production des FRO, la dégranulation et le chimiotactisme.

L'activation de la protéine G engendre une cascade de signalisation dans le neutrophile menant à l'activation de la phospholipase C, qui l'hydrolyse le PI(4,5) P2 en diacylglycérol (DAG) et inositol-(1,4,5)-triphosphate (IP3) L'IP3 second messenger qui libère du calcium « Ca^{2+} » et augmente sa concentration cytosolique (LI et *al.*, 2009). Le DAG active la PKC, une kinase qui a un rôle crucial dans la phosphorylation des sous unités de la NADPH oxydase. Il s'ajoute à cela l'activation de la PI3K qui phosphoryle PI3P et le PI(4,5) P2 impliqués dans l'activité de la NADPH oxydase (PLANAT et *al.*, 1996 ; DORWARD et *al.*, 2015).

Quant au PMA, il induit l'activation directe de la protéine kinase C (PKC). La réponse oxydative des neutrophiles au PMA est caractérisée par une phase de latence comparée à celle du fMLP dont le déclenchement du pic de stimulation est rapide. Le PMA est utilisé d'ailleurs comme un contrôle positif d'activation de la NADPH oxydase.

La stimulation du neutrophile est particulière, car il ne répond qu'une seule fois au même agoniste, on parle d phénomène de désensibilisation. Le récepteur au fMLP est connu lui aussi pour être désensibilisé. Cette désensibilisation résulte probablement soit de l'internalisation du récepteur, soit de la phosphorylation du récepteur par les PKC, ou aussi de la remobilisation insuffisante du calcium intracellulaire.

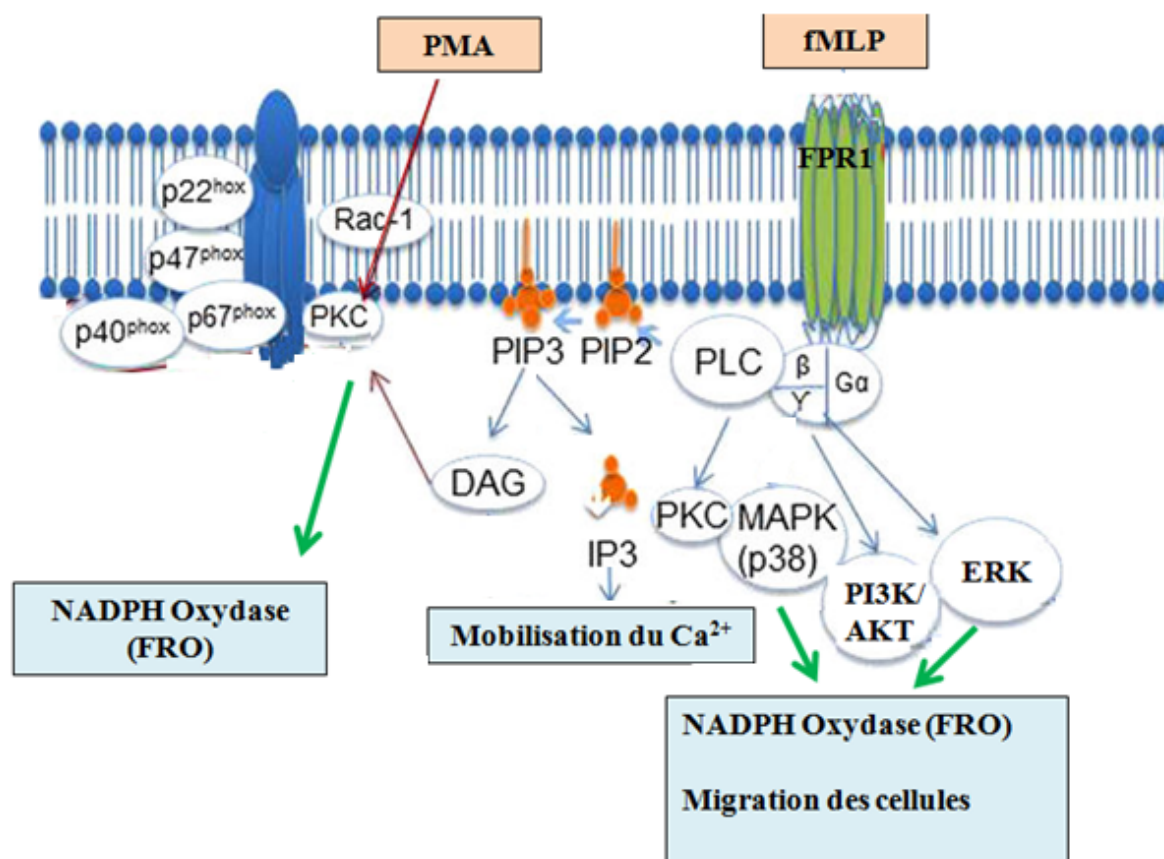


Figure 9. Les voies de signalisation mobilisées suite à l'activation du PN par le fMLP et le PMA (adaptée de SHIMADA et al., 2015). Le tripeptide bactérien N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) stimule le neutrophile via son récepteur FPR couplé aux protéines G, qui active la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en diacylglycerol (DAG) et inositol triphosphate (IP3). Par l'intermédiaire de seconds messagers les MAP kinases activées vont induire la dégranulation et la migration cellulaire. L'IP3 libère le Ca²⁺ qui active avec le DAG la protéine kinase C (PKC) impliquée dans la dégranulation du neutrophile et l'activation de la NADPH oxydase. Le phorbol myristate acétate (PMA) est un analogue du DAG qui entre dans le PN et active la PKC.

II. Les sous produits d'olive, les polyphénols et l'inflammation

Cette partie sera consacrée aux sous produits d'olive notamment les eaux de végétation communément appelés les margines, nous parlerons également de polyphénols (pp) de manière générale puis de ceux de l'olive en particulier l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine. Nous ferons le point sur leurs bienfaits pour la santé notamment dans le cas de l'inflammation.

2.1. Les margines d'olive et leurs intérêts

L'oléiculture est très bénéfique pour l'homme mais engendre en contre partie des déchets ayant un impact très négatif sur l'environnement, notamment sur les nappes phréatiques, cours d'eau, sol et végétaux. La région méditerranéenne produit environ 95% de margines mondiales (NAFZAOU, 1991 ; KAPELLAKIS *et al.*, 2006). Ces eaux de végétations sont toxiques de part leurs charge en matière organique, mais aussi de pp en concentration relativement importante. Ces pp sont présents également dans l'huile d'olive, et jouent un rôle important dans sa conservation dans le temps et sa stabilité, leur concentration varie en fonction de la maturité de l'olive pressée, mais aussi des conditions de trituration.

Malgré le caractère polluant des margines, leurs teneurs en pp les rend une source non négligeable de molécules anti-oxydantes et un sous produits valorisable. Les margines d'olive ont une composition très variable, elles contiennent environ 83% d'eau, entre 4 à 16% de matières organiques (SANCOUCY, 1984 ; RANALLI, 1991) et 7 à 10% de substances minérales, avec un taux de matière grasse allant de 3 à 10% (SANCOUCY, 1984 ; FIESTAS, 1992 ; BELAQZIZ *et al.*, 2017). Quant aux pp ils représentent 5,5 à 12% des margines (SANCOUCY, 1984 ; FENICE *et al.*, 2003). La valorisation des margines est un véritable challenge, car tout procédé d'extraction nécessite une utilisation de solvants, notamment pour l'extraction des pp, comme ils sont les seules molécules bioactives majoritaires dans l'olive.

2.2. Définition des polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques que l'on retrouve très largement dans le règne végétal, à savoir les fruits, les légumes, les graines, les épices, le café, le cacao, les noix, la bière, le vin et huile d'olive, ils sont présents dans notre alimentation quotidienne (VINSON *et al.*, 2001). Ce sont des métabolites

secondaires des végétaux, très diversifiés du point de vue structural, les pp se caractérisent par la présence d'au moins un cycle aromatique à six carbones et d'un nombre variable de groupement hydroxyles. Dans la nature, les pp existent généralement conjugués avec des acides organiques et des sucres, ils sont répartis en fonction de leur complexité de leur structure chimique comme le montre le diagramme de la figure 10.

Les pp sont associés à la couleur et à la qualité sensorielle des aliments, notamment à leurs propriétés anti-oxydantes, ceux de l'olive sont produit pour permettre à l'arbre de résister aux conditions de stress environnemental et aux insectes (JAPON-LUJAN, 2006).

Les pp montrent des variations structurales dans les chaînes de leurs squelette du carbone et aussi des modifications au niveau de leurs structures primaires et secondaires suite à des méthylations, des glycosylations et des hydroxylations (XIAO et *al.*, 2013). Ces modifications seraient responsables de leurs différents avantages pour la santé, y compris leur pouvoir antioxydant. De manière générale, le nombre de groupement hydroxyles et leur position, le degré d'hydroxylation et la distance entre le noyau aromatique et le groupe carbonyle des pp jouent un rôle central dans leur activité anti-oxydante et leur propriété chélatante des métaux. Grâce à leur structure chimique les pp ont une multitude d'activités biologiques. Ils sont connus pour leurs propriétés anti oxydantes et anti-inflammatoire qui sont à l'origine de plusieurs pathologies liés au stress oxydant, telles que le cancer, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires (VISIOLI et *al.*, 2002 ; BARBARO et *al.*, 2014).

Dans ce contexte, l'olive et ses sous produits représentent une source très intéressante de pp. Dans l'olive et les margines, les teneurs en pp varient suivant la variété et le degré de maturité des olives, en plus des procédés d'extraction de l'huile d'olive et des pratiques agricoles à savoir l'irrigation et le traitement.

L'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sont les principaux pp trouvés dans les olives, les feuilles et aussi dans les margines d'olives. L'oleuropeine, est le composé le plus abondant dans les feuilles d'olivier, elles en contiennent environ 20%, la dégradation enzymatique de l'oleuropeine génère de l'hydroxytyrosol, majoritairement présent

dans les margines (Tableau III). La composition des margines d'olive en pp a été largement étudiée et tout les travaux indiquent que la molécule prédominante est

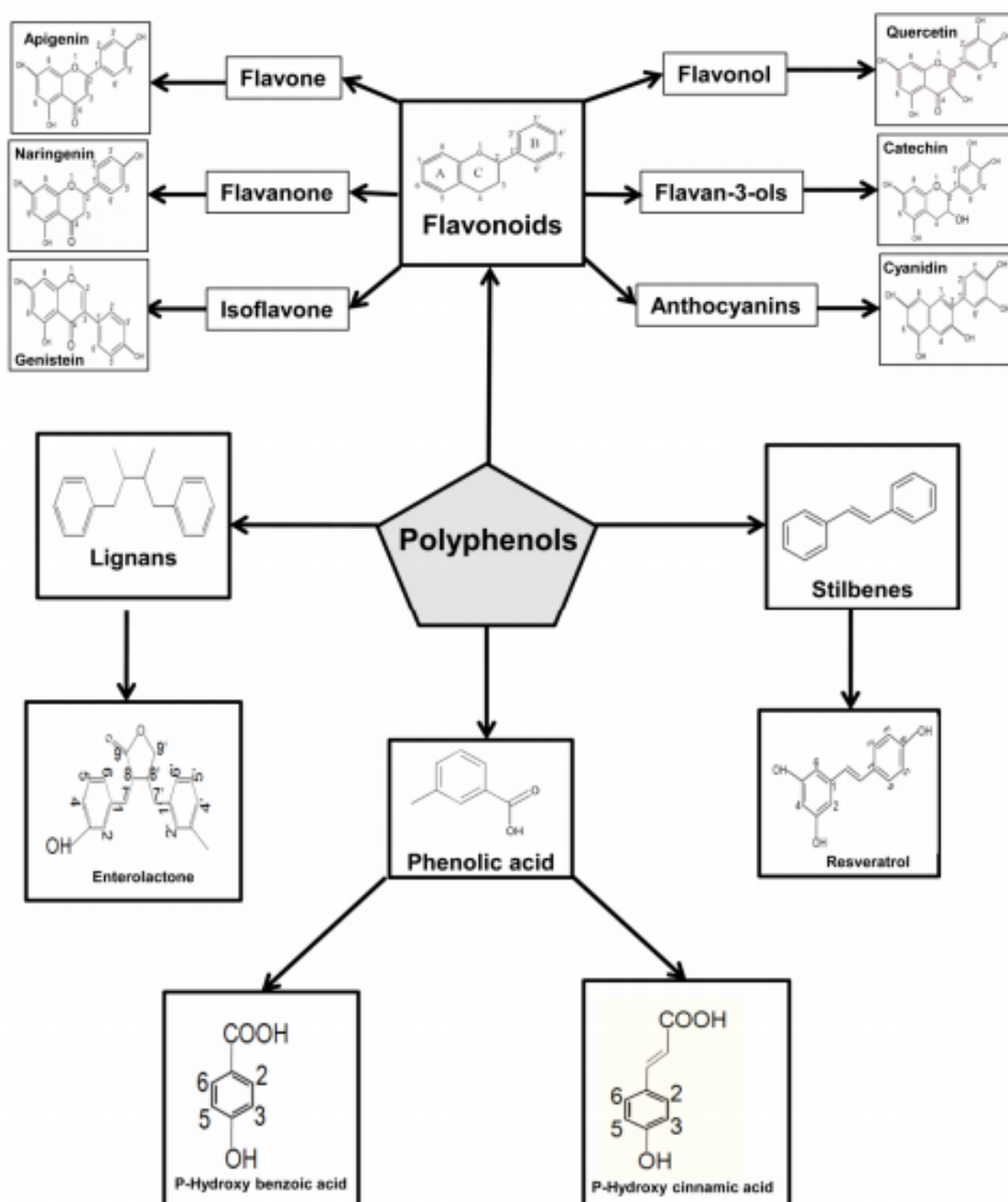


Figure 10. Diagramme résumant les classes de pp et leurs structures chimiques de base (ABDAL DAYEM et al., 2016). Les pp sont répartis en deux grandes familles de flavonoïdes et de non-flavonoïdes. La classe des flavonoïdes comprend deux anneaux de benzène, liés par un cycle en C de pyrone hétérocyclique. La classe des non-flavonoïdes contient des molécules plus complexes, à savoir l'acide benzoïque, les hydroxycinnamates, les stilbènes, les lignanes, les tannins, les acides galliques et les gallotannins.

l'hydroxytyrosol, avec une proportion avoisinant les 60% (DE MARCO et *al.*, 2007 ; AZAIZEH et *al.*, 2012 ; BELAQZIZ et *al.*, 2017). Dans le tableau III, nous avons repris les teneurs en pp dans les margines selon AZAIZEH et *al.* (2012). Les propriétés des pp d'olive sont bien connues, ils ont été inclus dans plusieurs thérapies, notamment contre le diabète, l'athérosclérose, l'hypertension et d'autres pathologies.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux margines d'olives comme étant une matrice valorisable, et aussi aux molécules actives qu'elle renferme, notamment l'oleuropeine et l'hydroxytyrosol, pour lesquels nous donnons un récapitulatif de leurs structures, et leurs propriétés.

2.3. Biodisponibilité des polyphénols

Les bienfaits des pp sur la santé dépendant de leur consommation mais aussi de leur biodisponibilité. La consommation quotidienne moyenne de pp est estimée à environ un gramme (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000). Cependant, la biodisponibilité des pp reste changeante en raison de la variabilité de leur absorption dans l'intestin. En effet cette absorption est fortement influencée par la matrice alimentaire, la microflore présente dans le colon, ainsi que par le type du composé, sa structure chimique, notamment par sa glycosylation, son estérification et sa polymérisation etc. (MANACH et *al.*, 2005).

MANACH et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que les concentrations plasmatiques des métabolites totaux de pp chez l'homme humain varieraient entre 0 à 4µm/l pour une ingestion de 50mg d'aglycone, avec une détection dans divers tissus notamment le cerveau, les cellules endothéliales, les reins, le cœur, le pancréas, les testicules, la prostate, la peau ainsi que dans les ovaires et l'utérus. D'après d'autres auteurs cette concentration serait comprise entre 0,1 et 25 µM (COVAS, 2006 ; ZRELLI et *al.*, 2011; RAFEHI et *al.*, 2012). Le taux éliminé dans les urines serait de 0,3% à 40%, en finalité le taux d'absorption des pp n'est pas le seul à être modulé par leurs structures mais aussi leur situation dans les tissus. Au niveau de l'intestin, les pp se trouvant dans la lumière intestinale traversent la membrane apicale des cellules épithéliales via des co-transporteurs SGLT1 pour sodium et glucose transporteur dans les cellules épithéliales (SCALBERT et *al.*, 2002 ; HENRY-VITRAC et *al.*, 2006 ; CHEN et *al.*, 2013). Dans les cellules hépatiques leur transport implique la diffusion passive et des transporteurs actifs. Les pp subissent

en parallèle de leur transport dans les cellules un phénomène de reflux vers la lumière intestinale via les transporteurs ABC (ATP binding cassette) (JUAN et *al.*, 2009).

Dans l'intestin grêle, seuls les glycosides peuvent être absorbés, à l'exception des glycosides liés à un rhamnose, qui sont métabolisés par l'enzyme, l' α -rhamnosidase, sécrétée par la microflore dans le côlon. Quant aux glycosides, ils peuvent être métabolisés par plusieurs enzymes, y compris la β -glucosidase cytosolique (Henry vitrac, 2006) et la lactase à base de la membrane, la phlorizine hydrolase (NAKAGAWA et *al.*, 1997 ; DAY et *al.*, 2000; GEE et *al.*, 2000). Les pp acétylés sont absorbés directement au niveau des entérocyte sans être hydrolysés. Quant aux acides hydroxycinnamiques, qui sont estérifiés avec les acides organiques, les lipides ou les sucres, ils sont partiellement absorbés dans l'intestin grêle, une grande partie est métabolisée par la microflore du colon. L'oleuropeine est moins absorbé par rapport l'hydroxytyrosol, à cause de sa partie glycosylée qui est hydrophile, l'hydroxytyrosol est décrit comme étant une molécule amphiphile et en conséquence plus efficace, ceci est montré dans plusieurs travaux (VISIOLI et *al.*, 2001 ; VISSERS et *al.*, 2004).

Tableau III. Concentration des polyphénols présents dans les margines d'olive
(Adapté de AZAIZEH et *al.*, 2012).

Composé phénolique	Concentration dans les margines (mg/ml)
Hydroxytyrosol	30 - 60
Tyrosol	24,47
Acide caféique	2,25
Acide vanillique	4,11
Verbascoside	3,06
Oleuropeine	3,78
Acide ferrulique	4,83
Acide p-coumaric	4,25

2.4. Caractéristiques et propriétés chimiques de l'oleuropeine et de l'hydroxytyrosol

L'oleuropeine est un ester d'acide élénolique et de tyrosol hydroxylé et glycosylé. C'est une grosse molécule de 539 g/mol responsable du goût amer des olives non traitées (SHASHA et LEIBOWITZ, 1961), l'oleuropeine conférerait à l'olivier une résistance naturelle contre l'attaque microbienne et parasitaire (FLEMING et *al.*, 1973). Il est présent en majorité dans les feuilles et les branches de l'olivier. Durant la maturation du fruit (olive noire), l'oleuropeine s'hydrolyse et se décompose en hydroxytyrosol et acide élénolique sous l'effet de la lumière, le traitement par un acide ou par une base et également sous l'effet des températures élevées.

L'oleuropeine a été isolé en 1959 (SHASHA et LEIBOWITZ) sa structure chimique est définie également (Figure11), et depuis, cette avancée n'a cessé d'ouvrir de nouvelles voies pour l'étude des mécanismes d'action de base de cette molécule. Cette molécule extraite à partir de feuilles de l'olivier qui en contiennent environ 17% (WANG et *al.*, 2008) est commercialisée, elle est purifiée à partir des sous produits oléicoles, ou peut être synthétisée chimiquement (LEE- HUANG, 2007).

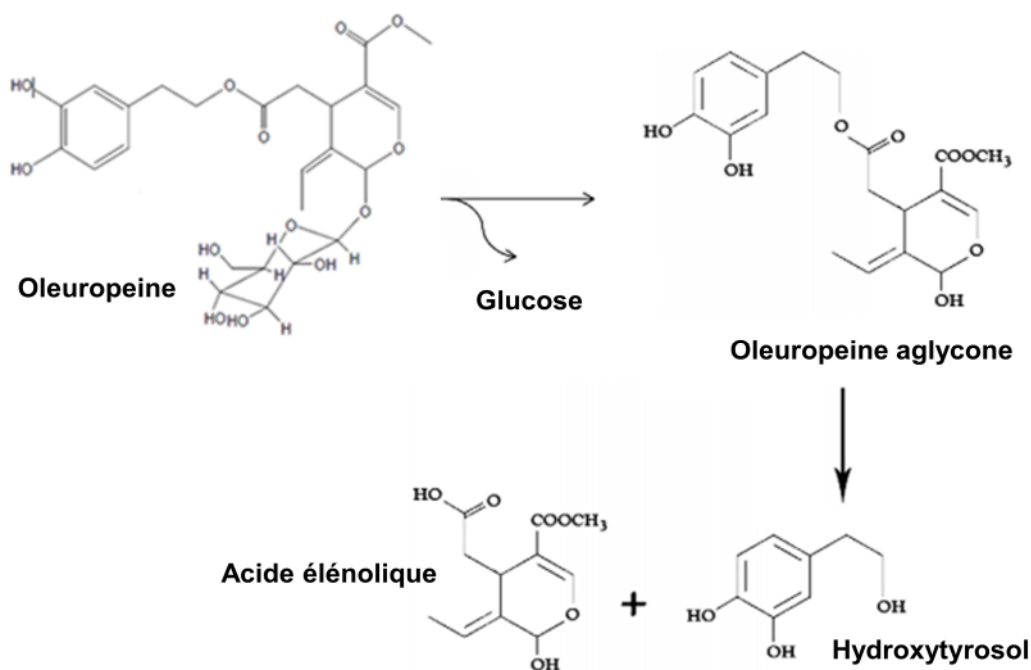


Figure 11. Formation de l'hydroxytyrosol à partir de l'hydrolyse de l'oleuropeine (Adapté de GRANADOS-PRINCIPAL et *al.*, 2010 ; YUAN et *al.*, 2015).

L'hydroxytyrosol ou le 2-(3-4-dihydroxyphenyl) éthanol, qui est une petite molécule ayant une masse molaire de 153 g/mol, est plutôt abondante dans les sous produit de l'olive étant donné qu'il provient de la dégradation de l'oleuropeine, et se trouve en minorité dans les feuilles puisque elles n'en contiennent que 0,01%-0,8% (YE et *al.*, 2011).

2.5. Le régime méditerranéen, les polyphénols et l'inflammation

L'huile d'olive vierge est la principale huile alimentaire consommée en région méditerranéenne, elle contribue d'ailleurs significativement au profil de santé supérieur observé chez cette population. Initialement, l'huile d'olive vierge était appréciée pour sa richesse en acides gras mono insaturés, en particulier de l'acide oléique, cette propriété était considérée comme étant la principale caractéristique saine de l'huile d'olive vierge. Plus tard, les pp d'olive font surface avec tous leurs bienfaits, et se voient associés à tous les bienfaits de l'huile d'olive. Leurs propriétés et leurs effets antioxydants seront largement étudiés (VISIOLI et *al.*, 2002 ; O'DWOD et *al.*, 2004 ; ZHANG et *al.*, 2009 ; PARKINSON et CICERALE, 2016).

Actuellement, de nombreuses études ont montré les effets protecteurs de l'oleuropeine et de son métabolite l'hydroxytyrosol contre le stress oxydatif, les maladies neurodégénératives et le cancer. Dans certains travaux, les auteurs ont proposé les mécanismes par lesquels agissent ces deux molécules et exercent leurs effets protecteurs (ZRELLI et *al.*, 2011 ; RAFEHI et *al.*, 2012 ; BARBARO et *al.*, 2014 ; ANDREADOU et *al.*, 2015 ; GINER et *al.*, 2016).

Les activités anti-inflammatoires des pp constituent des mécanismes importants qui seraient à l'origine de leurs potentiels anticancéreux et chémopréventifs. Les effets anti-inflammatoires des pp sont attribués à leurs capacités à inhiber les activités du NF- κ B (SEO et *al.*, 2012 ; ROSILLO et *al.*, 2014), la cyclooxygénase (COX-2) ainsi que la lipooxygénase (DE LA PUERTA, 1999).

O'DWOD et ses collaborateurs (2004) ont montré que l'hydroxytyrosol agit par piégeage des espèces réactives de l'oxygène, à savoir le peroxyde d'hydrogène dans les neutrophiles humains isolés. En outre, l'hydroxytyrosol possède un effet anti-inflammatoire, en inhibant la libération des cytokines inflammatoires (RICHARD et *al.*, 2011).

L'oleuropéine est décrit comme un inhibiteur efficace de l'invasion et de la prolifération des cellules de gliome (LIU et *al.*, 2016), il induit également une apoptose des cellules d'hépatome humain HepG2 via l'activation de caspases (YAN et *al.*, 2015). Dans le contexte inflammatoire induit par la carragénane, IMPELLIZZERI et ses collaborateurs (2011) ont montré une réduction de l'infiltration des leucocytes chez des souris traitées avec de l'oleuropeine aglycone.

2.6. Les activités biologiques des polyphénols d'olives

La qualité et la composition chimique de l'olive varie en fonction de son origine, les conditions climatiques, la teneur en humidité et la contamination du sol (MARTIN-GARCIA et MOLINA-ALCAIDE, 2008). Les composés phénoliques trouvés dans l'olive et ses feuilles sont l'oleuropeine, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide coumarique, etc (DE MARCO et *al.*, 2007). L'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sont deux molécules biologiquement actives et sont présentes majoritairement dans l'huile d'olive vierge ainsi que dans les margines. L'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sont connus pour leurs effets bénéfiques pour la santé, et ont démontré des effets pharmacologiques sur plusieurs cellules et dans différents contextes (VISIOLI, 1998 ; RIETJENS et *al.*, 2007 ; NADOUR et *al.*, 2012). Les deux molécules « l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine » ont montré des effets protecteurs contre la peroxydation des lipides induite par les radicaux grâce à leurs fort potentiel antioxydant, ceci à été démontré largement dans plusieurs contextes *in vitro* et avec plusieurs radicaux libres notamment au niveau des hématies (NADOUR et *al.*, 2012), les neutrophiles et les systèmes acellulaires (VISIOLI et *al.*, 2002 ; UMENO et *al.*, 2015). Il convient de noter qu'à des doses élevées l'oleuropeine, l'hydroxytyrosol, peuvent exercer une activité pro-oxydante (LUO et *al.*, 2013).

L'extrait de feuilles d'olivier particulièrement riche en oleuropeine a fait l'objet de nombreuses investigations et de recherches pharmacologiques et épidémiologiques. En effet, des études sur les souris ont révélé que l'extrait de feuilles d'olivier engendre un effet hypoglycémiant intéressant chez l'homme et également chez les souris (MUROTOMI et *al.*, 2015 ; KHALILI et *al.*, 2017).

Par ailleurs, les effets de pp d'olive contre l'obésité sont observés, dans une étude il a été démontré que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine réduisaient la différenciation des précurseur d'adipocytes ainsi l'accumulation de lipides et la taille des cellules

graisseuses étaient réduites également (DRIRA *et al.*, 2011). L'oleuropeine est décrit comme étant un inhibiteur de l'adipogenèse et un activateur de l'ostéoblastogenèse à partir des cellules souche de la moelle osseuse, ce qui protégerai de l'ostéoporose (SANTIAGO-MORA *et al.*, 2011). Il a également des effets cardioprotecteurs et anti diabétiques (AL-AZZAWIE et ALHAMDANI, 2006 ; NEKOOEIAN *et al.*, 2014). Dans le tableau IV nous avons récapitulé quelques effets et activités biologiques des pp d'olive.

Tableau IV. Activités biologiques des polyphénols d'olive

<i>Activité</i>	<i>Effets</i>	<i>Références</i>
Anti-oxydante	Piégeage des radicaux libres Inhibition de l'oxydation des LDL	O'DWOD <i>et al.</i> , 2004 WOOD <i>et al.</i> , 2004; Goldsmith <i>et al.</i> , 2015 WOOD <i>et al.</i> , 2004 ; MORSELLI <i>et al.</i> , 2010
Anti-inflammatoire	Inhibition de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires Inhibition de la lipooxygénase	UNGVARI <i>et al.</i> , 2010; GROSSI <i>et al.</i> , 2013 BAYRAM <i>et al.</i> , 2012
Anti-tumorale	Arrêt du cycle cellulaire et effet antiprolifératif Induction de l'apoptose Effet anti-migration Prévention des métastases Réduction de l'angiogénèse	ACQUAVIVA, 2012, GOLDSMITH <i>et al.</i> , 2015; RIGACCI, 2010 NEVES, 2010 HASSAN <i>et al.</i> , 2012 SCODITTI, 2012; EFENTAKIS, 2015
Anti-microbienne	Déstabilisation de la membrane des cellules bactériennes	FABIANI, 2008
Antivirale	Inhibition de l'intégrase virale Interaction avec l'enveloppe virale	BOEKHOLDT, 2004; EBAID, 2010 MICOL, 2005
Neuroprotective	Réduction du stress oxydatif Inhibition de la fébrilisation de Tau	OMAR, 2010 DACCACHE, 2011
Régulation des troubles métaboliques	Réduction de la glycémie Modulation de la sensibilité à l'insuline Réduction de la glycémie cholestérolémie et inhibition de la lipogenèse	WAINSTEIN, 2012 KONSTANTINIDOU, 2009 JEMAI, 2009

Partie expérimentale

Matériel & Méthodes

I. MATERIEL ET METHODES

1.1. MATERIEL

1.1.1. Les polyphénols totaux extraits des margines d'olives

Les margines d'olives ont été collectées dans une huilerie moderne durant la période de récolte d'olive en mois d'octobre (2012), dans la région de Tizi-Ouzou à Béni-Douala. L'échantillon est aliquoté puis congelés à -20°C jusqu'à son utilisation.

L'extrait de polyphénols brut est préparé à partir des margines d'olive dans le Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB).

1.1.2. L'oleuropéine et l'hydroxytyrosol

Les molécules d'olive pures proviennent de chez sigma Aldrich.

1.1.3. Le sang

Les échantillons de sang sont prélevés soit à l'hôpital Xavier Bichat de Paris soit dans l'établissement français de sang (EFS de Cabanel à Paris). Le sang est prélevé soit sur de l'acide citrique dextrose (ACD) soit de l'héparine ou l'ACD ou de l'EDTA (Ethylène diamine tétra-acétique).

La liste des produits utilisés est représentée dans l'annexe 1.

1.2. METHODES

1.2.1. Méthodes d'isolement

1.2.1.1. Extraction des polyphénols à partir des margines d'olive

La méthode utilisée pour extraire les composés phénoliques à partir des margines d'olive est basée sur l'utilisation de l'acétate d'éthyle suivant la méthode décrite par DE MARCO et ses collaborateurs (2007) (Figure 12). L'acétate d'éthyle est un solvant ayant la propriété de pouvoir fixer les polyphénols contenus dans les margines. Les margines d'olives sont soumises à une centrifugation pendant 20 min à 800g pour décanter les résidus solides et les éliminer. Le surnageant est mélangé à l'acétate d'éthyle avec un volume de surnageant pour 4 volumes de solvant, le mélange est soumis à une évaporation sous vide avec un évaporateur rotatif (Buchi), puis aliquoté dans des tubes eppendorfs pour une autre évaporation des solvants à l'aide d'un speed-vac. L'extrait brute obtenu est conservé à -20°C .

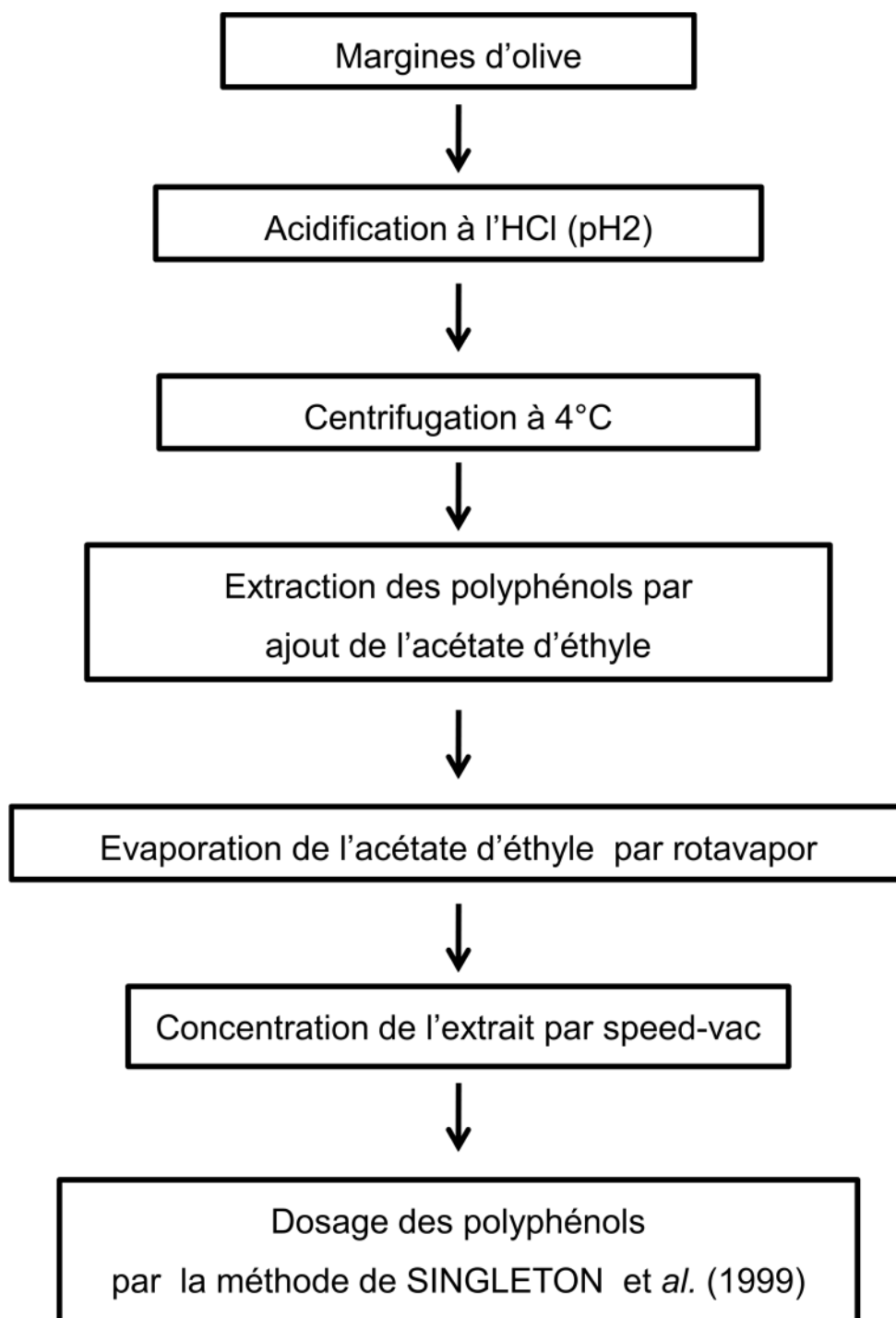


Figure 12. Diagramme résumant les étapes de purification des polyphénols à partir des margines (DE MARCO et al., 2007).

1.2.1.2. Isolement de neutrophiles

1.2.1.2.1. Isolement des neutrophiles par la méthode du Dextran-Ficoll

Le but de cette méthode est de séparer les cellules sanguines à partir d'un sang frais prélevé sur un anticoagulant. Le principe est basé sur la séparation des composants du sang en fonction de leur densité. Le nombre de neutrophiles récupérés à partir d'une poche à 400 ml de sang à l'issus de l'isolement varie entre 6 et 10 x 10⁸ de neutrophiles.

L'isolement des PN (Figure 13) commence par un mélange d'un volume de sang à un volume de Dextran-T500 à 2% (préparé à l'avance dans du NaCl 0,9% et filtré). Après 30 min d'incubation à température ambiante, la majorité des érythrocytes précipitent au fond du tube et la phase supérieure contient les globules blancs, cette dernière est récupérée dans des tubes propres et les globules rouges de la phase inférieure sont jetés. La phase contenant les globules blancs est centrifugée pendant 8 min à 400g à 22°C. Le culot est resuspendu dans du tampon phosphate, puis déposé sur un coussin de Ficoll et centrifugé pendant 30 min à 400g et à 22°C. Après cette étape, trois phase se distinguent, le culot correspond aux granulocytes (éosinophiles, neutrophiles et basophiles) avec les érythrocytes contaminants, les cellules mononuclées (monocytes et lymphocytes) forment un anneau entre le culot et le surnageant est un mélange de plasma, tampon phosphate et le ficoll.

La lyse des érythrocytes résiduels est effectuée par l'addition d'une solution hypotonique de NaCl à 0,2% froide au culot, en mélangeant pendant 40 secondes, l'isotonicité est rétablie par ajout du même volume de NaCl à 1,6%. La solution est tamponnée par ajout de tampon phosphate froid. Les neutrophiles sont récupérés dans un petit volume de tampon phosphate, après une centrifugation pendant 8 min à 400g et 4°C. Les neutrophiles sont conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

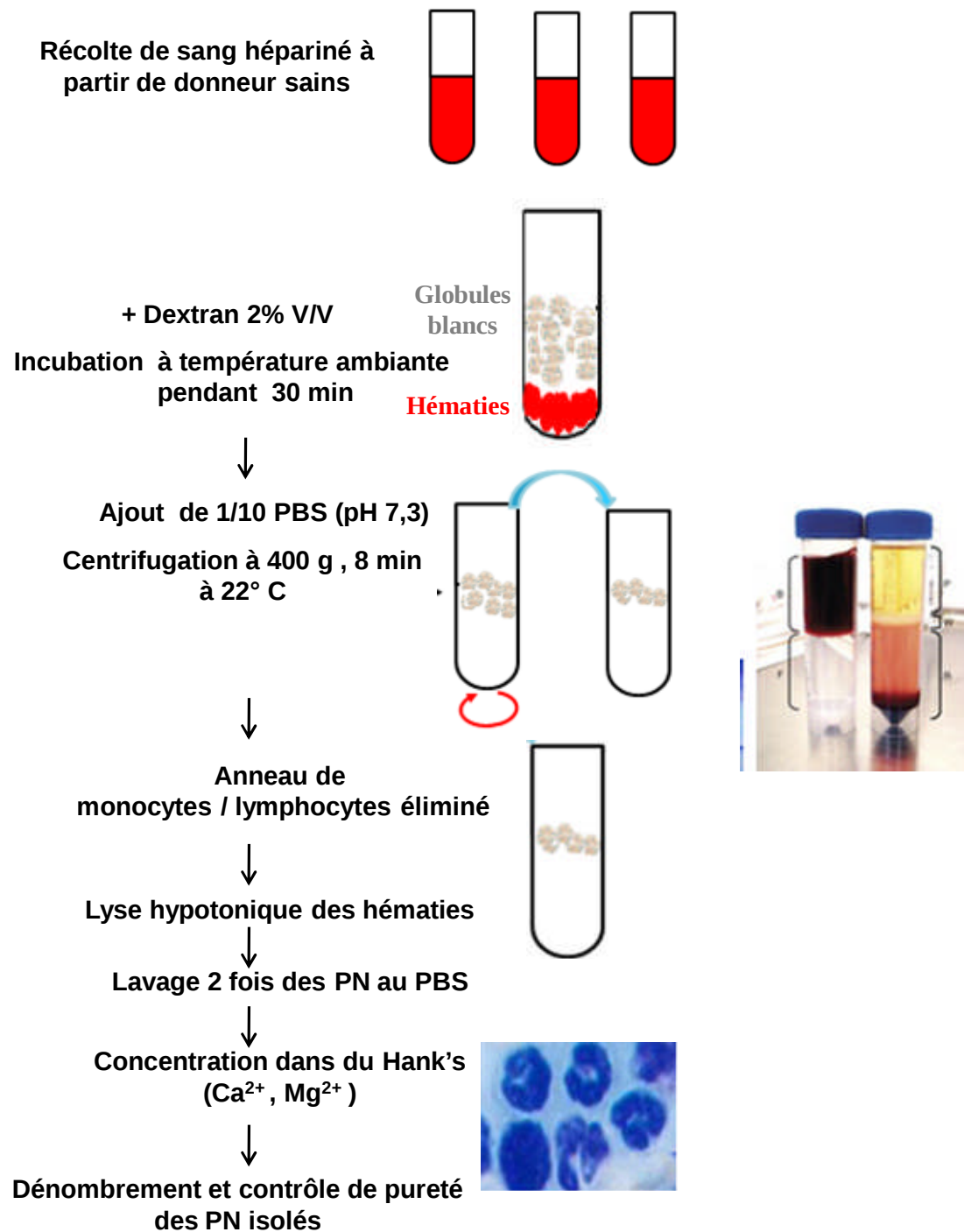


Figure 13. Diagramme résumant les étapes d'isolement des neutrophiles à partir de sang humain

1.2.1.2.2. Isolement des neutrophiles par la méthode de l'histopaque

Elle est basée sur l'utilisation de deux polysaccharides commercialisés ayant des densités différentes. Elle consiste à superposer deux gradients de l'Histopaque-1119 (15ml) de Histopaque-1077 (10 ml) (Sigma) et par dessus sans mélanger les différentes phases un volume de sang (25ml) est déposé. Les tubes sont centrifugés à 400g et à 22°C pendant 30 min. Après la centrifugation, plusieurs phases sont distinguées, en haut le plasma à éliminer, au milieu l'anneau opaque contient les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) : les monocytes-lymphocytes et les neutrophiles se trouvent dans la phase rougeâtre située entre l'anneau et le culot. L'anneau de neutrophiles est aspiré par une pipette, mis dans du tampon phosphate et centrifugé à 400g pendant 8 min à 4°C. Après la centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon phosphate. Les Neutrophiles sont comptés sur une cellule de Malassez, puis conservés à 4°C, jusqu'à leur utilisation.

1.2.2. Méthodes de quantification

1.2.2.1. Détermination de la concentration des polyphénols totaux

La quantité de pp totaux dans l'extrait brut est déterminée selon la méthode de folin-Ciocalteu décrit par SINGLETON et *al.*, (1999). Le principe du dosage est basé sur la réduction des acides phosphomolybdique et tungstique par les composés phénoliques lors de la réaction. L'oxydation des pp engendre une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de pp, est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 760 nm. L'acide gallique est utilisé comme référence (Annexe 2) pour établir une gamme d'étalonnage (Figure 14).

Le dosage consiste à mélanger 125 µl d'échantillon ou de dilutions à 500 µl d'eau distillée, avec le même volume (125 µl) de réactif de Folin-Ciocalteu et 1,25 ml de carbonate de sodium (solution à 7%). Le volume total est complété à 3ml avec de l'eau distillée. Le tout est incubé à l'obscurité pendant une heure à température ambiante avant de mesurer par spectrophotométrie (avec un spectrophotomètre de marque Uvikon 931 Contron). L'absorbance est mesurée à 760 nm. La concentration de pp est exprimée en équivalent d'acide gallique (EqGA), sachant que la gamme des concentrations d'acide gallique est comprise entre 0 et 0,05 mg/ml (Annexe 1). La courbe d'étalonnage obtenue est représentée dans la figure 14.

Pour les tests, l'extrait de pp est solubilisé et dilué dans un tampon phosphate, dépourvu de calcium et de magnésium, provenant de sigma.

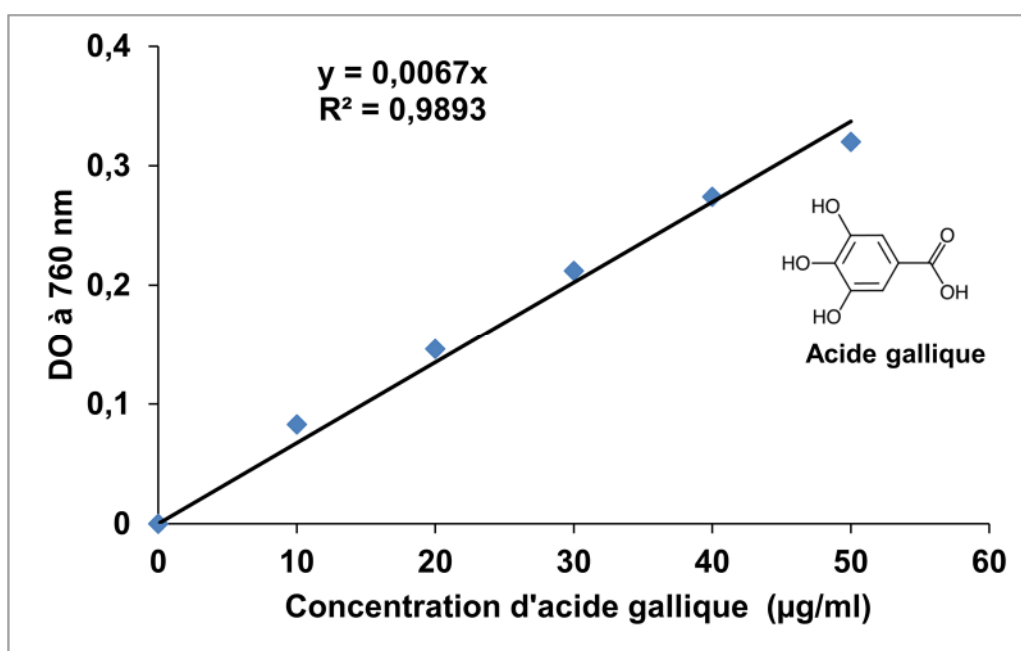


Figure 14. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

1.2.2.2. Test de viabilité et de pureté des neutrophiles

Le test de viabilité des neutrophiles est assuré par le test d'exclusion du bleu de Trypan qui colore les cellules mortes en bleu. Alors que la pureté des PN est vérifiée avec un autre colorant, le cristal violet qui colore les noyaux des cellules, ce qui permet de distinguer le noyau polylobé caractéristique des neutrophiles des autres noyaux cellulaires. Le dénombrement se fait sur une lame de Malassez par microscopie photonique au grossissement x 40.

1.2.2.3. Evaluation du pouvoir antioxydant des pp d'olive : Mesure des différentes formes réactives de l'oxygène produites par le PN

Il existe plusieurs techniques de dosage de FRO spécifiques à chaque forme. Les sondes utilisées à cet effet diffèrent par leur propriétés structurales en particulier l'hydrophobicité, ce qui fait que certaines ciblent les FRO produites en milieu intracellulaire et d'autres détectent les FRO extracellulaires (BRIHEIM et *al.*, 1984 ; USHIJIMA et *al.*, 1997 ; BEDOUHENE et *al.*, 2017).

1.2.2.3.1. Mesure de la production des formes réactives de l'oxygène totales par le luminol

Le dosage des formes réactives de l'oxygène (FRO) totales produites par les neutrophiles humains se fait par la technique de chimioluminescence amplifiée au luminol ($C_8H_7N_3O_2$). Par définition, la luminescence est l'émission d'un photon lorsqu'une molécule excitée retourne vers un état énergétique moins élevé. Nous parlons de chimioluminescence lorsque cette excitation résulte d'une réaction chimique, notamment lors de la réaction d'oxydation (Figure 15).

Le luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione) est une molécule sensible aux radicaux libres, elle émet une lumière bleue après oxydation. Cette technique détecte toutes les FRO et elle est dépendante des peroxydases (EDWARDS, 1996 ; NAUSEEF, 2014).

Cette sonde est de loin la plus utilisée pour mesurer la production des FRO, notamment dans les systèmes biologiques. Grâce à sa propriété de diffusion à l'intérieur de la cellule, le luminol détecte les FRO intra- et extracellulaires. Les FRO résultants de l'activation cellulaire oxydent le luminol, la lumière produite par cette réaction est proportionnelle à la quantité de FRO.

Malgré la sensibilité et l'utilisation large de la méthode de chimioluminescence amplifiée par le luminol, elle reste peu claire et garde certaines ambiguïtés quant au type de FRO qu'elle détecte.

Il a été longtemps admis que la lumière émise par le luminol serait due à la réaction du peroxyde de l'hydrogène avec les myéloperoxydases présentes dans les phagocytes (BRIHEIM et *al.*, 1984 ; USHIJIMA et *al.*, 1997).

Durant ce travail de thèse nous avons montré que luminol est capable de détecter l'anion superoxyde de l'oxygène en absence des peroxydases mais pas le peroxyde d'hydrogène, et en présence des peroxydases le luminol est capable de détecter les deux formes à la fois à savoir l'anion superoxyde de l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène (BEDOUHENE et *al.*, 2017).

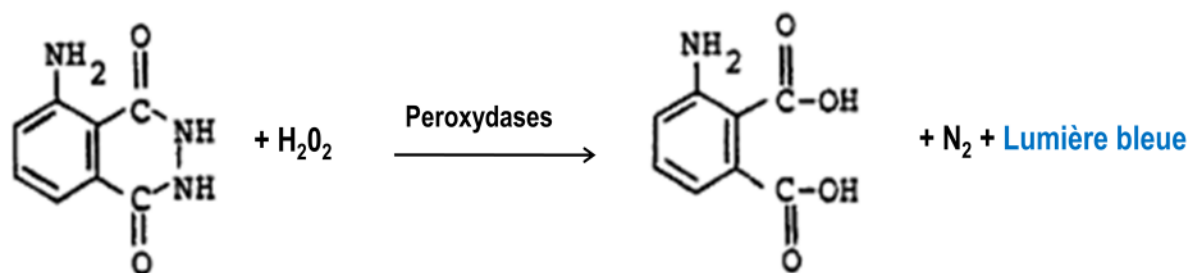


Figure 15. Réaction de chimioluminescence. Le luminol est oxydé par le peroxyde d'hydrogène, cette réaction produit une lumière bleue mesurable au luminomètre.

En pratique, les neutrophiles à une concentration de 10^6 cellules/ml sont incubés à 37°C dans un luminomètre de marque Berthold, en présence de $10\text{ }\mu\text{M}$ de luminol, et de concentrations croissantes de l'extrait de pp brute [0 ;12 ;25 ;50 ;100; 200; 250] $\mu\text{g/ml}$ ou de molécules pures d'hydroxytyrosol et d'oleuropeine [0;10;20; 40; 80;100] μM , puis stimulés ou non avec différents agonistes le fMLP à 10^{-6}M , le PMA à 100 ng/ml . La lumière est mesurée pendant 30 min. Les résultats sont exprimés en coup par minute (cpm) produits pendant 30 min.

1.2.2.3.2. Mesure de l'explosion oxydative des polynucléaires neutrophiles par la technique de réduction du cytochrome c

La production d' $O_2^{\bullet-}$ par les neutrophiles activés est mesurée par la technique de réduction du cytochrome c (YONETANI, 1960). Le principe de cet essai est basé sur l'utilisation du cytochrome c oxydé « Fe^{3+} » en présence d'une source productrice d'anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) comme les neutrophiles ou par un système acellulaire composé de xanthine/hypoxanthine et xanthine oxydase (technique décrite plus loin dans les méthodes). En présence de ce radical « $O_2^{\bullet-}$ » très réactif et instable, le cytochrome c est réduit en Fe^{2+} . Ce test détecte exclusivement l'anion superoxyde extracellulaire car le cytochrome c ne traverse pas la membrane cellulaire, la mesure du cytochrome réduit se fait par spectrophotométrie à 550nm (Figure 16).

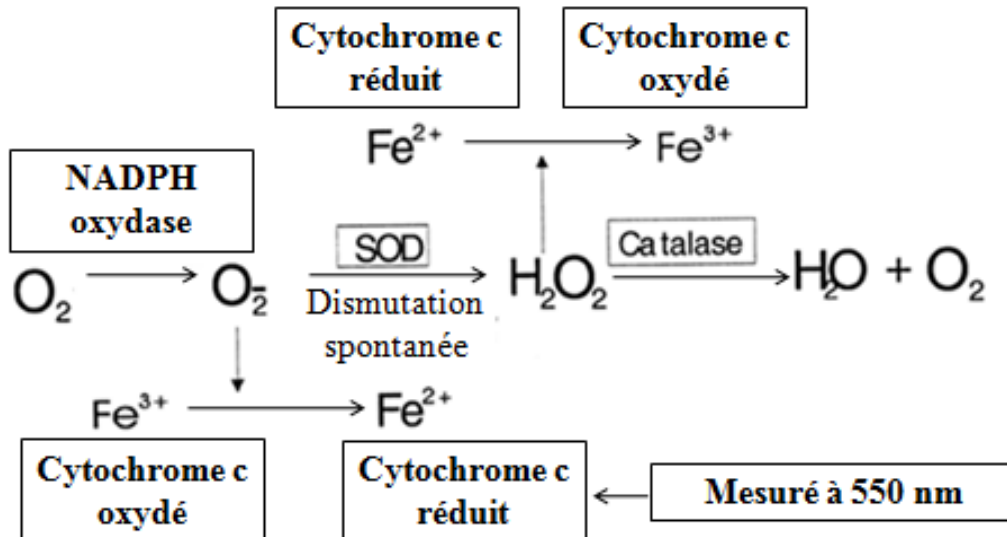


Figure 16. Mesure de la production de l'anion superoxyde (HOLLMANN et al., 2001). Ce test est basé sur la réduction du cytochrome c

En pratique les neutrophiles à 10^6 cellules/ml dans du tampon phosphate sont prétraitées avec des concentrations croissantes de pp totaux [0;12; 25; 50; 100; 200; 250] $\mu\text{g/ml}$ pendant 10 min à 37°C . Les cellules sont incubées en présence de cytochrome c à 1mg/ml final puis stimulés avec du PMA (100 ng/ml) et la DO est mesurée à 550nm en utilisant un spectrophotomètre thermostaté de marque UVIKON 860 (Annexe 3). La production d' $O_2^{\cdot -}$ est mesurée pendant 10 min et les résultats sont exprimés en nano moles d' $O_2^{\cdot -}$ produites par minute et par million de neutrophiles en utilisant la loi de Beer lambert : $A = \epsilon \cdot C \cdot l$, où ϵ est le coefficient d'extinction molaire ($\text{l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), A étant l'absorbance (sans unité), C est la concentration du soluté (mol/l).

1.2.2.3.3. Mesure de la production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) intracellulaire par la cytométrie en flux

La technique utilisée est celle de la cytométrie en flux, mise au point par VAN et ses collaborateurs (1999) pour mesurer les fonctions du neutrophile. Elle est basée sur l'utilisation de la sonde Carboxy-H2-DiChloro DiHydro Fluorescein DiAcetate (CDCDHFDA) provenant de Molecular Probe Eugene, OR, USA. Cette sonde qui est sous forme diacétyl est perméante, elle diffuse à travers les membranes des cellules grâce à ses 2 groupements acetoxy methylesters (AM). Une fois à l'intérieur, les estérases cellulaires hydrolysent la queue AM, ce qui donne au final un composé

plus hydrophile qui se trouve piégé et maintenu dans le compartiment cytosolique. Ce composé hydrophile « la dichlorofluoresceine » (HDCF) est non fluorescent, mais peut être rapidement oxydé en un composé fluorescent DCF par les radicaux libres et les autres FRO générés dans la cellule. La mesure de H_2O_2 produit dans le compartiment intracellulaire se fait par cytométrie en flux. Le test consiste à pré-incuber les neutrophiles (5×10^5 cellules) avec le 2,7-DCFH-DA ($100 \mu M/ml$) pendant 15 minutes dans du tampon Hank's, le tout dans un bain marie à $37^\circ C$ et à l'abri de la lumière, en présence de concentrations croissantes de pp totaux [0; 25; 50; 100; 200] $\mu g/ml$. Les neutrophiles sont stimulés par le PMA (Phorbol Myristate Acétate) à $100 ng/ml$ pendant 15 min. La réaction est arrêtée en mettant les cellules à $4^\circ C$ pendant 15 min. La mesure en cytométrie en flux est effectuée par un cytomètre de marque Becton Dickinson FACS Cantoll (Immuno Cytometry Systems). L'intensité de la fluorescence est mesurée simultanément à deux longueurs d'ondes, à 488 nm pour l'excitation et à 530 nm pour l'émission. L'analyse des résultats est faite avec le logiciel FACS Diva, les résultats sont exprimés en moyenne de l'intensité de fluorescence (MIF) pour quantifier les réponses des cellules. L'effet de l'extrait de pp sur la production de l' H_2O_2 est calculé par l'utilisation de l'index de stimulation (SI), le ratio de la MIF des cellules stimulées versus non stimulées.

1.2.2.3.4. Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans le système acellulaire

Nous avons réalisé cet essai pour vérifier le résultat obtenu en cytométrie en flux et confirmer l'effet de l'extrait phénolique sur la seule forme de FRO, à savoir le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le principe de la réaction est expliqué plus haut dans la mesure des FRO totaux au luminol.

En présence de concentrations croissantes de l'extrait de polyphénols brute [0; 10; 20; 50; 100] $\mu g/ml$, nous avons ajouté l' H_2O_2 à 0,003% et 5 unités d'HRPO ($250 U/mg/ml$), le tout dans un volume réactionnel de $500 \mu l$. La lumière est mesurée pendant 15 min sous forme de cinétique. Les résultats sont exprimés en coup par minute (cpm).

1.2.2.3.5. Test de la xanthine oxydase

Le système xanthine oxydase est un système *in vitro* ou acellulaire qui produit spécifiquement l'anion superoxyde. Nous avons effectué ce test pour confirmer l'effet

des pp sur le superoxyde de l'oxygène comme c'est la seule forme produite dans ce système.

Le test se fait en présence du ferri-cytochrome c « Fe³⁺ » qui est réduit sous l'effet de l'O₂^{•-} en « Fe²⁺ », le cytochrome c réduit est détectable à 550 nm par spectrophotométrie. Si la réaction se fait en présence de la superoxyde dismutase (SOD), celle-ci va exercer un effet antioxydant en dismutant l'anion superoxyde produit par la xanthine oxydase en H₂O₂, ce qui va inhiber la réduction du cytochrome c qui devrait être oxydé par l'O₂^{•-}.

Techniquement, la xanthine (100 µM) est dissoute dans de l'eau en présence de NaOH (5n) puis elle est diluée avec du tampon phosphate (PBS). Le cytochrome c lyophilisé est préparé à 20 mg/ml. L'essai se fait dans un volume final de 500 µl en mélangeant 100 µl de Xanthine avec 25 µl de cytochrome c, la réaction est déclenchée avec 1 unité de xanthine oxydase (1000U/mg/ml). Les changements d'absorbance sont suivis à 550nm au spectrophotomètre.

1.2.3. Les techniques évaluant les fonctions du neutrophile

1.2.3.1. La technique de dégranulation des neutrophiles

La dégranulation des neutrophiles vise à faire sécréter le contenu des vésicules des cellules stimulées, la quantification du contenu libéré est dosé par l'activité de la myéloperoxydase (MPO) comme protéine de référence pour cette fonction. Il est également possible de quantifier les protéines spécifiques des différents granules en utilisant la méthode du western blot qui est très sensible.

La dégranulation des neutrophiles peut être induite dans les conditions *in vitro*, en les pré-incubant en présence de la cytochalsine B (5µg/ml) pendant 5min avant de les stimuler avec le fMLP (10⁻⁶ M), la réaction est arrêtée en centrifugeant les cellules. Afin de tester les effets des pp sur les fonctions des neutrophiles, ces derniers sont pré-incubés en présence et en absence de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine pendant 30 min à 37°C avant d'induire la dégranulation.

Après centrifugation des neutrophiles pendant 8 min à 4°C, le surnageant est récupéré pour doser l'activité de la myéloperoxydase. Une partie de surnageant est dénaturée 5 minutes à 100°C dans le tampon de dénaturation Leammli contenant

62,5mM de Tris-HCl (pH 6,8), 4% de 2-mercapto-éthanol, 2,5% de SDS, 10 % de glycérol et quelques gouttes de bleu de bromophénol (LAEMMLI, 1970) pour détecter la MPO par SDS-PAGE et western blot.

-Mesure de l'activité de le myéloperoxydase

La méthode utilisée pour mesurer l'activité de la MPO est la méthode spectrophotométrique décrite par BRADELY et *al* (1984), modifiée. Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation du réactif utilisé l'ortho-Dianisidine (3,3'-Dimethoxybenzidine) en présence du peroxyde d'hydrogène. La réaction produit une coloration orange, dont l'intensité varie en en fonction de la concentration de la myéloperoxydase présente dans le milieu réactionnel.

L'essai consiste à mélanger un volume (50 µl) de surnageant contenant la MPO, dilué avec du tampon phosphate, un volume (50 µl) de peroxyde d'hydrogène à 0,0005% et un volume (50 µl) d'ortho-Dianisidine à 2mg / 2ml, est complété avec du tampon phosphate pour arriver à un volume final de 500µl. Le changement d'absorbance à 460 nm est suivi et enregistré au spectrophotomètre (UVIKON 860) pendant 10 min à température ambiante (20°C). Les résultats sont exprimés en unité/mg de protéine, sachant qu'une unité d'activité de MPO consomme 1µmole de peroxyde d'hydrogène/min.

1.2.3.2. Test de chimiotactisme des neutrophiles

Le test de migration des PN est réalisé suivant la méthode de NELSON et *al.*, (1975), en utilisant un gel d'agarose à 0,7% de marque LKB (BROMMA). L'agarose est solubilisé dans (27 ml) d'HBSS (Hank's balanced salt solution, sigma Aldrich) par chauffage au micro-onde, après refroidissement partiel (48 °C), 3 ml de sérum de veau foetal (svf) décomplémenté (30 min à 56°C) sont ajoutés à l'agarose. Le gel est coulé (5 ml) dans des boite de pétri de 5cm de diamètre (falcon plastics). Une fois l'agarose est solidifiée, quatre séries de trois puits alignés (3 mm de diamètre interne et espacés de 3 mm) sont formés avec un emporte pièce. L'agarose est aspirée à l'aide d'une pompe à vide, afin de nettoyer les puits. Pour ce test les cellules sont préparées à 100×10^6 cellules/ml, elles sont traitées ou pas avec des concentrations croissantes d'hydroxytyrosol et d'oleuropeine [0; 10; 20; 40; 80; 100] µM. 5µl des cellules différemment traitées sont déposées dans les puits centraux, 5 µl de chimioattractant fMLP (10^{-7} M) sont déposés dans tous les puits périphériques

(externes) et enfin 5µl de tampon phosphate sont déposés dans tous les puits internes (Figure 17).

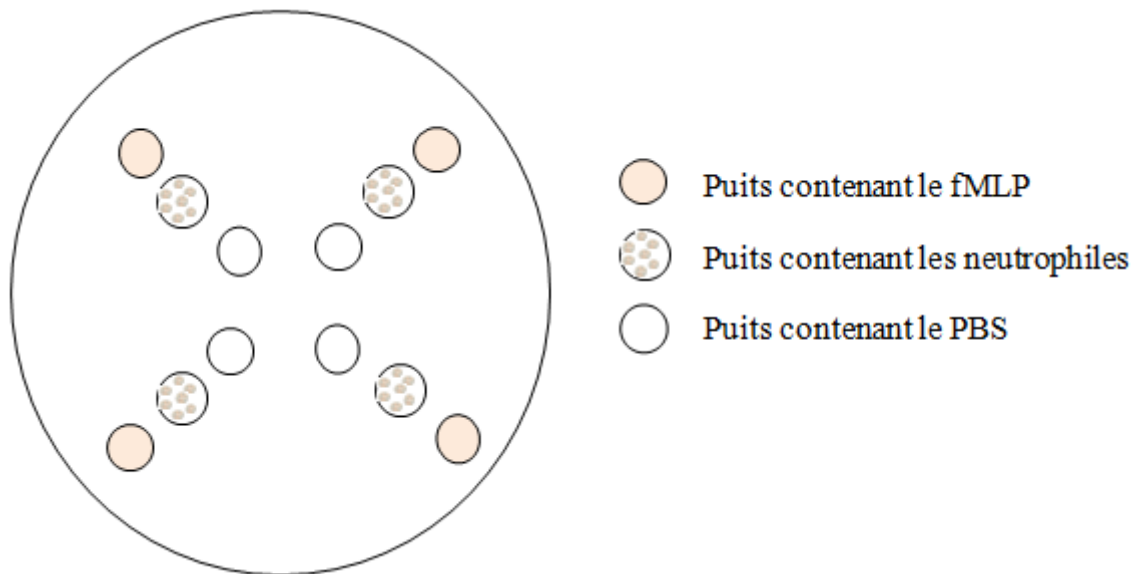


Figure 17. Schéma représentant le test de chimiotactisme. L'agarose solubilisée est coulée dans une boîte de pétri de 5 cm de diamètre, puis 4 séries de 3 puits sont confectionnés. 5 µl de fMLP, de neutrophiles ou de PBS sont déposés en respectant leurs positions respectives, suivant le schéma.

Les boîtes sont incubées pendant 2h à 37°C. La migration des cellules est observée au microscope inversé de marque Zeiss, doté d'une caméra. L'index de chimiotactisme est déterminé en mesurant la largeur du front de migration des cellules (du côté fMLP) par rapport à la migration spontanée (du côté du tampon phosphate). Les résultats sont représentés en ratio par rapport au control fMLP.

1.2.4. Étude des voies de signalisation de neutrophile

Pour vérifier l'effet des pp sur voies impliquées dans l'activation des neutrophiles, notamment la p38MAP kinase (MAPK), AKT et ERK1/2, les PN sont incubés en présence des polyphénols, puis dénaturés les protéines sont analysés par SDS-PAGE et Western-blot.

Les neutrophiles, sont re-suspendus dans du tampon Hank's à une concentration 10×10^6 de cellules dans un volume final de 400 µl. Les cellules sont pré-incubées pendant 5 min dans un bain marie à 37°C, en absence ou en présence de pp, puis stimulées ou non avec du fMLP (10^{-6} M) pendant 5 min.

La stimulation des cellules est arrêtée en ajoutant 100µl du tampon de dénaturation de LAEMMLI concentré 5 fois contenant 325mM Tris-HCl (pH à 6,8), 20% de 2-mercapto-éthanol, 12,5% SDS, 50% de glycérol, des inhibiteurs de protéases et de phosphatases et quelques gouttes de bleu de bromophénol (LAEMMLI, 1970).

Les protéines ensuite sont dénaturées à 100°C pendant 3 min. Après la dénaturation, les cellules sont soumises à une sonication 3 fois pendant 10 secondes pour casser l'ADN.

1.2.5. Electrophorèse des protéines (SDS-PAGE)

1.2.5.1. Préparation des échantillons et le gel d'électrophorèse

Les échantillons sont préparés suivant le protocole décrit ci-dessus. Brièvement, les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 3 min dans le tampon Laemmli, l'ADN visqueux dans ce tampon est solubilisé en le cassant par sonication 3 fois pendant 10 secondes.

La technique d'électrophorèse consiste à faire migrer les protéines dénaturées et chargées négativement par le SDS dans un gel jouant le rôle de tamis moléculaire sous l'effet d'un courant électrique. Ainsi les protéines seront séparées selon leur taille uniquement. La migration se fait sur deux gels de polyacrylamide coulés entre deux plaques en verre espacées de 1,5mm. Le gel de séparation contient 10% d'acrylamide et le gel de concentration est coulé en surface, il contient 4% d'acrylamide. (voir l'annexe 4 pour la préparation des gels d'électrophorèse).

Le gel de séparation est composé d'eau bi-distillée, de Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8), 0,1 % de SDS (20%), 10% d'acrylamide /Bis (30%), 0,1% de persulfate d'ammonium et 0,05% Temed. Quant au gel de concentration, il est composé de Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8), du SDS (20%), 10% d'acrylamide/Bis (30%), 0,1% de persulfate d'ammonium et 0,05% de Temed. Les puits sont formés avec un peigne déposé en surface de ce dernier gel. Les échantillons sont déposés dans les puits, dont l'un comme témoin de poids moléculaire de référence. La migration des protéines se fait dans tampon en utilisant un tampon de migration contenant 0,025M de Tris-Base, 0,192M de Glycine et 0,1% de SDS (pH 8,3), à 70 volt pendant 10 min pour concentrer les protéines au même niveau, puis à 160 volt pendant environ 1h (DEYL, 1979; WALKER, 2002).

1.2.5.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose et révélation des protéines

Le transfert se fait en milieu liquide, c'est-à-dire, tout le système est plongé dans le tampon de transfert, composé de 20% d'éthanol ; 50 mM de Tris ; 95 mM de glycine et 0,08% de SDS (Annexe 5). Lors de l'assemblage du système de transfert le gel et la membrane de nitrocellulose sont mis en sandwich entre des feuilles de papier wattman et des éponges, la membrane de nitrocellulose se trouve du côté de l'anode, et le gel est du côté de la cathode puisque le sens de transfert se fait de la cathode vers l'anode. Pour commencer le transfert, le système est plongé dans une cuve remplie de tampon de transfert, puis soumis à une tension de 70V pendant 1h30 min (TOWBIN et *al.*, 1979). A la fin, le transfert peut être vérifié en incubant la membrane dans du rouge ponceau, colorant réversible de protéines, il peut être éliminé par simple rinçage à l'eau.

1.2.5.3. Détection des protéines par des anticorps primaires spécifiques

Les membranes sont incubées en premier lieu dans une solution contenant du tampon Tris-NaCl-Tween 20, composé de 25Mm Tris-HCl (pH 7,4) ; 150 Mm NaCl et 0,05%Tween et 5% de lait dépourvu de matière grasse pour saturer les sites de liaison non spécifiques, cette étape se fait à température ambiante pendant 1 heure sous agitation. Ensuite, les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires spécifiques (anti-MPO, anti lactoferrine, anti phospho p38, anti phospho AKT et anti phospho ERK1/2) dilués à des concentrations optimales dans une solution de TBS-Tween à 1% de lait. (Voir l'annexe 6 pour les concentrations des anticorps utilisés).

1.2.5.4. Fixation des anticorps secondaires

A l'issue de la fixation des anticorps spécifiques primaires, les membranes de nitrocellulose sont lavées 3 fois pendant 5 min dans du tampon TBS-Tween pour éliminer l'excès d'anticorps primaires non fixés. Elles sont ensuite incubées pendant une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires anti-lapin (GAR-HRP) ou anti-souris (GAM-HRP) couplé à la peroxydase à une dilution au 1/10000 ème dans une solution de TBS-Tween à 1% de lait. Les membranes sont par la suite lavées 3 fois pendant 5min dans du tampon TBS-Tween pour éliminer l'excès

d'anticorps secondaires non fixés. La révélation des protéines se fait par chimioluminescence en utilisant le kit commercial provenant de chez Santa Cruz.

1.2.5.5. La révélation des protéines à l'ECL (Enhanced Chemiluminescence)

La solution de révélation est préparée instantanément, en mélangeant un volume de peroxyde d'hydrogène et un volume de luminol. La membrane est incubée avec la solution de révélation pendant 1 minute à l'abri de la lumière, puis enveloppées dans du plastique et détectée grâce à une caméra « Amersham imager 600 ». L'intensité du signal varie en fonction de la durée d'exposition, de quelques secondes à quelques minutes.

1.2.5.6. Révélation des protéines à la phosphatase alcaline

Les mêmes membranes sont lavées avec du tampon TBS-Tween 3 fois pendant 5 minutes, puis incubées avec des anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline pendant une heure à température ambiante avec une dilution des anticorps au 1/5000ème dans une solution de TBS-Tween à 1% du lait. Les anticorps secondaires sont soit des anti-souris (GAR-AP) pour l'actine, ou des anti-lapins (GAR-AP) pour la MPO, lactoferrine, ERK1/2, AKT et la p38. Les membranes sont lavées 3 fois pendant 5 minutes avec du TBS-Tween pour éliminer l'excès d'anticorps secondaires non fixés. La détection se fait en mélangeant volume à volume les substrats NBT (Nitrobleu de Tetrazolium) et le BCIP (5-bromo, 4-chloro, 3-indolylphosphate), dilués chacun au 1/100 dans le tampon carbonate (pH 9,8) contenant NaHCO₃ (8,4g/l), MgCl₂·6H₂O (0,2033 g/l) dans de l'eau bi-distillée. La réaction est arrêtée par un simple lavage à l'eau.

La préparation de la solution de NBT se fait en dissolvant 0,150g de NBT dans 3,5ml DMF et 1,5ml d'eau bi-distillée. La solution de BCIP est préparée avec 0,075g de BCIP solubilisé dans 5 ml de DMF. Les deux solutions peuvent être stockées à -20°C.

1.2. 6. Analyse statistique des résultats

Les valeurs présentées dans les résultats représentent la moyenne $\pm$ SEM de n expériences indépendantes ($n \geq 3$). Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du test t apparié. Les variations sont considérées comme significatives si la valeur de

P est inférieure ou égale à 0,05. One-way ANOVA a été utilisé pour évaluer les différences entre les groupes en utilisant le logiciel Graph Pad Prism 5.

Résultats
&
Discussion

II. RESULTATS & DISCUSSION

2.1. Extraction et dosage des polyphénols d'olive issus des margines.

L'extraction des composés phénoliques est obtenue à partir d'échantillons de margines obtenus après purification comme décrit dans la section matériel et méthodes. La teneur moyenne en polyphénols totaux dans l'extrait final est déterminée par le test du Folin-Ciocalteu suivant la méthode de SINGLETON (1999). La concentration des polyphénols dans l'extrait est déterminée en équivalent d'acide gallique, en utilisant la courbe d'étalonnage en figure 14, elle était en moyenne de $120 \pm 0,38$ mg/l en équivalent d'acide gallique, la mesure étant effectuée sur trois essais. A l'issue de l'évaporation au speed-vac, les polyphénols sont plus concentrés, leur concentration est multipliée par 4 environ, ce qui nous donne une concentration de 450 mg/l. La concentration des pp dans les margines que nous avons obtenue est avoisinante à celle obtenue par AZAIZEH et *al.*, (2012) qui se situe entre 115 et 170 mg/l. La teneur des pp de notre échantillon se situe en dessous de celle obtenue par SOBHI et *al.* (2004) qui est d'environ 6,8 g/l et celle GONÇALVES et *al.* (2009) comprise entre 5 à 12g/l. Cette variabilité en concentration de pp dans les margines est influencée par plusieurs facteurs à savoir l'origine géographique la variété, le stade de maturité de l'olive, la méthode de trituration, et aussi des pratiques agricoles notamment l'irrigation et le traitement. L'ensemble des résultats obtenus avec l'extrait brut de polyphénols a montré la richesse des margines d'olives en molécules anti oxydantes. Les différentes molécules de pp présentes dans les margines sont actuellement connues et identifiées par HPLC ainsi que leurs proportions (DE MARCO et *al.*, 2007 ; AZAIZEH et *al.*, 2012 ; BELAQZIZ et *al.*, 2017).

2.2. Test de cytotoxicité de l'extrait total de polyphénols des margines.

Avant de tester les effets de toutes ces molécules, nous avons vérifié leur effet sur la viabilité des neutrophiles, ce test est très important si l'on envisage d'utiliser ces molécules chez l'homme. Afin de tester les extraits purifiés, la pureté des neutrophiles fraîchement isolés est vérifiée avec le cristal violet (colorant à base de violet de Gentiane et d'acide acétique) et ils sont comptées (Figure 18).

Les cellules sont re-suspendues dans du tampon phosphate et conservées à 4°C avant de les utiliser.

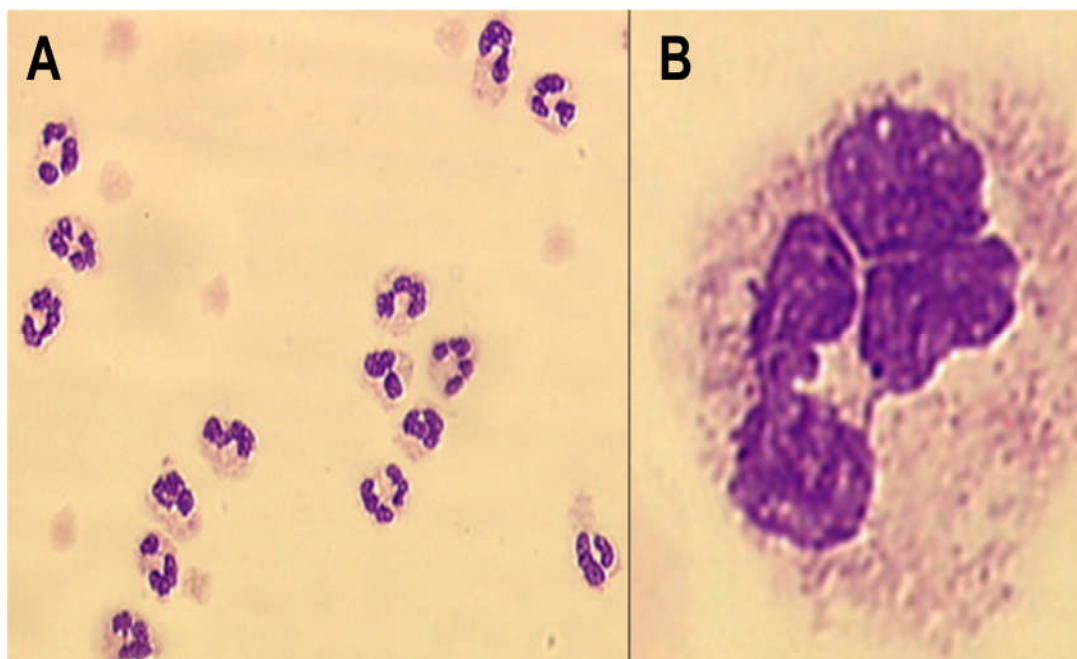


Figure 18. Photographies des neutrophiles. **A:** Neutrophiles isolés colorés au cristal violet et observés au microscope optique au grossissement x40. **B :** Image d'un neutrophile agrandi 100x et qui est caractérisé par un noyau polylobé.

Avant de tester les extraits des polyphénols sur les neutrophiles, nous avons vérifié la cytotoxicité du produit, en incubant les neutrophiles en présence de fortes concentrations de polyphénols allant de 0 à 250 µg/ml pendant 30 min, les cellules mortes laissent pénétrer le bleu de trypan, ce qui les colorent en bleu, contrairement aux cellules vivantes qui restent transparentes.

Les résultats (Figure 19) montrent que l'extrait n'a eu aucun effet toxique sur les neutrophiles, même à des concentrations plus fortes, le taux de viabilité des neutrophiles dépasse les 95%, le taux de cellules mortes n'est donc pas significatif.

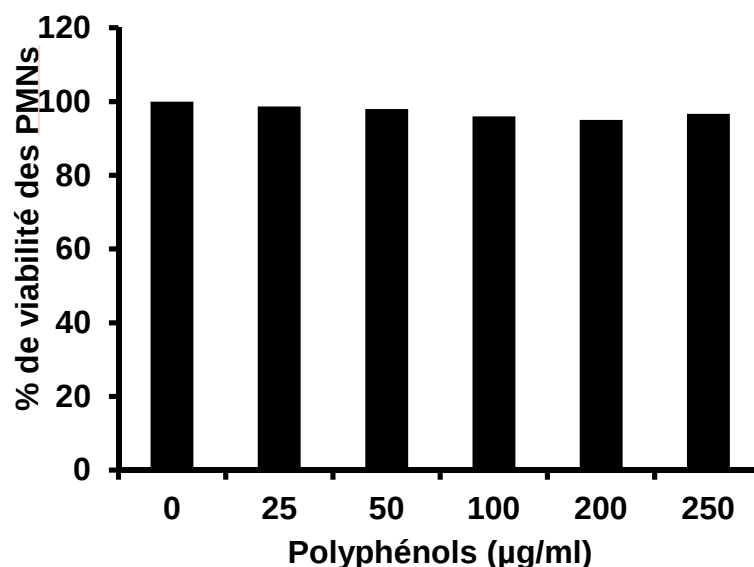


Figure 19. Test de cytotoxicité des polyphénols de margines sur les neutrophiles humains. Les neutrophiles sont incubés à des concentrations croissantes de l'extrait brut polyphénols [0 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 250] µg/ml, et la viabilité est évaluée après 30 min d'incubation par le test d'exclusion de bleu de Trypan. Les résultats sont exprimés en % de cellules vivantes après traitement par rapport aux cellules contrôles non traitées. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois essais.

2.3. Evaluation du pouvoir antioxydant de l'extrait phénolique des margines d'olives.

2.3.1. Effet de l'extrait de polyphénols sur la production des formes réactives de l'oxygène totales

L'effet de l'extrait phénolique d'olives est évalué en pré-incubant les neutrophiles à 37°C pendant 10 min, avec des concentrations croissantes de l'extrait phénolique [0 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 250] µg/ml.

Ensuite, la production des formes réactives de l'oxygène FRO (H_2O_2 , HOCl , $\text{O}_2^{\cdot-}$) est mesurée par la FRO chimioluminescence amplifiée au luminol. Les résultats présentés dans la figure 20, montrent que l'extrait de polyphénols inhibe fortement et de manière dose dépendante la production de FRO.

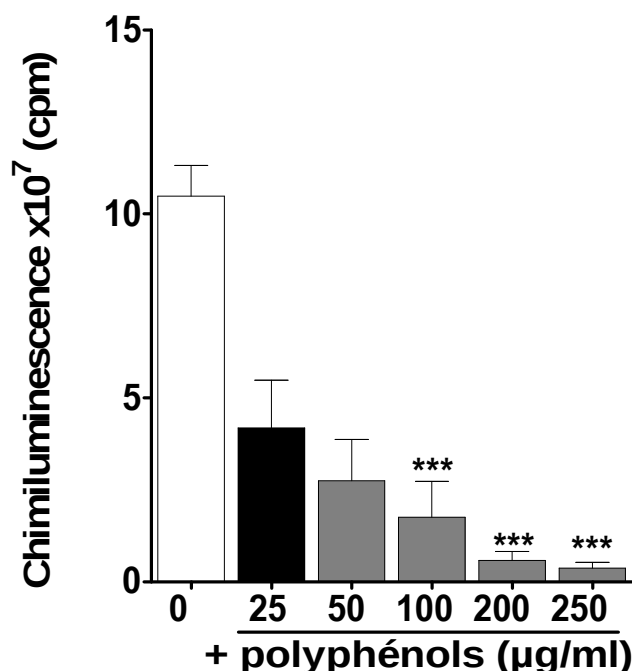


Figure 20. Inhibition de production de FRO totales. Effet des polyphénols sur la production de FRO totales par les neutrophiles. Les neutrophiles sont incubés avec des doses croissantes de l'extrait brut de polyphénols, en présence de luminol. Les cellules sont stimulées avec du PMA et la luminescence est mesurée pendant 30min à 37°C. Les résultats sont exprimés en cpm de lumière mesurée. Les résultats sont exprimés en moyennes de 5 expériences.

Ce résultat suggère deux possibilités, soit l'extrait agit en piégeant les FRO, soit en inhibant l'activité de la NADPH oxydase. Ces deux propositions ont été vérifiées chacune séparément dans des systèmes acellulaires spécifiques produisant chacun une seule forme de radicaux, le superoxyde et le peroxyde de l'hydrogène.

2.3.2. Effet de l'extrait phénolique de margines d'olive sur la production de l'anion superoxyde par les neutrophiles

Afin de spécifier l'effet de l'extrait de margines sur les FRO, nous avons mesuré dans les même conditions la production de l'O₂⁻ avec une sonde appropriée le cytochrome c qui détecte exclusivement l'anion superoxyde. La production de l'anion superoxyde est mesurée, la réduction du cytochrome c est suivie à 37°C en cinétique à 550 nm avec un spectrophotomètre de marque UVIKON 860.

Les résultats illustrés dans la figure 21 montrent que l'extrait de polyphénols inhibe la réduction du cytochrome c de manière dose dépendante. Ce résultat suggère que l'extrait de polyphénols inhibe soit l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles qui produit ce précurseur de FRO (l'anion superoxyde), soit il piège l'anion superoxyde.

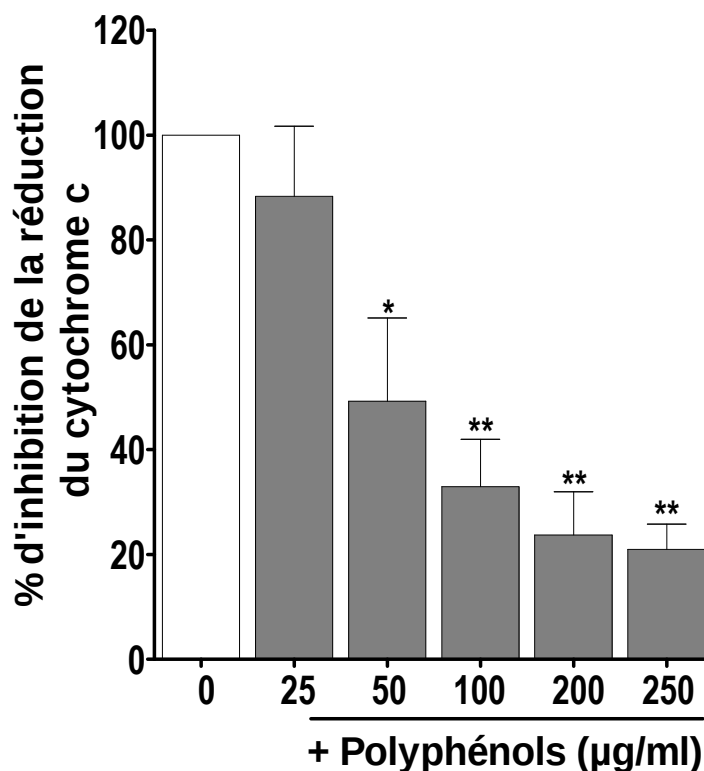


Figure 21. Effet des polyphénols sur la production de l'anion superoxyde par les neutrophiles. Les neutrophiles sont incubés avec des doses croissantes de l'extrait brut de polyphénols pendant 30 min en présence du cytochrome c. Les cellules sont stimulées avec du PMA et les variations de la densité optique sont suivies à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, pendant 30 min à 37°C. Les résultats sont exprimés en % de réduction de cytochrome c des cellules traitées par rapport aux cellules contrôles non traitées. Les résultats sont exprimés en moyennes de 5 expériences.

Cet effet peut être spécifié par d'autres tests, en utilisant un système enzymatique dans lequel, seul l'anion superoxyde est produit tels que le système de xanthine et de xanthine oxydase.

2.3.3. Effet des polyphénols sur la la production du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) intracellulaire par la cytométrie en flux

Pour quantifier le taux de peroxyde de l'hydrogène intracellulaire produit par les neutrophiles en présences de concentrations croissantes de l'extrait phénolique des margines, nous avons utilisé le cymomètre en flux et une sonde spécifique au H_2O_2 capable de pénétrer dans la cellule.

Les cellules sont pré-incubées au préalable en présence du DCFH, sonde qui détecte spécifiquement le H_2O_2 intracellulaire en utilisant la cytométrie en flux. Le taux du peroxyde d'hydrogène produit a été exprimé en index de stimulation (SI).

Les résultats montrent que les polyphénols inhibent la production de H_2O_2 par les neutrophiles de façon dose dépendante (Figure 22). Les polyphénols pourraient inhiber la production elle-même, soit piéger le H_2O_2 , ceci peut être confirmé ou affirmé par un test *in vitro*, par utilisation de H_2O_2 seul en présence de l'extrait phénolique et du luminol et par mesure de chimioluminescence.

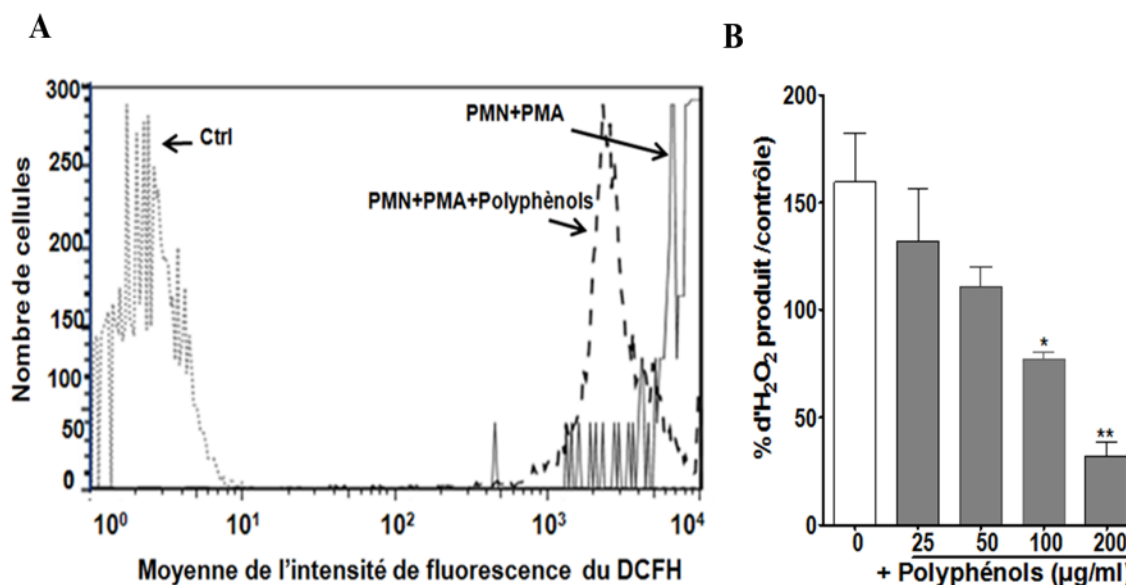


Figure 22. Effet de l'extrait phénolique sur la production du peroxyde d'hydrogène intracellulaire. Les neutrophiles sont incubés en présence de doses croissantes de polyphénols, chargées avec la sonde DCFH, puis stimulés au PMA (phorbol myristate acétate). Le contrôle (ctrl) dans le profil de cytométrie en flux représente les cellules au repos, non traitées avec les pp et non stimulées au PMA. La figure A représente un exemple d'une seule expérience, et celle en B représente la moyenne de plusieurs essais. Les résultats sont exprimés en % de cpm de cellules traitées par rapport aux cellules contrôles non traitées. Les résultats sont exprimés en moyennes de 5 expériences.

Le résultat obtenu en cytométrie en flux avec le peroxyde de l'hydrogène semble être proche de ceux obtenus avec l'hydroxytyrosol seul dans le même contexte cellulaire par O'DOWD et al. (2004).

2.3.4. Effet des polyphénols sur la production de H_2O_2 par le système acellulaire

Afin d'identifier la cible spécifique ainsi que l'effet précis de l'extrait des margines, nous avons incubé le H_2O_2 avec des concentrations croissantes de polyphénols. Dans ces conditions le H_2O_2 a été détecté en présence de la peroxydase (HRPO pour Horseradish peroxidase) par la méthode de chimioluminescence amplifiée au luminol. Les résultats montrent une baisse très significative de la lumière produite par le système acellulaire dépendant de H_2O_2 et en plus à très faible dose (Figure 23). Ce résultat montre clairement que les polyphénols piègent le H_2O_2 .

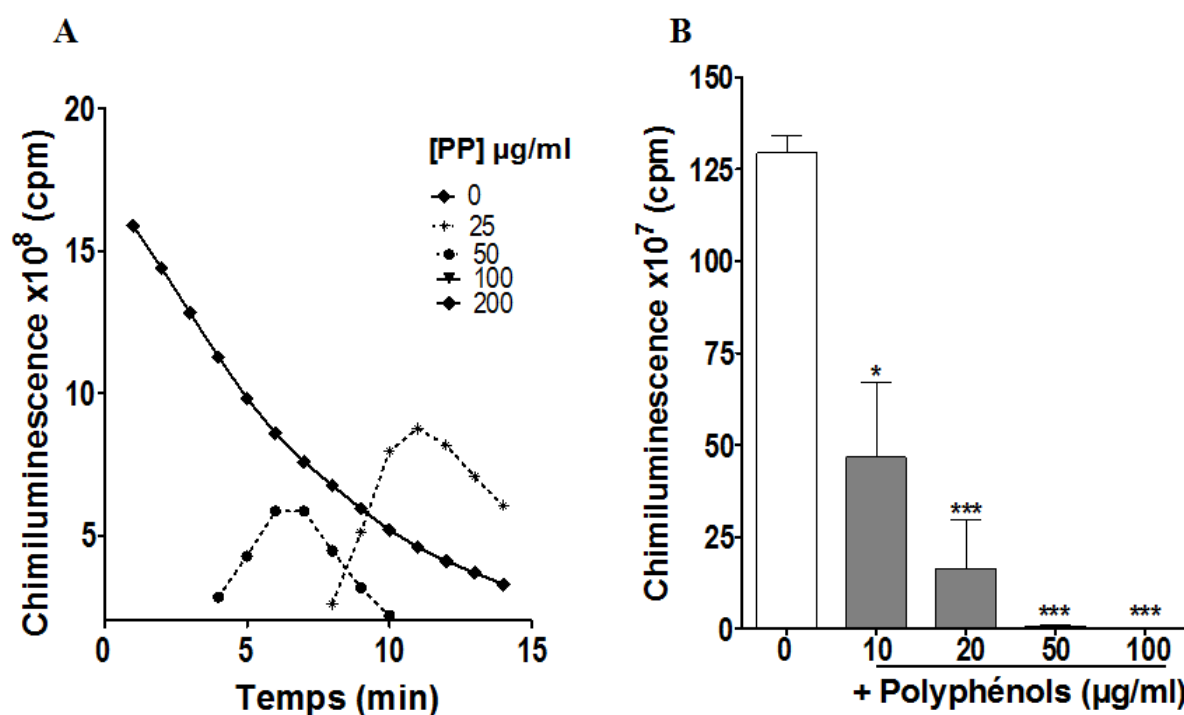


Figure 23. Effet de l'extrait phénolique sur le piégeage du peroxyde d'hydrogène. **A.** Le H_2O_2 a été incubé en présence de concentrations croissantes de pp [0; 10; 20; 50; 100] $\mu\text{g/ml}$, le luminol et la peroxydase. La lumière obtenue est mesurée à l'aide d'un chimioluminomètre. La figure A représente le profil de chimioluminescence d'une seule expérience. **B.** L'histogramme représente la moyenne de 5 expériences pour chaque concentration de pp.

Après ce résultat, nous pouvons conclure que l'extrait de pp de margines a un effet de piégeage sur le peroxyde de l'hydrogène, ce résultat va dans le même que ceux

obtenus précédemment par O'DOWD *et al.* (2004) et PAULA *et al.* (2009) quant aux scavenging du H_2O_2 . Néanmoins, nous devons poursuivre l'explication de l'effet de cet extrait sur l'anion superoxyde et la fonction même de la NADPH oxydase.

2.3.5. Effet de l'extrait phénolique sur l' $O_2^{\cdot-}$ produit par la xanthine oxydase

Nous avons voulu voir l'effet de l'extrait phénolique sur l'anion superoxyde seul, pour cela, nous avons utilisé le système composé de xanthine et de xanthine oxydase, qui produit exclusivement le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).

La réaction consiste à mélanger dans du tampon phosphate de la xanthine, de la xanthine oxydase, en présence du cytochrome c pour détecter l'anion superoxyde produit et avec des concentrations croissantes de l'extrait phénolique d'olive. Le taux de superoxyde est mesuré au spectrophotomètre à 550nm, les résultats en figure 24 montrent que l'extrait de pp issu des margines n'inhibe pas de manière significative la réduction le cytochrome c, même à fortes doses.

Ce résultat confirme la spécificité des polyphénols de margines vis-à-vis du H_2O_2 . Ce résultat s'aligne avec ceux obtenus par O'DOWD *et al.* (2004) qui a obtenus les même résultats avec seul l'hydroxytyrosol et en utilisant une autre sonde (la lucigénine).

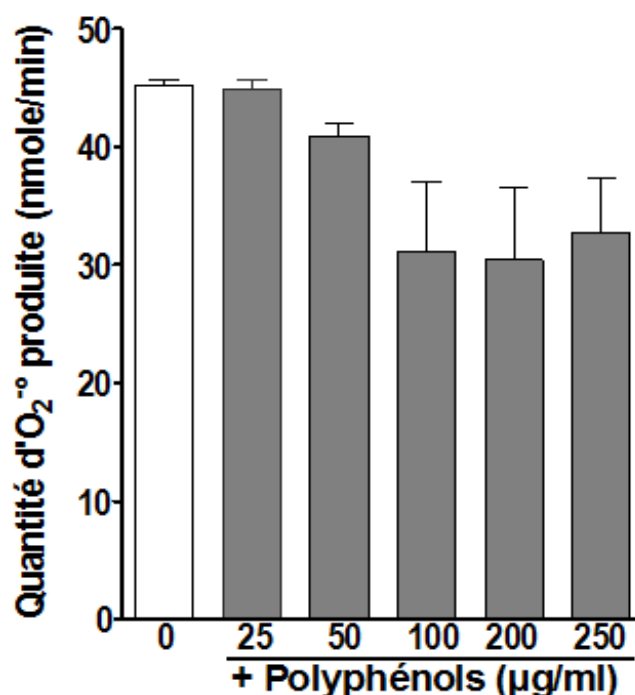


Figure 24. Effet de l'extrait phénolique des margines sur la production de l'anion superoxyde produit par le système xanthine-xanthine oxydase. L'anion superoxyde est produit en présence de la xanthine à 100µM et de la xanthine oxydase à 10mU en présence du cytochrome c et de concentrations croissantes de l'extrait phénolique. La mesure de l'anion superoxyde est suivie à 550 nm. Les résultats sont exprimés en nmoles d'anion superoxyde produites. Les résultats sont exprimés en moyennes de 5 expériences.

2.4. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la dégranulation, le chimiotactisme des neutrophiles et les voies signalisation dans les neutrophiles « AKT, p38MAPK et ERK1/2 »

2.4.1. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la viabilité des neutrophiles

L'hydroxytyrosol est la molécule prédominante dans les margines d'olive (voir le Tableau III de la revue bibliographique). Ce composé est issu de la dégradation de l'oleuropeine, plutôt abondant dans les olives, sa teneur est d'autant plus basse si l'olive est mature ou noire (AIT BADDI et *al.*, 2008 ; NADOUR et *al.*, 2012). Vue la contribution importante de ces deux composés dans le potentiel antioxydant des margines, nous avons réalisé une partie avec les molécules d'olives pures séparées à savoir l'oleuropeine et l'hydroxytyrosol et avons testé sur d'autres fonctions du neutrophile.

Avant de tester l'effet de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sur les fonctions des neutrophiles, nous avons vérifié leur toxicité sur les cellules. Ces dernières ont été incubées à 37 ° C avec des concentrations croissantes d'hydroxytyrosol et d'oleuropeine [0; 10; 20; 40; 80; 100] μM pendant 120 minutes. Les cellules vivantes ont été identifiées grâce au test d'exclusion au bleu de trypan. Les résultats montrent que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine ne sont pas toxiques pour les concentrations utilisées (Figure 25).

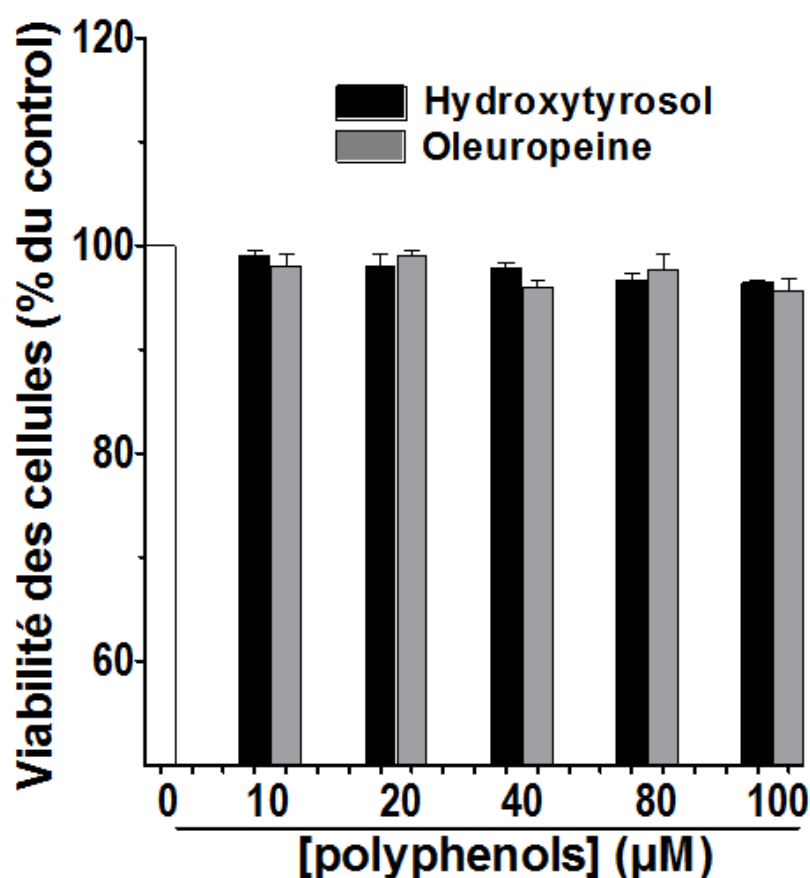


Figure 25. Effets de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la viabilité des neutrophiles. Les neutrophiles ont été incubés à des concentrations croissantes d'hydroxytyrosol et d'oleuropeine [0 ; 20 ; 40 ; 80 ; 100] μM , pendant 120 min à 37°C. Leur viabilité a été déterminée avec le test d'exclusion au bleu de trypan. Les résultats sont exprimés en % de cellules vivantes des cellules traitées avec les pp par rapport aux cellules contrôles non traitées. Les résultats sont exprimés en moyennes de 5.

2.4.2. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la production des FRO totales produites par les neutrophiles

Les effets antioxydants des polyphénols contenus dans l'olive et ses dérivés (margines, feuilles) notamment l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sont bien étudiés (VISIOLI et *al.*, 2002 ; O'DOWD et *al.*, 2004 ; DRABIKOVA et *al.*, 2013). Dans ce contexte et dans cette étude nous avons voulu confirmer leurs effets antioxydants et étudier leurs actions sur d'autres fonctions des neutrophiles humains en particulier la dégranulation du contenu des granules et le chimiotactisme des PN.

Nous avons utilisé pour cet effet le fMLP comme agoniste, qui est un peptide bactérien et un stimulus plus physiologique. Le fMLP permet d'avoir des réponses cellulaires plus proches de la physiologie, en stimulant une seule voie de signalisation, similaire à celle activée par les bactéries.

La production des FRO issues de l'explosion oxydative des neutrophiles, induite par le fMLP, a été évaluée par chimioluminescence amplifiée au luminol. En comparant avec les cellules au repos (contrôle négatif), une lumière intense est obtenue lorsque les cellules sont stimulées avec le fMLP (contrôle positif) (figure 26A et 26B).

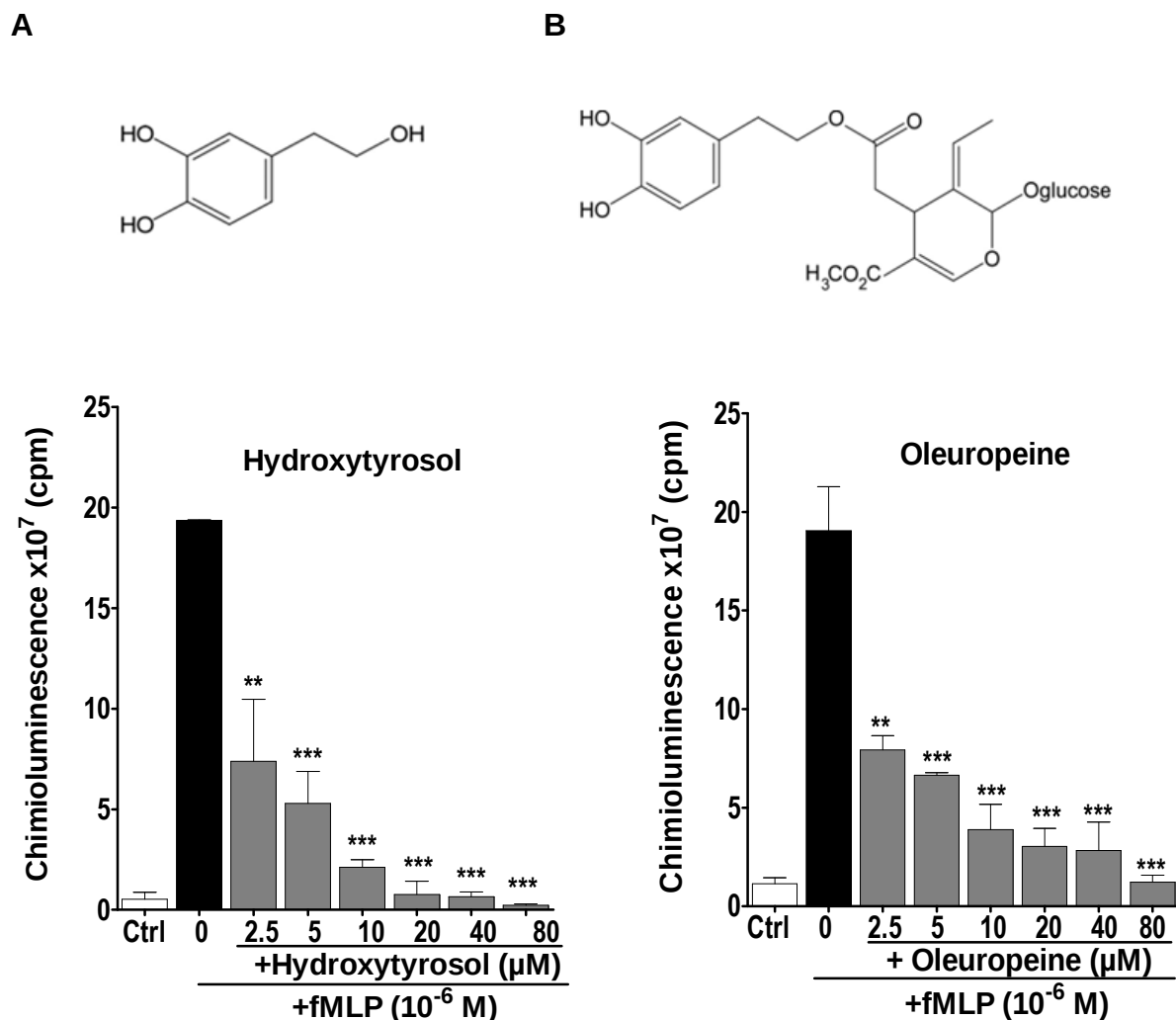


Figure 26. Structure chimique et effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la production des FRO. La figure ci-dessus représente la structure chimique de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine. Les histogrammes représentent leurs effets sur la production des FRO produites par les neutrophiles stimulés au fMLP (10^{-6} M). Les cellules ont été pré-incubées pendant 30 min en présence de concentrations croissantes d'hydroxytyrosol ou d'oleuropeine et en présence de luminol ($10 \mu\text{M}$). Les cellules sont stimulées et la lumière est mesurée pendant 30 min. Les résultats sont exprimés en moyennes de 3 expériences.

En présence de concentrations croissantes d'hydroxytyrosol et d'oleuropeine, nous avons observé une forte réduction de la chimioluminescence induite par le fMLP. Les résultats montrent que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine inhibent de manière dose dépendante la production de chimioluminescence par les neutrophiles stimulés par le fMLP.

2.4.3. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la dégranulation des granules azurophiles par les neutrophiles mesurée par l'activité de la myéloperoxydase

La libération des granules azurophiles et spécifiques est un mécanisme important pour l'élimination des pathogènes (FAURSCHOU et BOREGGARD., 2003 ; PAIGE, 2006). Nous nous sommes focalisés sur l'effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la dégranulation des granules azurophiles (ou primaires) et des granules spécifiques (ou secondaires) en mesurant la libération des deux marqueurs spécifiques, la myéloperoxydase contenue dans les granules azurophiles et la lactoferrine trouvée dans les granules spécifiques.

Pour tester l'effet de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sur la dégranulation des neutrophiles, les cellules ont été soumises à des concentrations croissantes de polyphénols pendant 60 minutes, avant la stimulation avec la cytochalasine B (CB) et le fMLP. A l'issue de la centrifugation des cellules, le surnageant est séparé du culot.

L'activité de la myéloperoxydase a été mesurée dans chacun des surnageants par spectrophotométrie (Figure 27). Le surnageant récupéré après traitement des PMN avec seulement la cytochalasine B ne montre aucune activité de la MPO comparés aux cellules traités au fMLP (contrôle positif), ce qui signifie que la libération de MPO dépend du traitement des cellules avec de la cytochalasine B et du fMLP ensemble.

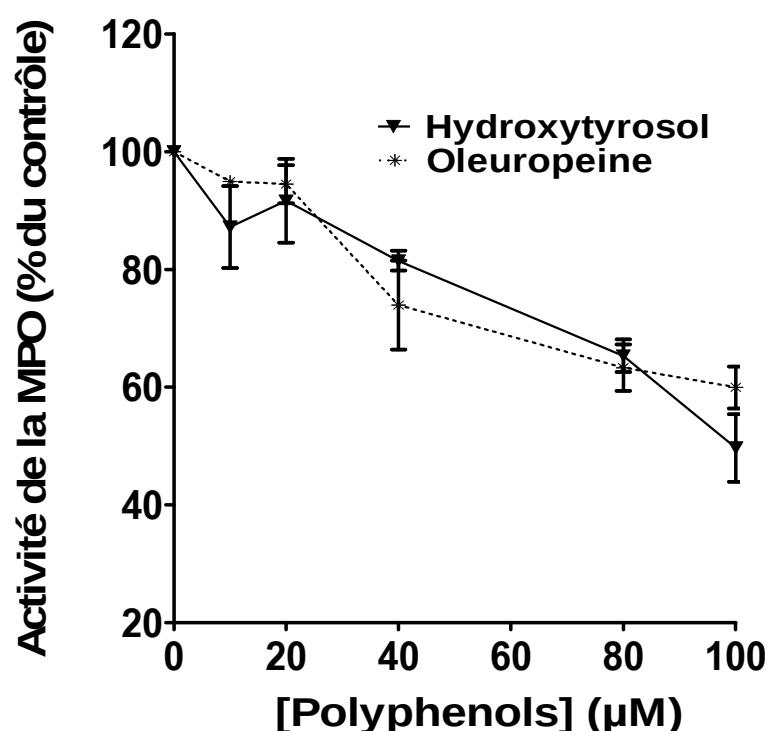


Figure 27. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la dégranulation des granules azurophiles mesurée par l'activité de la myéloperoxydase. Les neutrophiles ont été incubés avec des concentrations croissantes d'hydroxytyrosol et d'oleuropeine [0; 20; 40; 80; 100] μM. Ils ont été traités avec de la cytochalasine B et stimulés au fMLP (10^{-6} M). Après centrifugation, l'activité de la MPO est mesurée au spectrophotomètre à 470nm. Les résultats sont représentés en pourcentage par rapport au contrôle (cellules non traitées avec l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine).

L'analyse comparative de nombreux donneurs a montré que la libération de la MPO induite par la cytochalasine B et le fMLP en présence de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine est inhibée de manière dose-dépendante, sans aucune toxicité sur les cellules aux doses utilisées.

2.4.4. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la libération des granules azurophile (Myéloperoxydase) et des granules spécifiques (Lactoferrine) mesurée par western-Blot

Afin de confirmer que notre résultat n'est pas dû à une interférence avec l'activité de la myéloperoxydase, nous avons soumis les surnageants à un immunoblot ciblant la MPO et de lactoferrine. La MPO et la lactoferrine sont des marqueurs spécifiques pour les granules azurophiles et les granules spécifiques respectivement.

La détection par des anticorps spécifiques montre une inhibition efficace de la libération du contenu de granules azurophiles et des granules spécifiques par l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine. Cet effet est très significatif et l'utilisation d'anticorps spécifiques, dirigée contre la MPO et la lactoferrine montre que la libération des protéines à partir des neutrophiles est bien inhibée par l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine (Figure 28.A et 28.C respectivement).

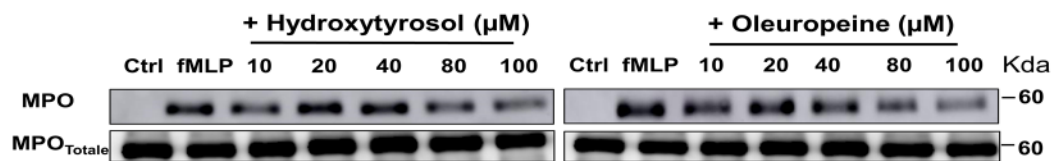
Nous avons quantifié les résultats obtenus en blot par utilisation du logiciel Image J (Annexe 7) et tracé des histogrammes représentant le pourcentage d'inhibition de la dégranulation (Figures 28.B et 28.D), correspondant à la MPO et la lactoferrine respectivement. Sur la base de ces résultats, nous avons également suggéré un effet dose de hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur la dégranulation des neutrophiles, en particulier sur des granules spécifiques, illustrée par une forte inhibition de la libération de la lactoferrine.

2.4.5. Effet de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sur le chimiotactisme des neutrophiles

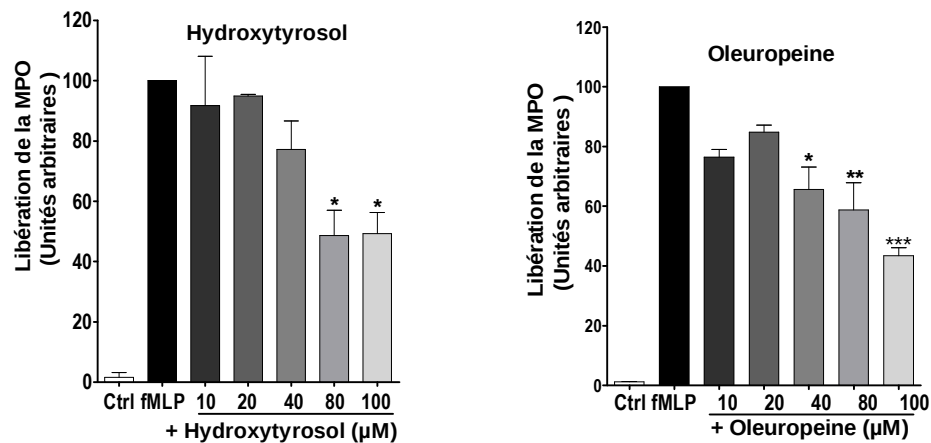
Le chimiotactisme est une fonction fondamentale du neutrophile, car il est à l'origine du déplacement de la cellule vers le site inflammatoire. En effet, les cellules migrent suivant un gradient de molécules attractantes. Dans notre pratique, nous avons imité les conditions physiologiques, en utilisant de l'agarose à faible concentration et enrichi en sérum de veau fœtal (10%). Les cellules déposées et localisées initialement dans le puits central, sortent et migrent pour atteindre le fMLP déposé dans un autre puits en suivant le gradient de concentration du fMLP (contrôle positif), qui diffuse dans l'agarose. Il faut aussi souligner que les cellules ne migrent pas dans le sens du PBS (contrôle négatif).

Pour étudier l'effet des polyphénols d'olive sur la migration des neutrophiles, nous avons pré-incubé les cellules en présence de concentrations croissantes de l'hydroxytyrosol ou de l'oleuropeine [0;10; 20; 40; 80; 100] μ M pendant 60 minutes avant de déposer les cellules dans les puits. Les résultats de la figure 29.A montrent le mouvement des cellules en direction du puits contenant le fMLP.

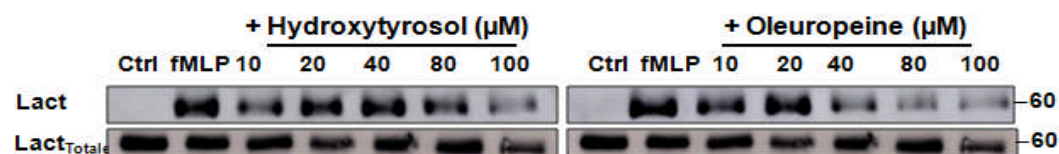
A.



B.



C.



D.

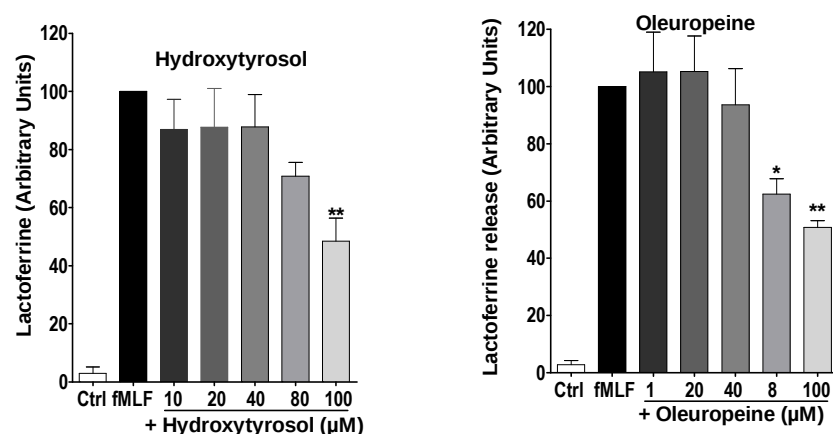


Figure 28. Effets de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sur la libération du contenu des granules azurophiles et des granules spécifiques. Le surnageant obtenu précédemment dans la dégranulation est utilisé pour réaliser la SDS-PAGE. Les mêmes volumes correspondant au surnageant de chaque condition de concentration d'hydroxytyrosol et d'oleuropeine sont dénaturés par chauffage dans le tampon de dénaturation décrit par Laemmli et déposés sur gel de polyacrylamide à 10%. Après le transfert, des anticorps spécifiques sont utilisés pour détecter la MPO et la lactoferrine. L'intensité des bandes obtenues est quantifiée par utilisation du programme image J. Les résultats sont exprimés en % d'inhibition de la dégranulation par rapport aux cellules contrôles.

La quantification de la migration des neutrophiles consiste à mesurer la distance parcourue par les cellules vers le puits contenant le fMLP. Les résultats montrent que l'hydroxytyrosol et oleuropeine [0 ; 10 ; 20 ; 40 ; 80 ; 100µM] inhibent la migration des neutrophile. Les neutrophiles prétraités hydroxytyrosol ou oleuropeine [0; 10; 20; 40; 80; 100µM] ont montré moins de migration comparés aux cellules non traitées (Figure 29.A et B).

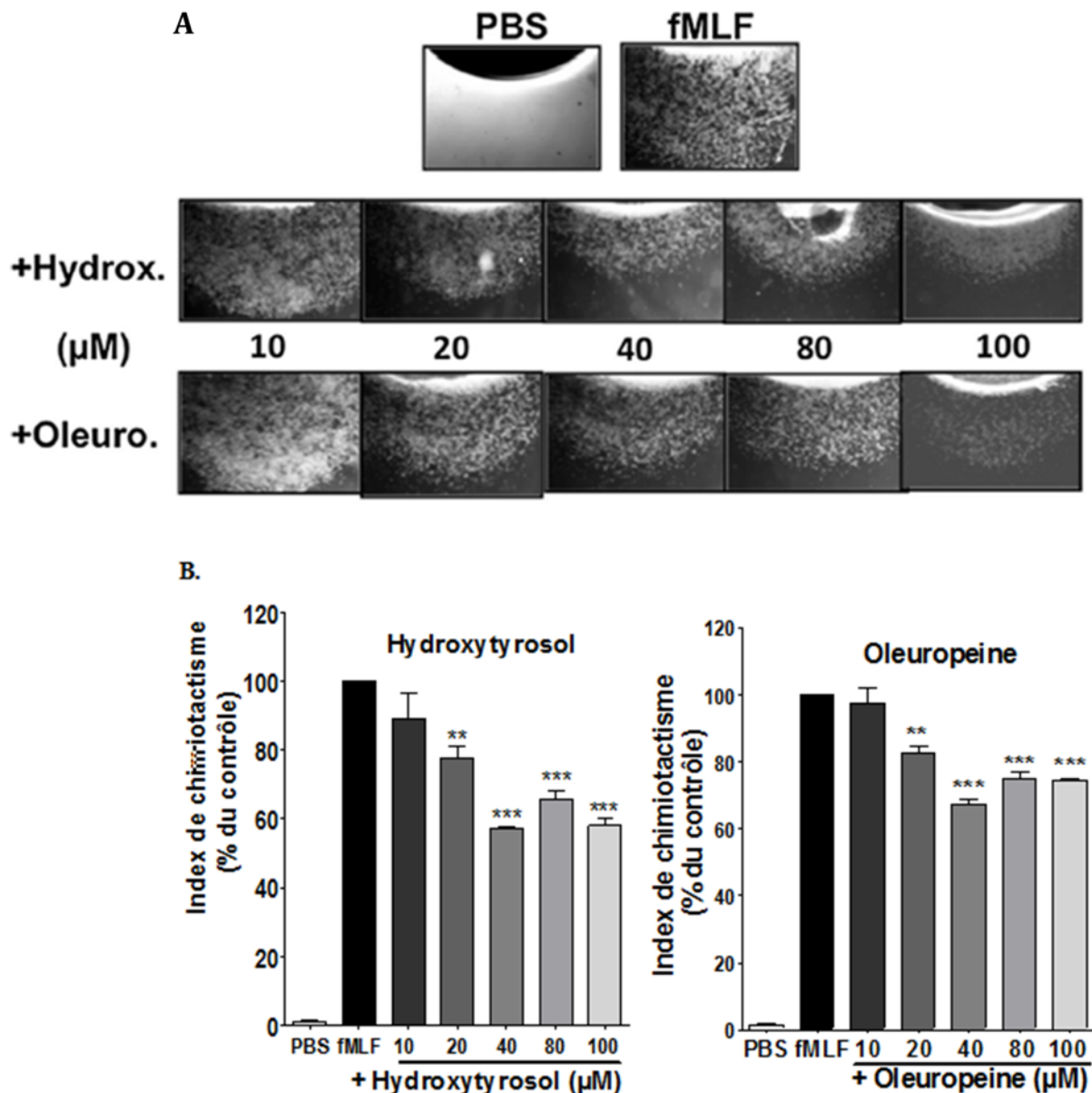


Figure 29. Inhibition du chimiotactisme des neutrophiles par l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine. Les cellules sont pré-incubées en présence ou en absence de l'hydroxytyrosol ou d'oleuropeine, pendant 60 minutes avant de déposer les cellules dans les puits. La migration de cellules est suivie avec un microscope inversé « Zeiss ». Les résultats en « A » montrent le mouvement des cellules vers le puits contenant le fMLP et en « B », nous avons représentés l'index de chimiotactisme.

Nous avons obtenu également un effet inhibiteur élevé à une concentration de 40 μ M de hydroxytyrosol, alors que l'oleuropeine induit moins d'effet sur la migration cellulaire à la même concentration. L'indice de chimiotactisme à la fois de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine est représenté dans la partie B de la figure 28, nous avons montré une migration réduite vers fMLP. Les deux molécules inhibent la migration des PMN de manière dose-dépendante. A titre comparatif, nous avons utilisé des inhibiteurs de chimiotactisme spécifiques, nous avons obtenu des réductions du front de migration qui atteint au maximum un pourcentage de 50%. La stimulation du chimiotactisme cellulaire, notamment celui du neutrophile requiert une phosphorylation de la protéine kinase B (PKB ou AKT) et implique d'après d'autres études la phosphatidylinositol 3- kinase (PI3K) et la p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (FUNAMOTO et *al.*, 2002). Ce qui explique que l'inhibition est tours partielle, car chaque inhibiteur cible une unique voie de signalisation, les pp d'olive semble agir partiellement aussi. L'hydroxytyrosol semble inhiber plus la migration des PN comparé à l'oleuropeine avec un pourcentage qui avoisine les 45%. Dans une précédente étude (BRYAN et *al.*, 2002) l'auteur a montré que l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de la p38 MAPK « SB203856 » à 30 μ M ou de la PI3K « la wortmanin » à 100nM inhibent le chimiotactisme à 90% environ.

2.4.6. Effet de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sur les voies de signalisation impliquées dans l'activation du neutrophile « AKT, p38MAPK et ERK1/2 »

Après avoir montré par différentes techniques et méthodes de dosage l'inhibition des fonctions du neutrophile par les molécules pures de l'olive « l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine », il est important de continuer à spécifier leurs cibles moléculaires et déterminer les voies qui sont inhibées par ces deux molécules.

Dans cette partie cruciale, nous avons vérifié dans les mêmes conditions de concentrations précédentes, quelles sont les voies inhibées en présence des deux molécules « l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine ». En nous basant sur des données bibliographiques, nous avons trouvé que les fonctions des neutrophiles étudiés plus haut sont régulées par des voies de signalisations communes comme les MAP Kinases et AKT. D'où notre stratégie qui consiste à utiliser la méthode du western blot et les anticorps spécifiques pour déterminer le niveau de la phosphorylation de ces MAP Kinases, afin identifier le mécanisme moléculaire de l'inhibition induite par

hydroxytyrosol / oleuropeine sur la chimiotaxie et la dégranulation. Nous avons d'ailleurs montré l'impact de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sur l'activation des protéines kinases AKT, p38 et ERK1/2 5 (Figure 30).

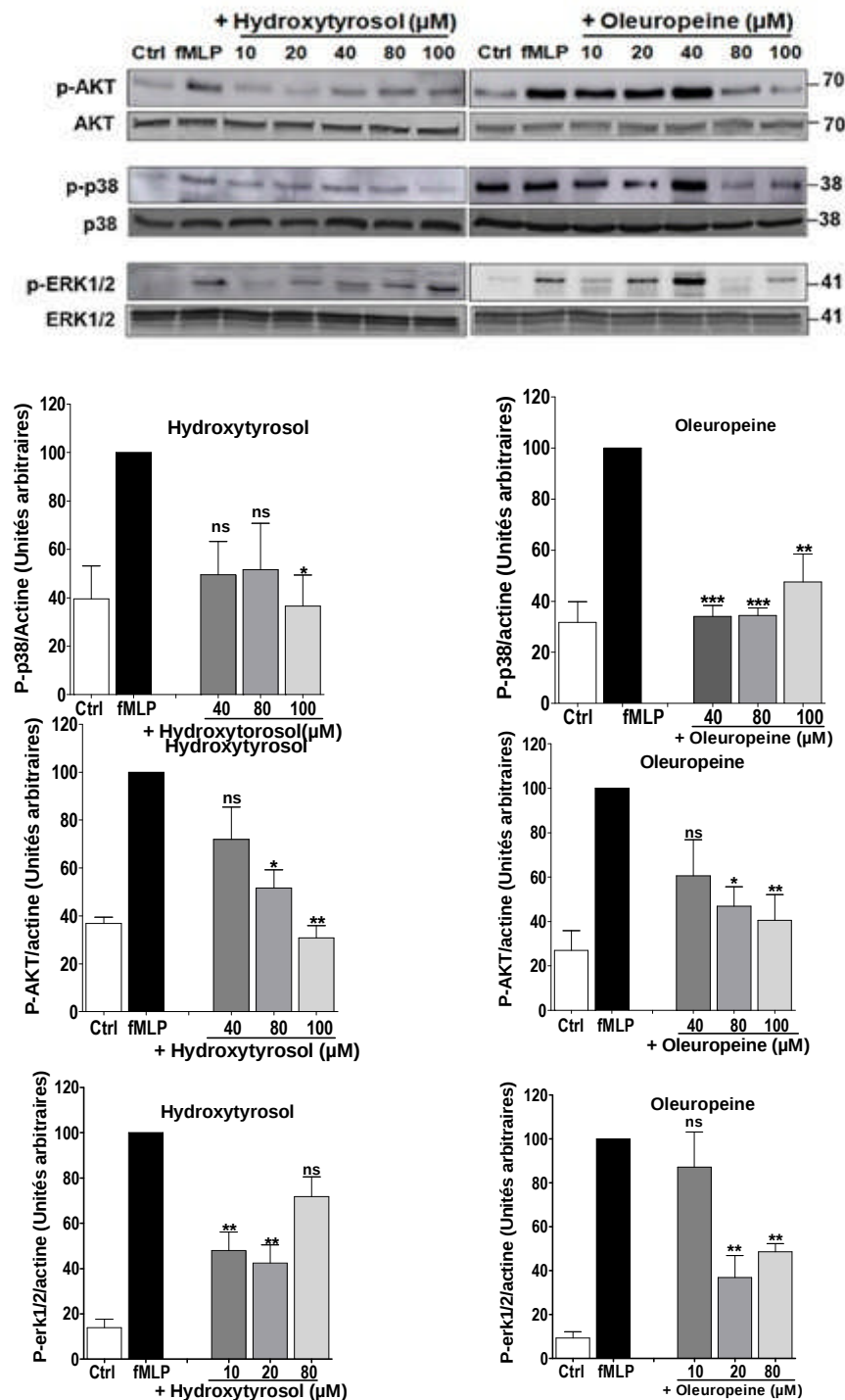


Figure 30. Les composés d'huile d'olive inhibent la phosphorylation d'AKT et des MAP Kinases au niveau du neutrophile. Les neutrophiles ont été pré-incubés pendant 2h à 37°C en présence ou en absence de l'hydroxytyrosol ou d'oleuropeine. Les cellules ont été stimulées avec du fMLP à 10^{-7} M pour 30 secondes puis lysées.

L'état de phosphorylation des protéines AKT, P38 et ERK1/2 a été vérifiée par western Blot. L'intensité de chacune des protéines immuno-déTECTées a été analysée par densitométrie en utilisant le logiciel Image J. Ces intensités sont exprimées par des valeurs arbitraires représentant les ratios des niveaux de phosphorylation par rapport à ceux des protéines totales. Les niveaux de protéines phosphorylées sont normalisés par rapport au témoin stimulé.

En comparaison avec les cellules stimulées, nous avons trouvé que l'hydroxytyrosol ou oleuropeine à 20 μ M et 40 μ M inhibent significativement la phosphorylation d'AKT, de la p38 et de ERK 1/2 MAPK.

D'après ces résultats et l'analyse faite par Image J, l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine exercent un effet inhibiteur significatif sur les voies de signalisation évoquée, qui sont impliquées dans la dégranulation du neutrophile et son chimiotactisme. Selon la figure 29, nous suggérons que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine bloquent partiellement les voies de signalisation impliquant p38 MAPK, Pi3K et ERK1/2 en comparaison avec les effets des inhibiteurs connus des deux voies AKT et p38 MAPK. Comme nous l'avons montré dans le chimiotactisme, il s'agit des inhibiteurs spécifiques de la p38 MAPK « SB203856 » ou de la PI3K « la wortmanin » (BRYAN, 2002 ; FUNAMOTO et *al.*, 2002), cette inhibition partielle des pp d'olive s'explique par le fait que les fonctions du PN sont modulées par des voies distinctes.

Les effets de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine responsables de l'inhibition significative des fonctions étudiées du neutrophile, notamment la dégranulation et le chimiotactisme sont des effets intéressants qui nous permettent de comprendre l'action anti inflammatoires des pp d'olive déjà décrits dans plusieurs à contexte.

Discussion

Générale

III. DISCUSSION GENERALE

Bien que les réponses inflammatoires soient indispensables et bénéfiques pour l'organisme, elles sont parfois en cause de l'aggravation de certaines pathologies telles que les maladies respiratoires aiguës, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin, le cancer, et les maladies auto-immunes, d'où l'intérêt de rechercher des nouvelles molécules modulatrices de l'inflammation. Dans ce contexte, les polyphénols d'olive connus pour leur fort potentiel antioxydant et leurs vertus pour la santé, ils sont candidats également pour réguler les réponses inflammatoires. Les effets anti-inflammatoires des pp d'olive ont été observés et sont bien décrits dans plusieurs études cliniques, réalisées sur l'homme et aussi sur les animaux, néanmoins les fonctions cellulaires et les voies de les voies de signalisation affectées par ces molécules restent peu étudiées et très peu connues.

Ce travail de thèse est réalisé dans l'optique de valoriser les sous produits oléicoles, montrer leurs effets sur les fonctions du neutrophile et identifier les cibles moléculaires des pp d'olive, en particulier l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine, particulièrement dans le contexte inflammatoire. Nous avons choisis le neutrophile comme modèle cellulaire, en raison de ses multiples fonctions, en particulier celle de la production de multiples formes réactives de l'oxygène. Ce qui nous offre un contexte adéquat pour l'évaluation du pouvoir anti-oxydant des pp d'olive.

Cette étude est répartie en deux volets complémentaires, le premier a été consacré au potentiel antioxydant de l'extrait phénolique issue de margines d'olive, et la seconde renferme l'étude des effets moléculaire de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sur les fonctions du neutrophile, une cellule clé de l'inflammation.

Les margines d'olives générées en aval du processus d'extraction de l'huile d'olive par les industries oléicoles, sont très peu biodégradables en raison de leur forte charge en matière organique, et en pp. Ces eaux de végétation considérées comme polluant majeur pour l'environnement, suscitent le grand intérêt de la communauté scientifique, en particulier pour leur forte teneur en molécules bioactives (OBIED, 2005 ; DE MARCO et *al.*, 2007 ; JU et *al.*, 2012 ; KALOGERAKIS et *al.*, 2013). Les margines d'olive particulièrement la variété *chamlal* répandue en Kabylie sont connus pour leur grande richesse en molécules bioactives, cette richesse a été effectivement confirmée à travers notre analyse de l'extrait de pp issus des margines,

purifié en utilisant l'acétate d'éthyle. La méthode de Folin a révélé un taux élevé de pp dans les margines $120 \pm 0,38$ mg/l, cette concentration s'aligne avec celle obtenue par AZAIZEH et al., (2012) qui se situe entre 115 et 170 mg/l, mais se situe en dessous de celle obtenue par SOBHI et al., (2004) qui est d'environ 6,8 g/l et celle de GONÇALVES et al., (2009) comprise entre 5 à 12g/l. La variabilité de la teneur des pp dans les margines est liée à plusieurs facteurs, notamment à l'origine géographique, aux conditions climatiques et altitudes (BOUAZIZ et al., 2004), la variété, le stade de maturité de l'olive (VASILEIOS ZIOGAS et al, 2010), la méthode de trituration, et aussi des pratiques agricoles notamment l'irrigation et le traitement.

L'extrait obtenu dépourvu de solvant ne présentait aucune toxicité vis-à-vis des cellules, le test d'exclusion au bleu de trypan a montré une viabilité moyenne supérieur à 97% même à fortes concentrations que ce soit avec l'extrait brut de margines ou avec les molécules pures l'oleuropeine ou de l'hydroxytyrosol.

En plus de sa non toxicité, l'extrait de margines a montré un fort potentiel antioxydant, comme nous l'avons montré dans les résultats, l'extrait de pp issu des margines a inhibé la chimioluminescence amplifiée au luminol de manière dose dépendante, sachant cette technique reflète la production des FRO totaux par PN stimulés par du PMA ou le fMLP. En voulant spécifier l'effet observé, nous avons utilisé le test de réduction du cytochrome c spécifique à l'anion superoxyde extracellulaire. Les résultats montrent que l'extrait inhibe significativement la production de l'anion superoxyde par les neutrophiles. Nous avons mesuré également la production de H_2O_2 intracellulaire par la méthode de cytométrie en flux utilisant la sonde DCFH, une sonde spécifique et qui rentre dans les cellules. Les résultats montrent aussi que les pp inhibent très significativement cette production et de manière dose dépendante. Les effets observés sont reproductibles dans plusieurs expériences sans aucune toxicité pour les cellules. Ces résultats suggèrent que les pp pourraient soit inhiber l'activation des neutrophiles, soit piéger ou scavenger les FRO.

Afin de vérifier cette dernière possibilité, nous avons reproduit des FRO dans des conditions *in vitro* par systèmes acellulaires, en utilisant le H_2O_2 pur commercial et le système xanthine-xanthine oxydase produisant exclusivement l' $O_2^{\bullet-}$. Les résultats ont montré que l'extrait de pp d'olive exerce un effet de piégeage sur l' H_2O_2 , mais n'a

pas d'effet significatif sur l'O₂^{•-}. Ces résultats montrent que les pp réagissent directement avec le H₂O₂ et pourraient inhiber soit la signalisation intracellulaire soit la NADPH oxydase directement dans les neutrophiles. Pour vérifier cette dernière possibilité, nous avons testé les pp sur la NADPH oxydase préparée dans les membranes activées, et les résultats ont montré que les pp n'ont pas d'effet sur l'enzyme. Ces résultats suggèrent que les pp, en plus de leur action sur le H₂O₂, ils pourraient inhiber la signalisation cellulaire responsable de l'activation de la NADPH oxydase dans les neutrophiles. Les résultats que nous avons obtenus dans cette première partie viennent confirmer le piégeage du peroxyde d'hydrogène au niveau du neutrophile par les pp (PAULA *et al.*, 2009), en particulier ceux de l'olive, O'DOWD et ses collaborateurs (2004) avaient également montré un effet similaire avec l'hydroxytyrosol seul. En plus de ce mécanisme de piégeage, les pp d'olive agissent par chélation des métaux responsables de la production des FRO. (HALIWELL, 1994).

Les résultats obtenus dans la première partie de ce travail avec l'extrait brut des margines d'olive renforce le caractère de richesse des margines en molécules anti-oxydantes. Cet effet résulte de l'action synergique des molécules présentes dans l'extrait brut, ce qui explique une neutralisation significative du peroxyde de l'hydrogène qui atteint les 50% à une concentration de 10µg/ml de pp.

La richesse des margines d'olives en molécules anti-oxydantes a été démontré dans plusieurs études et dans plusieurs contextes, mais ce qui impressionne le plus c'est la conservation de ces molécules bioactives même après fermentation, c'est ce qu'a démontré Yao *et al.* (2016) dans une récente étude.

L'activité anti-oxydante des pp d'olive exercée par le piégeage de radicaux libre pourraient être à l'origine de l'effet protecteur de plusieurs pathologies liées au stress oxydatif, responsable du vieillissement cellulaire, par peroxydation des lipides membranaires et aussi par altération de l'ADN etc. (FAVIER, 2006).

Les effets des pp d'olive sont nombreux s'étendent jusqu'aux effets modulateurs de l'inflammation, ils sont bien illustrés par la réduction de l'infiltration des leucocytes (IMPELLIZZERI *et al.*, 2011 ; ROSILLO *et al.*, 2014). Dans une récente étude réalisée sur des colites induites chez des souris, l'extrait de feuilles d'olivier, connu pour sa richesse en oleuropeine, a montré une réduction significative de la libération

des molécules pro-inflammatoires accompagnée d'une amélioration de l'intégrité de la barrière épithéliales de l'intestin (VEZZA et *al.*, 2017). LAMA et *al.*, (2017) a montré que les pp d'olive réduisait également l'inflammation du foie.

Cet effet anti-inflammatoire a fait l'objet de la seconde partie de ce travail, dans laquelle nous avons voulu spécifier les effets moléculaires des pp d'olive dans le contexte inflammatoire. Pour ce fait, nous avons utilisé un modèle cellulaire, ayant plusieurs fonctions et des molécules pures d'olive afin d'éviter tout artefact. L'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sont des composants biologiques majeurs extraits d'olive. Ils présentent de nombreux avantages pour la santé et des effets pharmacologiques intéressants sur les cellules. Les effets anti-inflammatoires de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropeine sont souvent attribués à leur action anti-oxydante, cependant leur effet sur d'autres fonctions des neutrophiles n'est pas bien étudié.

Au cours du processus inflammatoire, les neutrophiles libèrent le contenu des granules qui contiennent diverses molécules toxiques pour éliminer l'agent pathogène. Cette fonction est bénéfique pour la lutte anti-infectieuse, mais en raison de la toxicité des enzymes lytiques contenues dans les granules des neutrophile, elle peut accentuer et aggraver la réaction inflammatoire (BRADELEY, 1984). Le contrôle de ce processus inflammatoire lié aux neutrophiles peut être une stratégie pharmacologique pour les maladies inflammatoires. Dans ce contexte les pp d'olive, l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine connus pour leurs effets antioxydants et anti-inflammatoire, sont testées sur les fonctions des neutrophiles humains dans des conditions proches de la physiologie en utilisant le peptide bactérien N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) afin de déterminer les cibles moléculaires, sur lesquelles ils agissent au niveau du neutrophile. Ce stimulus physiologique, induit des réponses similaires à celles induites par les bactéries, et mobilise des voies de signalisation connues.

Dans un premier temps, nous avons ré-évalué l'effet anti-oxydant des molécules pures d'olive l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine en utilisant le fMLP. Nous avons mesuré la production des FRO totaux par l'essai de chimioluminescence amplifié par le luminol. Nous avons montré que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine inhibent la production de FRO de manière dose dépendante, l'hydroxytyrosol exerce une inhibition plus prononcée que l'oleuropeine. L'effet de piégeage des deux molécules

est immédiat et cible essentiellement les FRO extracellulaires (O'DOWD et *al.*, 2004). Les mécanismes impliqués dans l'activité anti-oxydante des polyphénols testés sont les mêmes que pour l'extrait brute, c'est un effet de piégeage de H₂O₂. En effet, l'activité anti-oxydante des polyphénols réside dans leurs capacités à stabiliser l'électron altéré et à réduire les radicaux libres (LIN et *al.*, 2008, RIVEIRO, 2010). L'hydroxytyrosol s'est montré plus efficace que l'oleuropeine en raison de sa petite taille et sa structure chimique. Il s'ajoute à cela le nombre de groupes hydroxyle (OH) et leur position pour chacune des molécules, l'oleuropeine n'a que deux groupes hydroxyles, tandis que l'hydroxytyrosol en a trois, ce qui explique l'efficacité de l'hydroxytyrosol dans la neutralisation des FRO. Ce résultat est à la fois une confirmation, mais aussi une précision quant aux effets des molécules pures d'olive, il vient soutenir d'autres travaux réalisés sur les polyphénols d'olive, à savoir l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine, au niveau des neutrophiles (VISIOLI et *al.*, 1998).

Pour mieux approfondir l'étude des mécanismes d'action des polyphénols et définir les cibles des molécules de pp d'olive. Nous avons traité les cellules avec des doses croissantes d'hydroxytyrosol et d'oleuropeine et stimulé les PN avec le fMLP. La dégranulation des PN a été évaluée par la libération de la MPO et de la lactoferrine marqueurs spécifiques des granules azurophiles et spécifiques des neutrophiles respectivement. Nous avons aussi suivi la migration cellulaire sous agarose, dans les mêmes conditions. Nous avons par la suite étudié l'état de phosphorylation des protéines mobilisées dans cette voie induite par le fMLP.

Nous avons montré que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine réduisait de manière significative la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles humains induits par le fMLP.

La dégranulation des neutrophiles est un mécanisme important, impliqué dans la destruction des microorganismes phagocytés, dans ce travail nous nous sommes focalisés exclusivement sur deux marqueurs d'exocytose de granules spécifiques et azurophiles, qui sont respectivement la lactoferrine et la myéloperoxydase. Pour comprendre le rôle éventuel de l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine dans les fonctions neutrophiles.

Nous avons suggéré de suivre l'état de phosphorylation des protéines impliquées dans la voie de signalisation induite par le fMLP, nous avons utilisé les anticorps

phospho-spécifiques pour évaluer le statut de phosphorylation des MAPKinases, en plus de la quantification de la libération du contenu des vésicules. Le résultat obtenu montre que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine peuvent à la fois inhiber la mobilisation du contenu des vésicules dans des conditions physiologiques sous fMLP et diminuer la phosphorylation de p38, ERK et AKT. Cette dernière constatation confirme l'implication de la voie MAP Kinases dans le processus de dégranulation, connue au préalable pour être régulée par les MAP kinases, notamment le p38MAP Kinase, AKT (MOCSAI, *et al.*, 2000 ; BRYAN *et al.*, 2002). En effet, le prétraitement des neutrophiles avec l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine inhibe la phosphorylation induite par fMLP d'AKT, p38 et ERK. L'effet inhibiteur de l'oleuropeine sur la phosphorylation de l'AKT (S473) a été décrit dans le carcinome hépatocellulaire à des concentrations élevées (60 μ M) (YAN *et al.*, 2015). Pour l'hydroxytyrosol il inhiberait la protéine kinase phosphorylante (PKC α et β) au niveau des monocytes sous PMA d'après les travaux de SCODITTI *et al.* (2014).

En réponse à des molécules chimioattractantes, telles que le C5a, le fMLP et l'IL8, les neutrophiles migrent pour atteindre le site inflammatoire (BRYAN, 2002). Ici, nous avons utilisé le fMLP, cette molécule est connue pour induire spécifiquement la voie p38MAPK (NICK *et al.*, 1997). En effet, l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine ont diminué clairement la phosphorylation de la p38 et AKT qui est une voie complémentaire, impliquant la phosphoinositide 3 kinase (PI3K) une autre molécule essentielle dans le chimiotactisme des neutrophiles (HIRSH, 2000, HEIT *et al.*, 2002). D'après ces résultats, nous pouvons conclure que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine modulent la réponse inflammatoire en inhibant le recrutement des neutrophiles sur les sites inflammatoires et en empêchant les dommages des tissus hôtes par inhibition des voies de signalisation liée à cette fonction.

En comparaison avec l'effet écrasant observé sur les FRO et qui se produit immédiatement en plus à de faibles concentrations de pp totaux et pures, la dégranulation et la chimiotaxie des neutrophiles, nécessitent des temps d'incubation des cellules plus longs. Les PN sont prétraitées pendant au moins 60 min avec les polyphénols utilisées et à des concentrations plus élevées pour inhiber efficacement la phosphorylation des MAPK.

Il est important de noter que la principale conclusion de la présente étude est que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine, exercent une inhibition significative des fonctions les plus importantes des neutrophiles notamment la dégranulation et la migration, avec un piégeage important des FRO, en ayant aucun effet cytotoxique aux concentrations utilisées. Les temps d'expositions des neutrophils aux pp d'olive engendrent le piégeage de FRO après une moyenne de 10min à faible dose (10µg/ml de l'extrait brut ou 2,5µM d'hydroxytyrosol ou d'oleuropeine). Au delà de 60 min et à de plus forte doses (40µM), les pp inhibent la dégranulation et le chimiotactisme. Les effets sont intéressants mais sont strictement dépendant des doses qui arrivent vers les cellules, cette concentration nous interpellent à la question de biodisponibilité de ces derniers.

La plupart des études menées sur la biodisponibilité des composés phénoliques d'huile d'olive ont montré que l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine sont des molécules bien absorbées chez l'homme (DE BOCK *et al.*, 2013). Ces travaux ont montré que ces composés sont absorbés de manière dose dépendante, et leur haute disponibilité explique leurs bienfaits sur la santé humaine (VISIOLI *et al.*, 2000; VISSERS *et al.*, 2002). D'après certains auteurs, plus de 55% des composés phénoliques d'huile d'olive ingérés sont métabolisés et distribués dans plusieurs tissus à savoir le cerveau, les cellules endothéliales, les testicules, la prostate, la barrière hémato-encéphalique (VISSERS *et al.*, 2002, SERRA *et al.*, 2012). Cependant, la quantité de ces composés détectée dans le plasma humain est très variable et dépend du type de cultivars d'olive, de la teneur de l'huile d'olive en pp qui est dépendante de la procédure d'extraction et enfin la structure chimique des pp.

Néanmoins, la concentration plasmatique totale après consommation chez l'être humain a été rapportée dans la gamme de 0,1 à 25 µM (RAFEHI *et al.*, 2012; ZRELLI *et al.*, 2011). Dans notre étude, nous avons observé que les polyphénols d'olive agissent à faibles concentrations, notamment pour l'oleuropeine et l'hydroxytyrosol, qui inhibent significativement la dégranulation des neutrophiles et aussi leur migration. Le meilleur effet est nettement observé en présence d'hydroxytyrosol. Le piégeage du peroxyde d'hydrogène et l'inhibition de deux fonctions clés de l'inflammation menées par le neutrophile représentent une ouverture prometteuse devant l'application des pp d'olive.

Conclusion

&

Perspectives

IV. CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'inflammation est une réponse physiologique naturelle face à un pathogène, elle est menée par les cellules du système immunitaire, particulièrement par les neutrophiles « pivots de l'immunité innée », et aussi par les cytokines pro-inflammatoires produites par ces cellules. Néanmoins, dans certains cas pathologiques les réponses inflammatoires peuvent aggraver la maladie, et la compliquer par la production en excès des formes réactives de l'oxygène (FRO), de protéines et d'enzymes lytiques, comme dans le cas des maladies respiratoires aiguës (l'asthme), la polyarthrite rhumatoïde etc.

Dans cette thématique, nous nous sommes intéressés à un sous-produit oléicole, qu'est les margines d'olive, ayant un impact négatif sur l'environnement, étant donné qu'il est rejeté en masse dans la nature. Ce problème touche énormément les régions productrices de l'huile d'olive, en particulier la région de Kabylie. Plusieurs études ont montré la richesse de ces sous-produits en molécules antioxydantes notamment les polyphénols, d'où notre intérêt pour cette ressource.

Pour montrer l'intérêt de ces polyphénols, nous avons choisi le neutrophile comme un modèle cellulaire pour notre étude, car il nous offre un contexte adéquat pour l'évaluation du pouvoir antioxydant des pp d'olive. Nous nous sommes focalisés sur les effets de pp d'olives sur les fonctions les plus importantes du neutrophile : la production de FRO, la dégranulation et le chimiotactisme et avons mis en relief les mécanismes potentiels qui sont à l'origine des effets inhibiteurs observés. Nos résultats ont confirmé les effets antioxydants de l'extrait de margines envers le peroxyde de l'hydrogène spécifiquement avec une inhibition de 50% à partir de 10 µg/ml de l'extrait et des molécules pures de l'olive « l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine » avec des inhibitions de FRO à plus de 60% à une concentration de 2,5 µM dans deux voies distinctes de signalisation menées par le PMA (molécule de synthèse) et le fMLP (peptide bactérien) respectivement.

L'utilisation de différentes techniques dédiées à la mesure de l'explosion oxydative du neutrophile, nous ont permis de mettre au point la technique de chimioluminescence amplifiée au luminol et de faire une avancée fondamentale dans le domaine (BEDOUHENE et *al.*, 20017). Nous avons montré également des effets inhibiteurs intéressants avec des polyphénols d'olive pures sur la dégranulation, nous

avons obtenu une inhibition de 50% à 80µM d'hydroxytyrosol et près de 40% à la même concentration pour l'oleuropeine. Pour le chimiotactisme des PN, l'inhibition exercée par l'hydroxytyrosol à 40µM est d'environ 40%, il a été plus efficace que l'oleuropeine qui à la même concentration a inhibé 30% seulement la migration cellulaire.

La dégranulation et le chimiotactisme ont été mesurés par des techniques enzymatiques et une technique de migration sous agarose respectivement, ces techniques très reproductibles et fiables sont utilisées pour l'étude des dysfonctionnements immunitaires. Il s'agit de méthodes simples pouvant être appliquées au sein de nos laboratoires et hôpitaux au même titre que la technique de détection de formes réactives de l'oxygène utilisant le Nitroblue Tetrazolium (NBT), une technique qui n'est pas coûteuse et simple à mettre en œuvre pour la détection des mutations de la gp91 (sous unité de l'oxydase), conduisant au dysfonctionnement de la NADPH oxydase et à l'absence de FRO.

A travers cette étude, nous avons vu que les fonctions étudiées du neutrophile sont étroitement liées et régulées par des voies communes à savoir les MAP kinases et avons identifié les voies ciblées par l'hydroxytyrosol et l'oleuropeine. Les inhibitions observées même partielles, nous ont permis d'identifier les cibles moléculaires des pp d'olive.

D'après les résultats de cette étude, les polyphénols d'olive représentent des molécules prometteuses pour les thérapies anti-inflammatoires et peuvent être utilisées comme des molécules immuno-modulatrices. D'autant plus qu'elles ne présentent aucun effet toxique pour les cellules humaines.

A travers cette thèse nous avons montré que les margines d'olives en particulier ceux de la variété *chamlal*, longtemps incriminés dans la pollution, peuvent être une source fondamentale non seulement de fertilisants, de protéines unicellulaires et de biogaz (NAFZAOU, 1991) mais aussi de molécules anti-oxydantes. Les margines sont riches en polyphénols au fort potentiel antioxydant ; ainsi l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol par leur pouvoir antioxydant et leur action sur les voies de signalisation du PN sont capables d'inhiber la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles.

Les polyphénols d'olives exercent leurs effets anti-inflammatoires en limitant le recrutement des neutrophiles au niveau du site inflammatoire et en inhibant ses fonctions toxiques sur les tissus avoisinants. Ces molécules pourront ainsi réduire l'état de suractivation des PN et leur production excessive de FRO et pourraient être bénéfiques pour prévenir différentes pathologies. Les nouvelles données biochimiques et moléculaire apportées dans cette thèse s'ajoutent aux acquis du vaste domaine du neutrophile et aussi au domaine des polyphénols en général et à ceux de l'olive en particulier.

Ce travail est dédié aux fonctions effectrices du neutrophile, mais il peut être complété par une étude des effets d'autres molécules phénoliques d'olive connus pour leur potentiel anti-oxydatif comme l'acide cinnamique, l'acide caféique, ces molécules peuvent être utilisées seules ou en synergie avec d'autres molécules sur la libération des cytokines pro-inflammatoires et établir les liens entre leur niveaux de production *in vitro* ou aussi dans les sérums humains ou d'animaux. Nous comptons tester ces mêmes molécules sur un modèle animal (contexte inflammatoire) tel que les lapins et les rats, afin de renforcer ces résultats.

Références
Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDAL DAYEM, A., CHOI, H.Y., YANG, G.-M., KIM, K., SAHA, S.K., CHO, S.-G. The Anti-Cancer Effect of Polyphenols against Breast Cancer and Cancer Stem Cells: Molecular Mechanisms. *Nutrients*, **8**(9), 581.

ACQUAVIVA R., DI GIACOMO C., SORRENTI V., GALVANO F., SANTANGELO R., CARDILE V., GANGIA S., D'ORAZIO N., ABRAHAM N.G., VANELLA L. (2012). Antiproliferative effect of oleuropein in prostate cell lines. *Int. J. Oncol.*, **41**, 31–38.

AIT BADDI C., CEGARRA J., MERLINA G., REVEL J.C. & HAFIDI M. (2008). Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive mill waste-wheat straw mixture. *Journal of Hazardous Materials*, **165** (1-3), 1119-1123.

AL-AZZAWIE HF., ALHAMDANI MS. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.*, **78**(12), 1371-7.

ANDREADOU I, BENAKI D, EFENTAKIS P, BIBLI SI, MILIONI AI, PAPACHRISTODOULOU A, ZOGA A, SKALTSOUNIS AL, MIKROS E, ILIODROMITIS E.K. (2015) The natural olive constituent oleuropein induces nutritional cardioprotection in normal and cholesterol-fed rabbits: comparison with preconditioning. *Planta Med*, **81**, 655–663.

ARICO S., PETIOT A., BAUVY C., DUBBELHUIS P.F., MEIJER A.J., CODOGNO P., OGIER-DENIS E. (2001). The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**, 35243–35246.

AZAIZEH H., HALAHLIH F. , NAJAMI N, BRUNNER D. , FAULSTICH M. D. , TAFESH A. Antioxidant activity of phenolic fractions in olive mill wastewater. *Food Chemistry*, **134**, 2226–2234.

BABIOR B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.*, **109**, 33–44

BABIOR B. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Imm.*, **16**, 42-47

BAINTON DF., MILLER LJ., KISHIMOTO TK., SPRINGER TA. (1987). Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J Exp Med.*, **166**(6), 1641-53.

BARBARO B., TOIETTA G., MAGGIO R., ARCIELLO M., TAROCCHI M., GALLI A., BALSANO C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J MolSci.*, **15**, 18508–18524.

- BARNADO A., CROFFORD LJ., OATES JC. (2016).** At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.*, **99**(2), 265-78.
- BAYRAM B., OZCELIK B., GRIMM S., ROEDER T., SCHRADER C., ERNST I.M., WAGNER A.E., GRUNE T., FRANK J., RIMBACH G. (2013).** A diet rich in olive oil phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. *Redox Res.*, **15**, 71–81.
- BEDOUEHÈNE S., MOULTI-MATI F., HURTADO-NEDELEC M., MY-CHAN DANG P., EL-BENNA J. (2017).** Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. *Am J Blood Res.*, **7**(4), 41-48.
- BELAQZIZ, M., TAN, S. P., EL-ABBASSI, A., KIAI, H., HAFIDI, A., O'DONOVAN, O. and MCLOUGHLIN, P. (2017).** Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of different olive processing wastewaters. *PLoS ONE*, **12**, 9.
- BENSEDDIK K., N.SEN NKWE P., DAOU P., VERDIER-PINARD AND A BADACHE. (2013).** ErbB2-dependent chemotaxis requires microtubule capture and stabilization coordinated by distinct signaling pathways. *PLoS One*. **8**, 1.
- BILLADEAU DANIEL D. (2008)** .PTEN gives neutrophils direction. *Nature Immunology* **9**, 716 – 718.
- BOEKHOLDT S.M., PETERS R.J., HACK C.E., DAY N.E., LUBEN R., BINGHAM S.A., WAREHAM N.J., REITSMA P.H., KHAW K.T. (2004).** IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: The EPIC-Norfolk prospective population study. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1503–1508.
- BORREGAARD N., and COWLAND JB. (1997).** Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.*, **89**(10), 3503-21.
- BORREGAARD N. (2010).** Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.*, **33**(5), 657-70.
- BOUAZIZ M., CHAMKHA M & SAYADI S. (2004).** Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 17, 5476–5481.
- BOUSSETTA T, GOUGEROT-POCIDALO MA, HAYEM G, CIAPPELLONI S, RAAD H, ARABI DERKAWI R, BOURNIER O, KROVIARSKI Y, ZHOU XZ, MALTER JS, LU PK, BARTEGI A, DANG PM, EL-BENNA J . (2010).** The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood*, **116**(26), 5795-802.
- BRADLEY PP., PRIEBAT DA., CHRISTENSEN RD., ROTHSTEIN G. (1982).** Measurement of cutaneous inflammation; estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.*, **78**, 206–209.

BRANZK N., LUBOJEMSKA A., HARDISON SE., WANG Q., GUTIERREZ MG., BROWN GD., PAPAYANNOPOULOS V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol.*, **15**(11), 1017-25.

BRIHEIM G., STENDAHL O., DAHLGREN C. (1984). Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.*, **45**, 1-5.

CHEN M-L., YI L., JIN X., XIE Q., ZHANG T., ZHOU X., CHANG H., FU Y-J., ZHU J-D, ZHANG Q-Y, MI M-T (2013). Absorption of resveratrol by vascular endothelial cells through passive diffusion and an SGLT1-mediated pathway. *J Nutr Biochem.*, **24**, (11) 1823-1829.

BRINKMANN V, REICHARD U., GOOSMANN C., FAULER B., UHLEMANN Y., WEISS DS., WEINRAUCH Y., ZYCHLINSKY A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.*, **303**(5663), 1532-5.

COI (Conseil oléicole international) (2014), huile d'olive, Journal officiel du Conseil oléicole international.

COI (Conseil oléicole international) (2015) Journal officiel du Conseil oleicole international, huile d'olive.

COVAS MI, NYSSÖNEN K, POULSEN HE, KAIKKONEN J, ZUNFT HJ, KIESEWETTER H, GADDI A, DE LA TORRE R, MURSU J, BÄUMLER H, NASCETTI S, SALONEN JT, FITO M, VIRTANEN J, MARRUGAT J. (2006). The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors: A Randomized Trial. *Ann Intern Med.*, **145**, 333–341.

CROSS AR. AND JONES OT. (1986). The effect of the inhibitor diphenyleneiodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem J.*, **237**, 111–116.

DACCACHE A., LION C., SIBILLE N., GERARD M., SLOMIANNY C., LIPPENS G., COTELLE P. (2011). Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochem. Int.*, **58**, 700–707.

DAY A.J., CANADA F.J., DÍAZ J.C., KROON P.A., MCLAUCHLAN R., FAULDS C.B., PLUMB G.W., MORGAN M.R., WILLIAMSON G. (2000) . Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.*, **468**, 166–170.

DE BOCK M., THORSTENSEN E.B., DERRAIK J.G.B., HENDERSON H.V., HOFMAN P.L., CUTFIELD W.S. (2013). Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Molecular Nutrition and Food Research*, **57**, 2079–2085.

DE LA PUERTA R., RUIZ GUTIERREZ V., HOULT J.R.(1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 445–449.

DELBOSC, S., CRISTOL, J.P., DESCOMPS, B., CHENARD, J. & SIROIS, P. (2001). Oxygen and the superoxide anion. Modulation of NADPH oxidase?. *J Soc Biol.*, **195**, 401-411.

DE MARCO E., SA VARESE M., PADUANO A., SACCHI R. (2007). Characterization and fractionnement of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chemistry*, **104**, 858-867.

DEYL Z., MACEK K., VANCIKOVA O., ADAM M. (1979). The presence of gamma-carboxyglutamic acid-containing protein in atheromatous aortae. *Biochim Biophys Acta.*, **581**(2), 307-15.

DORWARD DA, LUCAS CD, CHAPMAN GB, HASLETT C, DHALIWAL K, ROSSI AG. (2015). The Role of Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function During Acute Inflammation. *Am J Pathol.*, **185** (5), 1172-1184.

DRÁBIKOVÁ K, PEREČKO T, NOSÁL' R, HARMATHA J, ŠMIDRKAL J, AND JANČINOVÁ V. (2013). "Study of Possible Mechanisms Involved in the Inhibitory Effects of Coumarin Derivatives on Neutrophil Activity." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2013**, 136570.

DRIRA R., CHEN S., SAKAMOTO K. (2011). Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Life Sci.*, **89**(19–20), 708–716.

EBAID G.M., SEIVA F.R., ROCHA K.K., SOUZA G.A., NOVELLI E.L. (2010). Effects of olive oil and its minor phenolic constituents on obesity-induced cardiac metabolic changes. *Nutr. J.*, **9**, 46.

EDWARDS SW.(1996). The O-2 Generating NADPH Oxidase of Phagocytes: Structure and Methods of Detection. *Methods*, **9**, 563-577.

EFENTAKIS P., ILIODROMITIS E.K., MIKROS E., PAPACHRISTODOULOU A., GAGRES N., SKALTSOUNIS A-L., ANDREADOU I. (2015). Effect of olive tree leaf constituents on myocardial oxidative damage and atherosclerosis. *Planta Med.*, **81**, 648–654.

EL-BENNA JAMEL ., DANG PMC., GOUGEROT-POCIDALO M-A., MARIE JC., BRAUT-BOUCHER F. (2009). p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, **41**, 217-225.

ETIENNE-MANNEVILLE S., HALL A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420** (6916), 629-35.

FABIANI R., ROSIGNOLI P., DE BARTOLOMEO A., FUCCELLI R., SERVILI M., MONTEDORO G.F., MOROZZI G. (2008). Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *J. Nutr.*, **138**, 1411–1416.

FAURSCHOU M., BORREGAARD N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.*, **5**(14), 1317-27.

FAVIER A. 2006. Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

FENICE M., GIOVANNOZZI SERMANI G., FEDERICI F., D'ANNIBALE A. (2003). Submerged and solid state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panustigrinus* on olive mill wastewater-based media, *J Biotechnol.*, **100**, 77-85.

FIESTAS ROS DE URSINOS JA., BORJA-PADILLA R. (1992). Use and treatment of olive mill wastewater, current situation and prospects in Spain, *Grasas y Aceites.*, **43**, 101-106.

FLEMING H.P., WALTER W.M., ETCHELLS J.L. (1973). Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Appl. Microbiol.*, **26**, 777–782.

FLETCHER M.P., SELIGMANN B.E., GALLIN J.I. (1982). Correlation of human neutrophil secretion, chemoattractant receptor mobilization, and enhanced functional capacity. *J Immunol.*, **128**(2), 941-8.

FILIPPI M. D. (2015). Leukocyte transcellular diapedesis: Rap1b is in control. *Tissue Barriers*, **3**(3), e1052185.

FUNAMOTO S., MEILI R., LEE S., PARRY L., FIRTEL R.A. (2002). Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell.*, **109**(5), 611-23.

GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., JORE D. Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? Mécanismes biochimiques. *L'actualité chimique*, **2003**, 93-96.

GEE J.M., DUPONT M.S., DAY A.J., PLUMB G.W., WILLIAMSON G., JOHNSON I.T. 2000. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.*, **130**, 2765–2771.

GEORGESCU M.M. 2010. PTEN tumor suppressor network in PI3K-Akt pathway control. *Genes Cancer.*, **1**, 1170–1177.

GINER E, RECIO MC, RIOS JL, CERDA-NICOLA'S JM, Giner RM. (2016). Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice. *Mol Nutr Food Res.*, **60**, 242–255.

GOLDSBY R., KINDTTJ., OSBORNE BA. 2001. Immunologie. 4^{ème} édition, Paris Dunod.

GOLDSMITH C.D., VUONG Q.V., SADEQZADEH E., STATHOPOULOS C.E., ROACH P.D., SCARLETT C.J. (2015). Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells. *Molecules*, **20**, 12992–13004.

GONÇALVES C, LOPES M, FERREIRA JP , BELO I. (2009). Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresources Technology* , **100**, 3759-3763.

GOUGEROT-POCIDALO M.A. , M. HURTADO-NEDELEC. (2011). Déficit primitif de la fonction des polynucléaires neutrophiles, *EMC – Hématologie*, **6**, 3, 1-12.

GRANADOS-PRINCIPAL S. , QUILES J.L., RAMIREZ-TORTOSA C. L., SANCHEZ-ROVIRA P. , RAMIREZ-TORTOSA M. (2010). New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 1425–1438.

GROSSI C., RIGACCI S., AMBROSINI S., ED DAMI T., LUCCARINI I., TRAINI C., FAILLI P., BERTI A., CASAMENTI F., STEFANI M. (2013). The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A_β plaque pathology. *PLoS ONE*, **8**, 8.

GULLBERG U, BENGTSSON N, BÜLOW E, GARWICZ D, LINDMARK A, OLSSON I. (1999). Processing and targeting of granule proteins in human neutrophils *J Immunol Methods.*, **232**(1-2), 201-10.

HALLIWELL B. , CROSS C. E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.*, **102**(Suppl 10), 5–12.

HASSAN Z.K., ELAMIN M.H., DAGHESTANI M.H., OMER S., AL-OLAYAN E.M., ELOBEID M.A., VIRK P., MOHAMMED O.B. (2012). Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **13**, 4555–4559.

HEIT B. , TAVENER S. , RAHARJO E., KUBES P. (2002). An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol.*, **159**(1), 91–102.

Henry-Vitrac, C., Desmouliere, A., Girard, D., Merillon, J. M. et Krisa, S. (2006). "Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells." *Eur J Nutr*, **45**(7), 376-82.

HOLLMANN MW., GROSS A., JELACIN N., DURIEUX ME. (2001). Local Anesthetic Effects on Priming and Activation of Human Neutrophils. *Anesthesiology.*, **7** (95), 113-122.

IMPELLIZZERI D, ESPOSITO E, MAZZON E, PATERNITI I, DI PAOLA R, BRAMANTI P, MORITTU VM, PROCOPIO A, BRITTI D, CUZZOCREA S (2011). The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *Clin Nutr.*, **30**, 533–540

JAPON-LUJAN R., LUQUE-RODRIGUEZ JM., LUQUE DE CASTRO MD. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related polyphenols from olive leaves. *J Chromatogr A.*, **1108**, 76–82.

JEMAI H., EL FEKI A., SAYADI S. (2009). Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 8798–8704.

JUAN, M. E., GONZALEZ-PONS, E. ET PLANAS, J. M. (2009). "Multidrug resistance proteins restrain the intestinal absorption of trans-resveratrol in rats." *J Nutr.*, **140**(3), 489-95.

JU HY, CHEN SC, WUA KJ, KUO HC, HSEU YC, WU CR. (2012). Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol.*, **50**, 492–502.

Kalogerakis N, Politi M, Foteinis S, Chatzisyneon E, Mantzavinos D .(2013). Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *J Environ Manage*, **128**, 749-758.

KAPELLAKIS I.E., TSAGARAKIS K.P ., AVRAMAKI C., ANGELAKIS A.N. (2006). Olive mill wastewater management in river basins: A case in Greece. *Agricultural Water management*, **82**, 354-370.

KANTARI C., PEDERZOLI-RIBEIL M., WITKO-SARSAT V. (2008). The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol.*, **15**, 118-46.

KHALILI A., NEKOOEIAN A.A ., KHOSRAVI M.B. (2017). Oleuropein improves glucose tolerance and lipid profile in rats with simultaneous renovascular hypertension and type 2 diabetes. *J Asian Nat Prod Res.*, **28**, 1-11.

KOBAYASHI, S.D., VOYICH, J.M., BURLAK, C. & DELEO, F.R. (2005). Neutrophils in the innate immune response. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).*, **53**, 505-517.

KOLACZKOWSKA E., AND P. KUBES. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.*, **13**, 159-175.

KONSTANTINIDOU V., KYMENETS O., COVAS M.I., DE LA TORRE R., MUÑOZ-AGUAYO D., ANGLADA R., FARRE M., FITO M. (2009). Time course of changes in the expression of insulin sensitivity genes after an acute load of virgin olive oil. *OMICS*, **13**, 431–438.

KNIGHT JS., KAPLAN MJ. (2012). Lupus neutrophils: 'NET' gain in understanding lupus pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.*, **24**(5), 441-50.

LAEMMLI UK.(1970).Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680-5.

LAMA A., PIROZZI C., MOLLIKA MP., TRINCHESE G., DI GUIDA F., CAVALIERE G., CALIGNANO A., MATTACE RASO G., BERNI CANANI R., MELI R. (2017). Polyphenol-rich virgin olive oil reduces insulin resistance and liver inflammation and improves mitochondrial dysfunction in high-fat diet fed rats. *Mol Nutr Food Res.* **61**(3).

LAMBETH J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.*, **4**,181-189.

LEE-HUANG S., HUANG P.L., ZHANG D., LEE J.W., BAO J., SUN Y., CHANG Y.T., ZHANG J., HUANG P.L., (2007). Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol. *Integrase inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 872–884.

LI G. MONGILLO M, CHIN K-T , HARDING H., D. RON, MARKS A. R., TABAS I. (2009). Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Journal of Cell Biology*, **186** (6), 783-792.

LIN Y., SHI R, WANG X, SHEN H -M. (2008). Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, **8** (7), 634-646.

LIU T., WANG FP., WANG G., MAO H. (2017). Role of Neutrophil Extracellular Traps in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J (Engl)*., **30** (6), 730-736.

LUO C., LI Y., WANG H., CUI Y., FENG Z., LI H., LI Y., WANG Y., WURTZ K., WEBER P., LONG J., LIU JCURRCANCER DRUG TARGETS. (2013). Hydroxytyrosol promotes superoxide production and defects in autophagy leading to anti-proliferation and apoptosis on human prostate cancer cells., **13**(6), 625-39.

MAKNI-MAALEJ K., CHIANDOTTO M., HURTADO-NEDELEC M., BEDOUHENE S., GOUGEROT-POCIDALO MA., DANG PM, EL-BENNA J. (2013). Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol.*, **85**, 92–100.

MANACH C., WILLIAMSON G., MORAND C., SCALBERT A., RÉMÉSY C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.*, **81**(suppl), 230S-42S.

MANTOVANI A., CASSATELLA MA., COSTANTINI C., JAILLON S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, **11**, 519-531.

MARISA FREITAS, JOSE L.F.C. LIMA, EDUARDA FERNANDES. (2009) Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. *Analytica Chimica Acta.*, **649**, 8–23.

MARTIN-GARCIA A. I., MOLINA-ALCAIDE E. (2008). Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Anim Feed Sci Technol.*, **142**, 317-29.

MICOL V., CATURLA N., PÉREZ-FONS L., MÁS V., PÉREZ L., ESTEPA A.2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antivir.*, **66**, 129–136.

MÓCSAI A, JAKUS Z, VÁNTUS T, BERTON G, LOWELL CA, LIGETI E. (2000). Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: the role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol.*, **164**, 4321-4331.

MORSELLI, E., MAIURI, M.C., MARKAKI, M., MEGALOU, E., PASPARAKI, A., PALIKARAS, K., CRIOLLO, A., GALLUZZI, L., MALIK, S.A., VITALE, I., MICHAUD M , MADEO F , TAVERNARAKIS N , KROEMER G . (2010). Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis.*, **6**(1), 186-188.

MUROTOMI K., UMEMO A., YASUNAGA M., SHICHIRI M., ISHIDA N., KOIKE T., MATSUO T., ABE H., YOSHIDA Y., NAKAJIMA Y. (2015). Oleuropein-Rich Diet Attenuates Hyperglycemia and Impaired Glucose Tolerance in Type 2 Diabetes Model Mouse. *J Agric Food Chem.*, **63**(30), 6715-22.

NADOUR M., MICHAUD P., MOULTI-MATI F. (2012). Antioxidant activities of polyphenols extracted from olive (*Olea europaea*) of chamlal variety. *Appl Biochem Biotechnol.*, **167**(6), 1802-10.

NAFZAOU A. (1991). Valorization des sous-produits de l'olivier. Options méditerranéennes, série séminaires, **16**, 101-108.

NAKAGAWA K., OKUDA S., MIYAZAWA T. (1997). Dose-dependent incorporation of tea catechins, (–)-epigallocatechin-3-gallate and (–)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **6**, 1981–1985.

NATHAN C. (2006). Neutrophils and immunity : challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.*, **6**(3), 173-82.

NAUSEEF WM. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.*, **219**, 88-102.

NAUSEEF WM. (2014). Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochim Biophys Acta.*, **1840**, 757-767.

NEKOOEIAN AA., KHALILI A., KHOSRAVI MB. (2014). Oleuropein offers cardioprotection in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension. *Indian J Pharmacol.*, **46**(4), 398-403.

NELSON RD, QUIE PG, SIMMONS RL. (1975). Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol.*, **115**, 1650-1656.

NEVES M.A., DINIS T.C., COLOMBO G., SÁ E., MELO M.L. (2007). Combining computational and biochemical studies for a rationale on the anti-aromatase activity of natural polyphenols. *ChemMedChem.*, **2**, 1750–1762.

NICK J A , AVDI N J , YOUNG S K , KNALL C , GERWINS P , JOHNSON G L , AND WORTHEN G S. (1997). Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J Clin Invest.* **99**(5), 975–986.

NORDENFELT P. et TAPPER H. (2011). Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.*, **90**, 271-284.

OBIED H.K., ALLEN M.S., BEDGOOD D.R., PRENZLER P.D., ROBARDS K., STOCKMANN R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **53**, 823-837.

O'DWOD Y., DRISS F., DANG PM., ELBIM C., GOUGEROT-POCIDALO M., ET AL. (2004). Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide anion produced by human neutrophils. *J BiochemPharmacol.*, **68**, 2003-2008.

OMAR S.H0. (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm. J.*, **18**, 111–121.

PAIGE L. (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils, Allergy, Asthma, *Clin.Immunol*, **2**, 98-108.

PARKINSON L., CICERALE S. (2016). The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Article molecules Virgin Olive Oil Molecules*, **21** (12), 1734.

PAULA F.S., KABEYA L.M., KANASHIRO A., DE FIGUEIREDO ASG., ANA ELISA CS., ET AL. (2009). Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 163–170.

PEROBELLI S.M., GALVANI R.G., GONÇALVES-SILVA T., XAVIER C.R., NÓBREGA A., BONOMO A. (2015). Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Braz J Med Biol Res.*, **48**(8), 665-75.

PETERS E.A., HILTERMANN J.T., STOLK J. (2001). Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radic Biol Med.*, **31**,1442–7.

PLANAT V., TRONCHERE H., RECORD M., RIBBES G., ET CHAP H. (1996). Involvement of Vicinal Dithiols in Differential Regulation of fMLP and Phorbol Ester-Activated Phospholipase D in Stimulated Human Neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **218**, 847–85.

QUINN, M.T., AND K.A. GAUSS. (2004). Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with non phagocyte oxidases. *J Leukoc Biol.*; **76**, 760-81.

RAFEHI H., VERVERIS K., KARAGIANNIS TC. (2012). Mechanisms of action of phenolic compounds in olive. *Diet Suppl.*, **9**(2), 96-109.

RANALLI A.(1991). L'effluent des huiles d'olives : propositions en vue de son utilisation et son épuration. *Références aux normes italiennes en la matière Olivae*, **39**,18-34.

RIVEIRO, M.E., DE KIMPE, N., MOGLIONI, A., VAZQUEZ, R., MONCZOR, F., SHAYO, C., DAVIO, C., (2010). Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.*, **17**, 1325–1328.

RICHARD N, ARNOLD S, HOELLER U, KILPERT C, WERTZ K, SCHWAGER J . (2011). Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta medica.*, **77**(17), 1890–189734.

RIETJENS S.J., BAST A., J. DE VENTE., G.R.M.M HAENEN. (2007). The olive oil antioxidant hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NO° response of isolated rat aorta. *Am. J Physiol Heart CircPhysiol.*, **292**, H1931–H1936.

RIGACCI S., GUIDOTTI V., BUCCIANINI M., PARRI M., NEDIANI C., CERBAI E.,STEFANI M., BERTI A. (2010).Oleuropeinaglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin. *J. Nutr. Biochem.*, **21**, 726–735.

ROSILLO M.Á., ALCARAZ M.J., SÁNCHEZ-HIDALGO M., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J.G., ALARCÓN-DE-LA-LASTRA C., FERRÁNDIZ ML. (2014). Anti-inflammatory and joint protective effects of extravirgin oliveoil polyphenol extract in experimental arthritis.*J Nutr Biochem.*, **25**(12), 1275-81.

RORTH P. (2011). Whence directionality: guidance mechanisms in solitary and collective cell migration. *Dev Cell.* **18**, 20(1), 9-18.

SAINT-ONGE M. (2005), M.Sc. Le Neutrophile Humain* (* Tiré du mémoire de maîtrise de Mireille St-Onge).

SANCOUCY R. (1984). Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen. Étude FAO Production et santé animale Synthèse n° 43 FAO Pub Rome.

SANTIAGO-MORA R., CASADO-DIAZ A., DE CASTRO MD., QUESADA-GOMEZ JM. (2011). Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int.*, **22**(2), 675–84.

SCALBERT A., & WILLIAMSON G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J.Nutr.*, **130**, 2073S–2085S.

SCALBERT A, MORAND C, MANACH C, RÉMÉSY C (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* **56**(6), 276-82.

SCODITTI, E. NESTOLA A., MASSARO M., CALABRISO N. , STORELLI C. , DE CATERINA R. , CARLUCCIO M.A. (2014). Hydroxytyrosol suppresses MMP-9 and COX-2 activity and expression in activated human monocytes via PKC α and PKC β 1 inhibition. *Atherosclerosis*, **232**, 17-24.

SERRA A, RUBIÓ L, BORRÀS X, MACIÀ A, ROMERO MP, MOTILVA MJ. (2012). Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake *Mol Nutr Food Res.*, **56**(3), 486-96.

SENGELOV, H., BOULAY, F., KJELDSSEN, L. & BORREGAARD, N. (1994). Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J*, **299**, 473-479.

SENOO H., IJIMA M. (2013). Rho GTPase: A molecular compass for directional cell migration. *CommunIntegr Biol.*, **6**(6).

SEO H.-S., CHOI H.-S., KIM S.-R., CHOI Y.K., WOO S.-M., SHIN I., WOO J.-K., PARK S.-Y., SHIN Y.C., KO S.-G. (2012). Apigenin induces apoptosis via extrinsic pathway, inducing p53. and inhibiting STAT3 and NF- κ B signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **366**, 319–334.

SHASHA B., LEIBOWITZ J. (1959). Oleuropeic acid: A new compound from *Olea europaea*. *Nature*, **184**, 2019–2020.

SHASHA B., LEIBOWITZ J. (1961). On the oleuropein, the bitter principle of olives. *J. Org. Chem.*, **26**, 1948–1954.

SHIMADA A.L.B., CRUZ W.S., LOIOLA R A., DREWES C. C. , DÖRR F. , FIGUEIREDO N. G. , PINTO E. & FARSKY S.H. P. (2015). Absorption of PCB126 by upper airways impairs G protein-coupled receptor-mediated immune response. *Scientific Reports*, **5**, 14917.

SINGLETON V.L., ROSSI J.A. (1999). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic reagents. *Am J Enol Vitic.*, **16**, 144–158.

SOBHI B., ISAM S., AHMAD Y., JACOB H. & SALEEBA A. (2004). Reducing the environmental impact of olive mill wastewater in Jordan, Palestine and Israel. *Process Biochemical*, **39**, 947-951.

TEIMOURIANA S., MOGHANLOO E. (2015). Role of PTEN in neutrophil extracellular trap formation. *Molecular Immunology*, **66**, 319–324.

TOWBIN H., STAEHELIN T., GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **76**(9), 4350-4.

UMENO A., TAKASHIMA M., MUROTOMI K., NAKAJIMA Y., KOIKE T., MATSUO T., YOSHIDA Y. (2015). Radical-scavenging Activity and Antioxidative Effects of Olive Leaf Components Oleuropein and Hydroxytyrosol in Comparison with Homovanillic Alcohol. *J Oleo Sci.*, **64**(7), 793-800.

UNGVARI Z., BAGI Z., FEHER A., RECCHIA F.A., SONNTAG W.E., PEARSON K., DE CABO R., CSISZAR A. (2010). Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am. J. Physiol.*, **299**, H18–H24.

USHIJIMA Y., TOTSUNE H., NISHIDA A., NAKANO M. (1997). Chemiluminescence from human polymorphonuclear leukocytes activated with opsonized zymosan. *Free Radic Biol Med.*, **22**, 401-9.

VAN EEDEN S.F., KLUT M.E., WALKER B.A., HOGG J.C. (1999). The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods.*, **232**(1-2), 23-43.

VASILEIOS ZIOGAS., GEORGIA TANOU B., ATHANASSIOS MOLASSIOTIS A., GRIGORIOS DIAMANTIDIS B., MILTIADIS VASILAKAKIS. (2010). Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry*, **120**, 1097–1103.

VEZZA T., ALGIERI F., RODRÍGUEZ-NOGALES A., GARRIDO-MESA J., PILAR UTRILLA M., TALHAOU N., MARÍA GÓMEZ-CARAVACA A., SEGURA-CARRETERO A., ELENA RODRÍGUEZ-CABEZAS M., MONTELEONE G., GÁLVEZ J. (2017). Immunomodulatory properties of *Olea europaea* leaf extract in intestinal inflammation. *Mol Nutr Food Res.*, **61**(10).

VIDARSSON G., VAN DE WINKEL J. Fc receptor and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence. *Curr. Opin in infectious. Diseases*, **19**(11). 271-78.

VINSON J.A., SU X., ZUBIK L., BOSE P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5315–5321.

VISIOLI F., BELLOMO G., GALLI C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, **247**, 60–64.

VISIOLI F., CARUSO D., PLASMATI E., PATELLI R., MULINACCI N., ROMANI A., GALLI G., GALLI C. (2001). Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radic Res.*, **34**, 301–305.

VISIOLI F., POLI A., GALLI C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev.*, **22**, 65–75.

VISSERS M.N., ZOCK P.L., KATAN M.B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr.*, **58**, 955–965.

WAINSTEIN J., GANZ T., BOAZ M., BAR DAYAN Y., DOLEV E., KEREM Z., MADAR Z. (2012). Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *J. Med. Food*, **15**, 605–610.

WALKER J.M. (2002). The protein protocols handbook. Humana press. Second edition. 2002, 61-68.

WANG C.Z., GAO C.X., YE J.Z., CHEN X.J., JIANG W.Y. (2006). Study on seasonal variation of oleuropein content in olive leaves by HPLC. *Chem. Ind. For. Prod.*, **28**, 39–43.

WITKO-SARSAT V., RIEU P., DESCAMPS-LATSCHA B., LESAVRE P., HALBWACHS-MECARELLI L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* **80**(5), 617-53.

WONG K., PERTZ O., HAHN K., BOURNE H. (2006). Neutrophil polarization: spatiotemporal dynamics of RhoA activity support a self-organizing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103** (10), 3639- 44.

WOOD J.G., ROGINA B., LAVU S., HOWITZ K., HELFAND S.L., TATAR M., SINCLAIR D. (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, **430**, 686–689.

WOODFIN A., VOISIN MB., NOURSHARGH S. (2010). Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol.*, **17**, 9-17.

XIAO J., KAI G., YAMAMOTO K., CHEN X. (2013). Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **53**(8), 818-36.

YAN CM, CHAI EQ, CAI HY, MIAO GY, MA W. (2015). Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. *Mol Med Rep.*, **11**, 4617–4624.

YAO Q, HE G, GUO X, HU Y, SHEN Y, GOU X. (2016). Antioxidant activity of olive wine, a byproduct of olive mill wastewater. *Pharm Biol.*, **54**(10), 2276-81.

YE J.Z., WANG C.Z., CHEN H.X., ZHOU H. (2011).Variation rule of hydroxytyrosol content in olive leaves. *Chem. Ind. For. Prod.*, **31**, 69–74.

YONETANI T. (1960). Studies on Cytochrome Oxidase (steady state properties).*J. Biol. Chem.* 235, 3138-3143.

YUAN J-J., WANG C-Z., YE J-Z., TAO R., ZHANG Y-S. (2015). Molecules. Enzymatic Hydrolysis of Oleuropein from *Olea europea* (Olive), Leaf Extract and Antioxidant Activities, **20**, 2903-2921.

Zhang X, Cao J, Jiang L, Zhong L. (2009).Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-kappaB activation in THP-1 cells. *Biol Pharm Bull.*, **32**, 578–582.

Ziogas V., Tanou G., Molassiotis A., Diamantidis G., Vasilakakis M. (2010). Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry*, **120** (4), 1097-1103.

ZRELLI H., MATSUKA M., ARAKI M., ZARROUK M., MIYAZAKI H. (2011). Hydroxytyrosol induces vascular smooth muscle cells apoptosis through no production and PP2A activation with subsequent inactivation of Akt. *Planta Med.*, **77**(15), 1680-6

Annexe

Annexe 1: Liste des produits utilisés

Produits	Source
Le méthanol, éthanol, acétate d'éthyle, acide chlorhydrique	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Le Dextran T500	Pharmacosmos(Holbaek, Denmark),
Ficoll	GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden)
Cytochrome C, luminol, PMA (4b-phorbol-12b-myristate-a13-acetate), xanthine, xanthine oxydase, H ₂ O ₂ , HRPO (horseradish peroxidase), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), Dulbecco's Phosphate-buffered saline (PBS) et le Hanks' balanced salt solution (HBSS). L'hydroxytyrosol, l'oleuropeine L'ortho-dianisidinedihydrochloride Le fMLP, le luminol, les inhibiteurs de protéases et de phosphatases	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany)
Réactifs de SDS-PAGE et le Western blot	Laboratoires Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Anticorps anti MPO et anti-lactoferrine	Abcam (Cambridge, UK),
Anticorps secondaires anti lapin, anti souris, le réactif d'ECL (enhanced chemiluminescence)	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany)

Annexe 2: Les concentrations d'acide gallique utilisées pour le dosage de polyphénols dans les margines d'olive.

Concentrations d'acide gallique (µg/ml)	0	10	20	30	40	50
DO à 760 nm	0	0,083	0,146	0,212	0,274	0,320

Annexe 3: Spectrophotomètre équipé d'une chambre thermostatée de marque UVIKON 860.



Légende : 1. Ecran; 2. Touches de programmation; 3. Imprimante; 4. Chambre thermostatée pour les cuves de mesure.

Annexe 4 : Préparation des gels d'électrophorèse

➤ Préparation du gel de séparation

Gel à 10%	Pour 1 gel
H ₂ O miliQ	4.095 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5 ml
SDS 20%	0.05 ml
Acrylamide /Bis 30%	3.3 ml
APS 100mg/ml	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

➤ Préparation du gel de concentration

Gel à 4%	Pour 1 gel
H ₂ O miliQ	3.0035 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.25 ml
SDS 20%	0.025 ml
Acrylamide /Bis 30%	0.6665 ml
APS 100mg/ml	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

➤ **Solution à préparer extemporanément**

Persulfate d'ammonium (APS) 100 mg/ml : Mélanger 0.1g d'APS dans 1ml d'eau. Stocker à 4°C.

Annexe 5 : Préparation des solutions de transfert

➤ **Tampon de transfert SDS-PAGE 10X** : Stocker à 4°C

Tris base	60.55g
Glycine	71.25g
SDS	8g ou 40ml SDS 20%
H ₂ O miliQ	QSP 1000ml

➤ **Tris-HCl 1M pH 7.5** : Mélanger 24.2g de Tris base qsp 200ml d'eau. Ajuster le pH à 7.5 avec HCl. Stocker à 4°C.

La tampon de transfert est préparé à partir de la solution 10X

Tampon de transfert SDS-PAGE 10X	100 ml
Méthanol	200 ml
H ₂ O miliQ	700 ml

➤ **Tris Buffered Saline (TBS/Tween)** : Stocker à 4°C

Tris-HCl 1M	12.5 ml
NaCl 0.9%	0.250 ml
Tween 10%	25 ml
H ₂ O miliQ	QSP 500 ml

➤ **Tampon carbonate** : Stocker à 4°C (pour la révélation à la phosphatase alcaline)

NaHCO ₃	4.2g
MgCl ₂	0.1017g
Ajuster le pH au NaOH à 9.8	
H ₂ O miliQ	QSP 500 ml

➤ **NBT** : 0.150g de NBT + 3.5ml DMF + 1.5ml d'H₂O miliQ. Stocker à -20°C

➤ **BCIP** : 0.075g dans 5 ml de DMF. Stocker à -20°C

Annexe 6 : Concentrations des anticorps utilisés dans le western Blot

Anticorps primaires

MPO	1:500 pendant toute la nuit
Lactoferrine	1:500 pendant toute la nuit
Phospho ERK ½	1:1000 pendant toute la nuit
Phospho P38	1:1000 pendant toute la nuit
Phospho AKT	1/1000 pendant toute la nuit

Incuber toute la nuit à 4°C, sous agitation, rincer trois fois 5 minutes avec du TBS/Tween

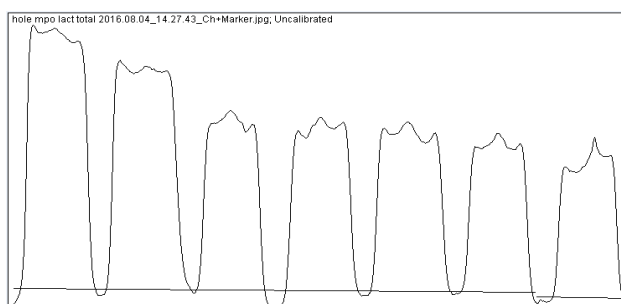
Anticorps secondaires:

GAM HRP	1:10000
GAR HRP	1:10000
GAR HRP	1:10000
GAR HRP	1:10000

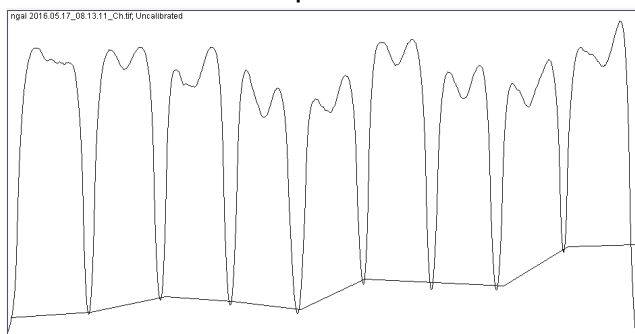
Incuber 1H à température ambiante, sous agitation
Rincer trois fois 5 minutes avec du TBS/Tween

Annexe 7 : Exemple de profil d'histogrammes obtenu après par quantification des gels avec le logiciel Image J.

- Profil pour d'un blot de l'effet dose (MPO)



- Profil pour quantification d'un blot de protéines totales



***Liste des
communications
scientifiques***

Liste des communications scientifiques

Publications scientifiques :

➤ **Bedouhene, S., Mouliti-Mati, F., Dang, P.MC., El Benna jamel.** Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced neutrophil degranulation and chemotaxis via AKT, p38, and ERK1/2 MAP-Kinase inhibition. *Inflammopharmacology* (springer) (Jul 2017). doi: 10.1007/s10787-017-0367-7.

➤ **Bedouhène S, Mouliti-Mati F, Hurtado-Nedelec M, Dang PM, El-Benna J.** Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. *American Journal of Blood Research* . 2017 Jul 25;7(4):41-48. eCollection 2017.

➤ **Samia Bedouhene, Margarita Hurtado Nedelec, Nassima sennani, Jean Claude Marie, Jamel El Benna and Farida Mouliti Mati.** Polyphenols Extracted from Olive Mill Wastewater Exert a Strong Antioxidant Effect in Human Neutrophils. (2014). *Int J Waste Resources* 4:4.

➤ **Makni-Maalej K, Chiandotto M, Hurtado-Nedelec M, Bedouhene S, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM, El-Benna J.** Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase.

Communications scientifiques affichées:

➤ **Bedouhene Samia; Hurtado-Nedelec Margarita, Nassima sennani, El-Benna Jamel, Mouliti Mati Farida.** Communication affichée “Effect of polyphenol extract from olive mill wastewater on reactive oxygen species production by human neutrophils”. .
A l’occasion du 25 forum internationa des sciences biologiques et de biotechnologie de l’ATSB, tenu en **Tunisie** du 24 au 27 mars 2014.

Articles

Polyphenols Extracted from Olive Mill Wastewater Exert a Strong Antioxidant Effect in Human Neutrophils

Samia Bedouhene¹, Margarita Hurtado-Nedelec^{2,3,4}, Nassima sennani¹, Jean-Claude Marie^{2,3}, Jamel El-Benna^{2,3*} and Farida Moulti-Mati¹

¹Laboratoire de Biochimie appliquée et de biotechnologie, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université M. Mammeri, BPN°17, RP 15000 Tizi-Ouzou, Algeria

²Inserm, U1149, CNRS-ERL8252, Centre de Recherche sur l'Inflammation, Paris, France

³Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Excellence Inflamex, Faculté de Médecine, Site Xavier Bichat, Paris, France

⁴AP-HP, Unité Dysfonctionnement Immunitaire, Centre Hospitalo-Universitaire Xavier Bichat, Paris, F-75018, France

Abstract

Olive mill wastewater (OMW) is produced seasonally by the olive oil-producing countries. A large amount of liquid waste results from olive oil extraction, with a very high organic load which renders it difficult to treat. Wastewater represents also a significant source of polyphenols which can be revalorized and used for medical or agro-alimentary purposes. The extraction of polyphenols will improve the wastewater biodegradation and reduce its phytotoxicity. The objective of this study was to extract polyphenols from OMW and to investigate their effect on reactive oxygen species (ROS) production by human neutrophil. Polyphenols were extracted from OMW by an established technique. Neutrophils, isolated from blood of healthy volunteers, were incubated with increased concentrations of polyphenol extract and ROS production was measured by luminol-amplified chemiluminescence and cytochrome c reduction techniques. Results show that the polyphenol extract from OMW inhibited phorbol-myristate acetate (PMA)-stimulated neutrophil ROS production as measured by the chemiluminescence assay. The polyphenols extract from OMW also inhibited neutrophil superoxide production as measured by the cytochrome c reduction assay; as well as H₂O₂ production as measured by flow cytometry. Also, the polyphenol extract reacted with pure H₂O₂ but did not affect superoxide anions production by the xanthine/xanthine oxidase enzymatic system. Our results show that polyphenols extracted from OMW exert a strong antioxidant effect and they could have an anti-inflammatory effect by inhibiting neutrophil ROS production and by scavenging hydrogen peroxide, thus limiting their toxic effects. OMW could be used to extract polyphenols for medicinal applications.

Keywords: Antioxidant; Olive mill wastewater; Polyphenols; Polymorphonuclear neutrophils; Reactive oxygen species

Introduction

The Mediterranean region is the first producer of olive oil in the world. Despite the known beneficial properties of olive oil on health, its production generates large amounts of by-products such as olive mill wastewater (OMW) [1], which constitutes an important environmental pollution product. The Mediterranean region accounts for 95% of the global OMW product in the world [2]. Phenolic compounds such as oleuropein, tyrosol, hydroxytyrosol and caffeic acid are abundant in OMW [3,4]. The presence of polyphenols in olive oil is believed to be responsible for its stability [5]. Olive polyphenols are also known to play a role in preventing chronic human diseases such as cardiovascular diseases and inflammatory diseases [6]. Several *in vitro* and *in vivo* studies confirmed that phenolic compounds from olive reduce the effect of oxidative stress associated with pathological disorders including atherosclerosis [7,8], cancer [9,10], inflammatory diseases [11-13], neurodegenerative diseases [14], and they have some anti-microbial and anti-viral properties [15-18].

Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical (OH[•]) are powerful oxidants produced by several enzymatic systems in the body [19]. Phagocytes such as neutrophils, monocytes and macrophages are major ROS producing cells [20]. Neutrophil activation leads to the production of ROS in a process called respiratory burst, mediated by a multi-component enzyme NADPH oxidase. ROS produced by this process are used by phagocytes to kill infectious agents. In contrast, over production of ROS may cause oxidative stress, leading to many deleterious effects for the organism [21]. In this context, polyphenol compounds, known to have an antioxidant effect, can be used to protect cell against oxidative damage and limit the risk of various degenerative diseases associated to excessive ROS production by phagocytes. While,

individual polyphenol compounds have been shown to display anti-oxidative effect, little is known about the effect of total polyphenol extracts from OMW [22-25]. In this work, we used OMW, from *chemlal* variety olive tree which is largely cultivated in Kabylia (Algeria), to extract polyphenols. Polyphenol extract were tested on ROS production by human neutrophils and enzymatic systems.

Materials and Methods

Materials

Ficoll, Dextran, cytochrome C, luminol, PMA (4b-phorbol-12b-myristate-13-acetate), xanthine, xanthine-oxidase, H₂O₂, HRPO (horseradish peroxidase), 2',7' - Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), Dulbecco's Phosphate-buffered saline (PBS) and Hanks' balanced salt solution (HBSS) were purchased from Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). The different solutions were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) immediately before use.

Extraction of polyphenols from olive mill wastewater

Polyphenols were extracted according to the method previously

***Corresponding author:** Dr Jamel El Benna, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 rue Henri Huchard, Paris, F-75018, France, Tel.: +33-157277723; Fax: +33-157277471; E-mail: jamel.elbenna@inserm.fr

Received September 13, 2014; **Accepted** October 16, 2014; **Published** October 20, 2014

Citation: Bedouhene S, Hurtado-Nedelec M, Sennani N, Marie JC, El-Benna J, et al. (2014) Polyphenols Extracted from Olive Mill Wastewater Exert a Strong Antioxidant Effect in Human Neutrophils. Int J Waste Resources 4: 161. doi: [10.4172/2252-5211.1000161](http://dx.doi.org/10.4172/2252-5211.1000161)

Copyright: © 2014 Bedouhene S, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

described [4]. Olive mill wastewater was collected from the region of Kabylia, the most important producer of olive oil in Algeria (Algeria). Liquid-liquid extraction of phenolic compounds with ethyl acetate was carried out on olive mill wastewater samples obtained from a continuous olive oil processing plant. OMW was acidified to pH 2 with HCl and washed with hexane in order to remove the lipid fraction, the mixture was vigorously shaken and centrifuged for 5 min at 3000 rpm. The phases were separated and washed successively twice. Extraction of phenolic compounds was then carried out with ethyl acetate: the washed OMW samples were mixed with ethyl acetate and vigorously shaken before centrifugation for 5 min at 3000 rpm. The phases were separated and the extraction was repeated four times successively. The ethyl acetate was evaporated using a speed Vac. The aliquots of polyphenol extract without solvent were frozen (-20°C) until utilization.

Determination of total polyphenol content

Total polyphenol compounds in OMW extract was determined by the Folin-Ciocalteu assay according to the method described by Singleton [26]. The absorbance was read at 725 nm in Uvikon 931 (Contron, Milano, Italy) UV-Vis spectrophotometer and all the experiments were performed in triplicate. The content of total polyphenol is reported as gallic acid equivalents (EqGA) by reference to standard curve. For experiments, polyphenols extract was prepared at 5 mg/mL in PBS then diluted in the assay at different concentrations.

Neutrophil preparation

Neutrophils were isolated from venous heparinized blood, freshly collected from healthy volunteers. We used Dextran (T500) to remove red blood cells, followed by centrifugation over Ficoll-Paque to remove mononuclear cells and hypotonic lysis of any remaining contaminating red blood cells as described previously [2]. Finally, the neutrophils were centrifuged and suspended in PBS before being counted.

Determination of cell viability

Isolated human neutrophils were incubated with polyphenols extract at concentrations of 0, 25, 50, 100, 200 and 250 µg/mL during 30 min. Cell viability was evaluated by the trypan blue exclusion test.

Measurement of ROS production by luminol-amplified chemiluminescence

Neutrophils (5×10^5 /0.5 mL) were resuspended in HBSS in the absence or presence of polyphenol extracts (0, 25, 50, 100, 200 and 250 µg/mL), in the presence of luminol (10 µM), for 15 min at 37°C, then

PMA (100 ng/mL) was added and chemiluminescence was evaluated with a luminometer (Auto Lumat LB953 model, EG & G Berthold). Light emission was recorded in counted photons per minute (cpm) during 30 min at 37°C. The percentage of inhibition was calculated in comparison to the control without polyphenol extract. To test the effect of polyphenol on H_2O_2 , we use 0.003% H_2O_2 mixed to 5U of HRPO in the presence of luminol (10 µM) and increasing concentrations of polyphenol extract (0, 10, 20, 50, 100 µg/mL). Chemiluminescence was measured for 30 min as described above.

Measurement of superoxide production by the cytochrome c reduction assay

Neutrophils (1×10^6) were incubated during 10 min at 37°C with cytochrome c (1 mg/mL) and increasing concentrations polyphenol extract (0, 25, 50, 100, 200, 250 µg/mL), prior to stimulation with 100 ng/mL PMA. Superoxide anion production was determined by measuring the ferric cytochrome c reduction with a UVIKON 860 spectrophotometer at 550 nm during 10 min.

Xanthine-Xanthine Oxidase (XXO)-derived superoxide production was determined in 1 mL PBS containing xanthine (100 mM) and xanthine oxidase (1U), in the presence of cytochrome c and increasing concentrations of polyphenol extracts (0, 25, 50, 100, 200 and 250 µg/mL). Superoxide anion production was determined by measuring the ferric cytochrome c reduction with spectrophotometer at 550 nm over 10 min. Superoxide production values were calculated using the molar extinction coefficient of reduced cytochrome c (2.1×10^4 mol/L⁻¹ cm⁻¹).

Measurement of intracellular H_2O_2 production by flow cytometry

Intracellular H_2O_2 production was measured using a flow cytometric assay. The method is based on that when 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe diffuses across neutrophils membrane, it is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH which remains trapped within the cells. In presence of H_2O_2 , non-fluorescent intracellular DCFH is oxidized to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). PMNs (5×10^5 cells) in Hank's were incubated for 15 min with 2,7-DCFH-DA (100 mmol/l) in the dark and in a water bath at 37°C with gentle agitation. Thereafter, polyphenol extract was added at increasing concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 µg/mL) to the cells and further incubated for 10 min. Neutrophils were stimulated with PMA (100 ng/mL) over 15 min. The reaction was stopped at 4°C for 15 min. Flow cytometric analysis was performed with a Becton Dickinson FACSCantoII (Immuno cytometry Systems). The fluorescence intensity

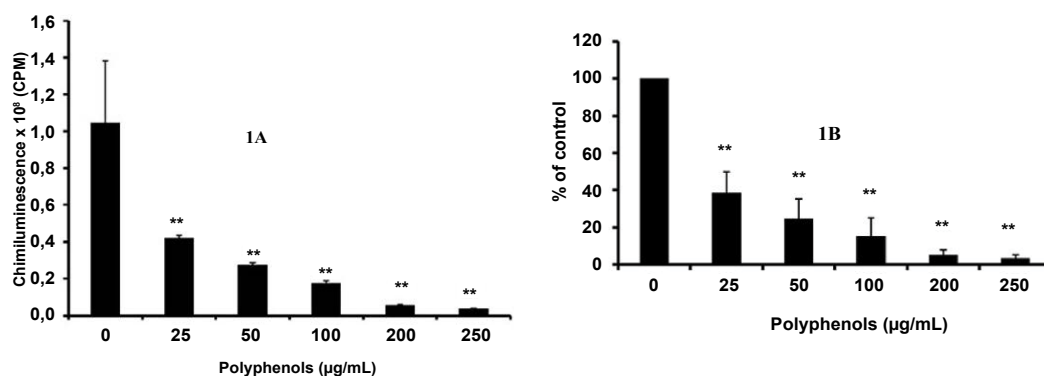


Figure 1: Effect of the polyphenols extract on ROS production by human neutrophils. Neutrophils were incubated with the OMW polyphenols extract at increasing concentrations and stimulated or not with PMA. Luminol-amplified chemiluminescence was measured during 30 min. Data are expressed as means $\pm$ SEM; n=3, * p < 0.05.

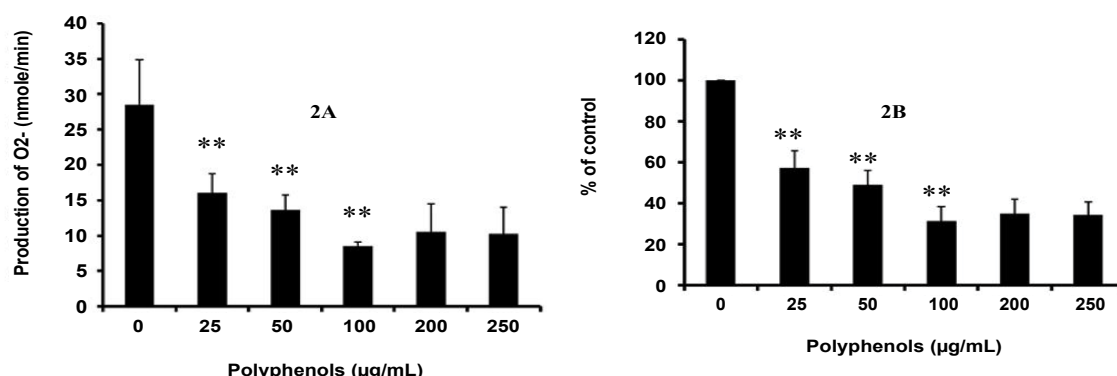


Figure 2: Effect of the polyphenols extract on superoxide anions production by human neutrophils. Neutrophils were incubated with the OMW polyphenols extract at increasing concentrations in the presence of cytochrome c and stimulated or not with PMA. Production of superoxide anions was monitored at 550 nm. Data are expressed as means $\pm$ SEM; n=3, * p< 0.05.

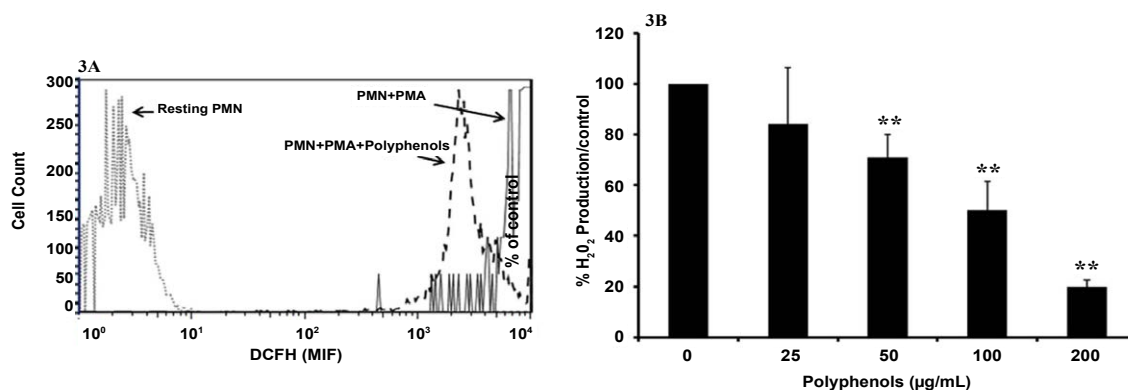


Figure 3: Effect of the polyphenols extract on DCFH-detected H₂O₂ production. Neutrophils were incubated with DCFH-DA at 37 °C at increasing concentrations of polyphenols extract. Flow cytometric analysis was performed with a Becton Dickinson FACSCantoll. Representative FACS profile of neutrophils stimulation and the effect of polyphenols extract (Counts: number of neutrophils; MFI: Mean fluorescence intensity). The results are calculated using a stimulation index (SI), namely the ratio of MFI of stimulated cells to that of unstimulated cells. Data are expressed as means $\pm$ SEM, n=3; * p< 0.05.

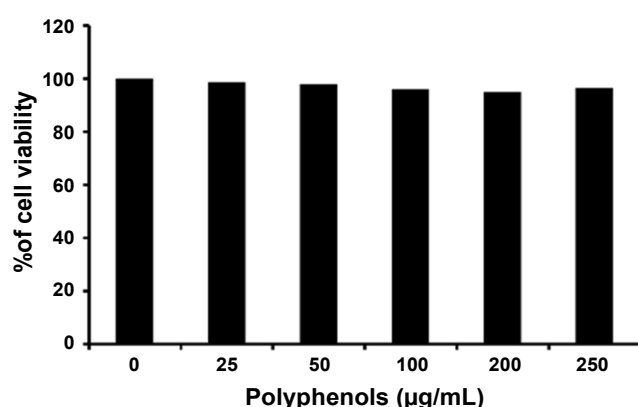


Figure 4: Effect of the polyphenols extract on neutrophil viability. Isolated human neutrophils were exposed to polyphenols extract at concentrations. Viability was evaluated with adding Trypan Blue, and blue cells were counted. % of viable cells was expressed compared to control conditions (without polyphenols). Results are expressed as mean $\pm$ SEM, n= 3, * p< 0.05.

was measured simultaneously at wavelength of 488 nm for excitation and at 530 nm for emission. The data were analyzed using FACSDiva program and results are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) was used to quantitate the responses. The effect of polyphenol

extract on H₂O₂ production was calculated by using a stimulation index (SI), namely the ratio of the MFI of stimulated cells versus that of unstimulated cells.

Statistical analysis

The data are presented as a percentage of the control and was calculated according to the equation: [% of control = (Response with polyphenol extract/Control Response) x 100]. Statistical analysis was established between controls and samples treated with polyphenols extract using student *t*-test.

Results:

Extraction of polyphenols from olive mill wastewater

Olive mill wastewater was collected from the region of Kabylia the most important producer of olive oil in Algeria. In this region, most of the olive trees are *chemlal* olive trees. Extraction of phenolic compounds was carried out on olive mill wastewater samples obtained from a continuous olive oil processing plant as described in material and method section. Total polyphenol compounds in OMW extract was determined by the Folin–Ciocalteu assay according to the method described by Singleton [26]. The content of total polyphenols is reported as gallic acid equivalents (EqGA) by reference to standard curve. After purification, we evaluated a content of polyphenol compounds in the

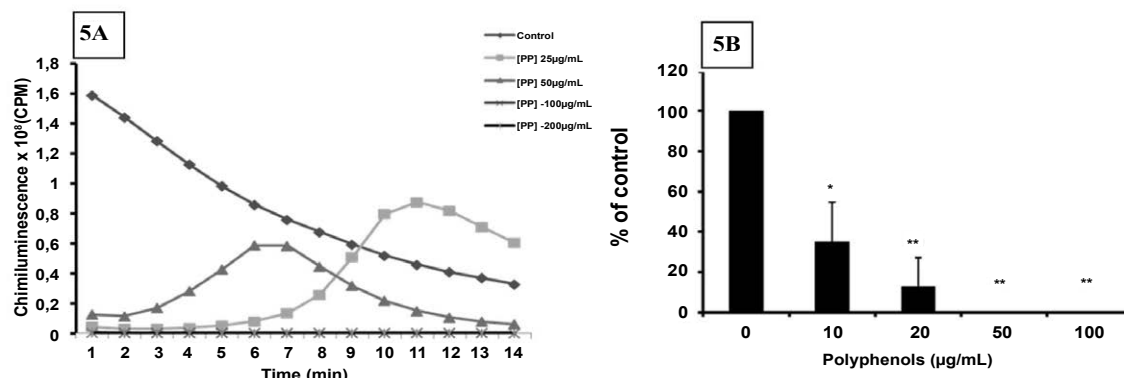


Figure 5: Effect of the polyphenols extract on luminol-amplified chemiluminescence in acellular system. H₂O₂ and HRPO were incubated with polyphenols extract at increasing concentrations. Luminol-amplified chemiluminescence was measured during 30 min. Data are expressed as means ± SEM, n=3, *p< 0.05.

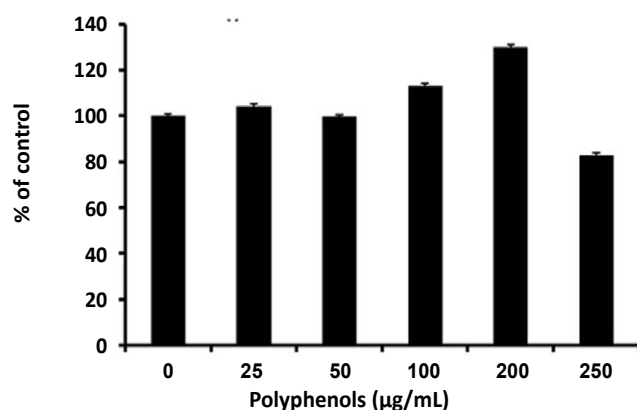


Figure 6: Effect of the polyphenols extract on superoxide anion production by the xanthine/xanthine oxidase cell free system. The polyphenols extract was incubated at increasing concentrations with xanthine oxidase, xanthine was added and superoxide was measured by the cytochrome c reduction assay at 550 nm. Results are expressed as the % of control without the extract. Data are expressed as means ± SEM, obtained in three independent experiments.

OMW extract by 0.148 mg EqGA/mg extract.

Effect of polyphenol extract from OMW on neutrophil ROS production

To evaluate the effect of the polyphenol extract on human neutrophil ROS production, freshly isolated neutrophils were treated with increasing concentrations of the polyphenol extract (0, 25, 50, 100, 200 and 250 µg/mL), chemiluminescence was measured using luminol as probe. Luminol-amplified chemiluminescence detects multiple ROS, mainly superoxide anion, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. The result shows that the polyphenol extract inhibited total ROS production by PMA-stimulated neutrophils (Figures 1A and 1B). This result suggests that the total polyphenol extract from OMW may scavenge ROS or affect the neutrophil NADPH oxidase activity or its upstream activation.

Effect of the polyphenol extract on superoxide production by neutrophils

To assess specifically the effect of the polyphenol extract on superoxide anion production, neutrophils were pre-incubated for 10 min at 37°C with cytochrome c and the polyphenol extract and then were stimulated with PMA. Superoxide anion production was

determined by measuring the reduction of cytochrome c at 550 nm with a UVIKON 860 spectrophotometer. The result shows that the polyphenol extract inhibited the cytochrome c reduction (Figures 2A and 2B). This suggests that the extract may affect NADPH oxidase activity in neutrophils or could scavenge superoxide anions.

Effect of the polyphenol extract on H₂O₂ production by neutrophils

To test the effect of increasing concentration of polyphenol extract on intracellular production of H₂O₂ by neutrophil in response to PMA, we used DCFH probe which is fluorescent in presence of H₂O₂. We calculated the effect of polyphenol extract on H₂O₂ production by using a stimulation index (SI), namely the ratio of stimulated cells to that of unstimulated cells. The neutrophils were identified on the basis of forward and side scatter alone and analysed in combination with the DCFH probe. The fluorescence intensity decreased in neutrophils treated by polyphenols cells as compared to control cells, this effect was dependent on increasing concentrations of polyphenol extract. These results (Figures 3A and 3B) showed that the polyphenol extract inhibited intracellular production of H₂O₂, although at higher concentrations than those which inhibited chemiluminescence and cytochrome c reduction.

The polyphenol extract from OMW has no effect on human neutrophil viability

To verify that the inhibitory effect of the polyphenol extract was not due to its toxic activity on neutrophils, we examined its effect on cell viability using trypan blue exclusion assay. The result shows that after 30 min of neutrophils incubation with increasing concentrations of polyphenols, cell viability was greater than 95% (Figure 4). Thus cell viability was not affected by polyphenol extract.

Effect of polyphenol extract on H₂O₂ and superoxide anion in cell-free systems

To identify the specific target of polyphenols extract, pure H₂O₂ was incubated with increasing concentrations of the polyphenol extract and then the luminol-amplified chemiluminescence assay with HRPO (5U) was used to detect H₂O₂. Results show that polyphenols extract scavenges H₂O₂ at low concentrations in a dose dependent manner (Figures 5A and 5B). We also studied the effect of polyphenol extract on superoxide anion produced by the Xanthine/Xanthine Oxidase. Results show that polyphenols extract did not inhibit cytochrome c reduction (Figure 6).

Discussion

In this study, we extracted polyphenols from olive mill wastewater (OMW) from a specific variety of olive tree, the chemlal olive tree and tested its effects on ROS production by human neutrophils. Firstly, we used luminol-amplified chemiluminescence, a technique which detects the total ROS production. Results show that, in PMA stimulated neutrophils, the polyphenol extract significantly inhibits total ROS production in a dose-dependent manner. Secondly, using the cytochrome c reduction assay, a specific method to measure extracellular superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) production, we found that the polyphenol extract significantly inhibited neutrophil's $O_2^{\cdot-}$ production. Thirdly, using flow cytometry and DCFH probe, we showed that the polyphenol extract at low concentrations significantly inhibited the intracellular production of H_2O_2 , in a dose-dependent manner. These effects were not due to a toxic effect of the polyphenol extract since cell viability was not affected. Interestingly, the polyphenol extract was able to react with pure H_2O_2 in vitro but not with $O_2^{\cdot-}$ produced by the xanthine/xanthine oxidase system. These results suggest that the polyphenol extract could have a double effect, 1) scavenging H_2O_2 and 2) inhibiting NADPH oxidase activity or its upstream activation. To check the second possibility, we tested the effect of the polyphenol extract on isolated neutrophil membranes containing activated NADPH oxidase. We found no effect on the isolated enzyme (data not shown). These results suggest that the polyphenol extract is able to affect NADPH oxidase activation, probably by interfering with the neutrophil signaling pathways involved in NADPH oxidase activation.

Our results show that OMW from *Chemlal* variety is a rich source of antioxidants such as phenolic compounds. Among the polyphenol compounds present in olive mill wastewater, only hydroxytyrosol and oleuropein showed a highly antioxidant effect [27-29]. Many recent human and animal studies have shown a spectrum of highly interesting bioactivities of polyphenols from olive, including antimicrobial activity, anti-cancer activity, anti-inflammatory activity and beneficial effect in cardiovascular diseases [3,8-10,12]. Also, these effects are well sustained by epidemiological studies on Mediterranean diet [30].

It has been found that polyphenol compounds are highly absorbed by human cells [31], and stored *in vivo* in some tissues such as prostate and breast tissues [30,32,33]. These data suggest that assimilated polyphenols can protect against H_2O_2 toxicity and exert beneficial effects on health. The total polyphenol extract could have a more effective effect *in vivo* due to synergistic action and effects of individual compounds.

It is well established that ROS generated by neutrophils and monocytes/macrophages are involved in inflammatory diseases such as inflammatory bowel diseases, cardiovascular diseases and rheumatoid arthritis [34]. The polyphenol extract could be beneficial in these diseases due to its inhibitory action on neutrophil ROS production and also by scavenging extracellular H_2O_2 which is the most diffusible ROS. Thus the polyphenol can protect tissues of different organs from H_2O_2 , limiting its bystander toxic effects. The scavenging of H_2O_2 polyphenols has also been reported *in vitro* by Ju et al. [35] and in neutrophils with another extract by Paula et al [36].

In conclusion, the polyphenol extract from OMW is a powerful hydrogen peroxide scavenger and a powerful inhibitor of neutrophil NADPH oxidase activation. These compounds present in OMW could contribute to the prevention of diseases in which ROS are involved. OMW could also be used as immunomodulatory compounds and a therapeutic adjuvant in the treatment of neutrophil-mediated

inflammatory diseases as an alternative to synthetic antioxidants in pharmaceutical and agroalimentary process. As OMW is a significant source of phenolic compounds beneficial for health, its utilization as a resource of polyphenols can be valorized to reduce environmental waste [37]. Thus, the extraction of polyphenol compounds from OMW is a fundamental step before any biological degradation of this waste. OMW could be used as a source of antioxidant compounds with a clear impact on both health and environment.

References

- Nafzaoui A (1991) Valorization des sous-produits de l'olivier. Options méditerranéennes, série séminaires 16 : 101-108.
- Kapellakis IE, Tsagarakis KP, Avramaki C, Angelakis AN (2006): Olive mill wastewater management in river basins: A case in Greece. *Agricultural Water management* 82: 354-370.
- Czerwinska M, Kiss AK, Naruszewicz M (2012) A comparative study of the effects of oleuropein and oleacein on human neutrophil oxidative bursts and monocytes nitric oxide production. *Food Chemistry* 131: 940-947.
- De Marco E, Sa Varese M, Paduano A, Sacchi R (2007) Characterization and fractionnement of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chemistry* 104: 858-867.
- Chimi HJ, Cillard P and Rahmani M (1991) Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *JAQCS* 68: 307-312.
- Babich H, Visioli F (2003) In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Farmaco* 58: 403-407.
- Kastorini CM, Milionis HJ, Goudevenos JA, Panagiotakos DB (2010) Mediterranean diet and coronary heart disease: is obesity a link? - A systematic review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20: 536-551.
- Ozsoy N, Candoken E and Akev N (2009) Implications for degenerative disorders: Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β -carotene and α -tocopherol in Aloe vera. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Landes Bioscience)* 2: 99-106.
- Isik S, Karagöz A, Karaman S, Nergiz C (2012) Proliferative and apoptotic effects of olive extracts on cell lines and healthy human cells. *Food Chemistry* 134: 29-36.
- Yang CS, Wang H, Li GX, Yang Z, Guan F, et al. (2011) Cancer prevention by tea: Evidence from laboratory studies. *Pharmacol Res* 64: 113-122.
- de la Puerta R, Martínez-Domínguez E, Ruiz-Gutiérrez V (2000) Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Z Naturforsch C* 55: 814-819.
- Impellizzeri D, Esposito E, Mazzone E, Paterniti I, Di Paola R, et al. (2011) The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *Clin Nutr* 30: 533-540.
- Miles EA, Zoubouli P, Calder PC (2005) Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 21: 389-394.
- Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, et al. (2006) The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 145: 333-341.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, et al. (1999) On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol* 51: 971-974.
- Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, et al. (1995) Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J Appl Bacteriol* 79: 393-398.
- Rodriguez-Vaquero MJ, Alberto MR, Manca-de-Nadra MC (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18: 93-101.
- Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, et al. (2009) Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Res* 83: 35-44.
- Favier A (2006) Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* 11-12: 108-115.

20. Gougerot-Pocidal MA, Elbim C, Dang PM, El Benna J (2006) [Primary immune deficiencies in neutrophil functioning]. *Presse Med* 35: 871-878.
21. Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotillo D, et al. (1998) Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol* 123: 1691-1699.
22. Alvarado C, Alvarez P, Jiménez L, De la Fuente M (2005) Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 7: 1203-1210.
23. Léger CL1, Kadiri-Hassani N, Descomps B (2000) Decreased superoxide anion production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters. *J Agric Food Chem* 48: 5061-5067.
24. Schaffer S, Müller WE, Eckert GP (2010) Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol Res* 62: 322-327.
25. Visioli F, Bellomo G, Galli C (1998) Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 60-64.
26. Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
27. O'Dowd Y, Driss F, Dang PM, Elbim C, Gougerot-Pocidal MA, et al. (2004) Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 68: 2003-2008.
28. Ju HY, Chen SC, Wua KJ, Kuo HC, Hseu YC, et al. (2012) Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol* 50: 492-502.
29. Paula FS, Kabeya LM, Kanashiro A, de Figueiredo AS, Azzolini AE, et al. (2009) Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. *Food Chem Toxicol* 47: 163-170.
30. Parzonko A, Naruszewicz M (2010) Silymarin inhibits endothelial progenitor cells' senescence and protects against the antiproliferative activity of rapamycin: preliminary study. *J Cardiovasc Pharmacol* 56: 610-618.
31. Visioli F, Poli A, Gall C (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 22: 65-75.
32. Shivashankara KS and Acharya SN (2010) Uptake of Polyphenols in Tissues. Bioavailability of Dietary Polyphenols and the Cardiovascular Diseases. *The Open Nutraceuticals Journal* 3: 227-241.
33. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073S-85S.
34. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81: 230S-242S.
35. Moreira MR, Kanashiro A, Kabeya LM, Polizello ACM, Azzolini AECS, et al. (2007) Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptors are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. *Life Sci* 81: 317-326.
36. Conner EM, Grisham MB (1996) Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12: 274-277.
37. Kalogerakis N, Politi M, Foteinis S, Chatzisyneon E, Mantzavinos D (2013) Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *J Environ Manage* 128: 749-758.

Citation: Bedouhene S, Hurtado-Nedelec M, Sennani N, Marie JC, Benna JE, et al. (2014) Polyphenols Extracted from Olive Mill Wastewater Exert a Strong Antioxidant Effect in Human Neutrophils. *Int J Waste Resources* 4: 161. doi: [10.4172/2252-5211.1000161](https://doi.org/10.4172/2252-5211.1000161)

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 350 Open Access Journals
- 30,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsgroup.info/editorialtracking/waste-resources/SubmitManuscript.php>



Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced neutrophil degranulation and chemotaxis via AKT, p38, and ERK1/2 MAP-Kinase inhibition

Samia Bedouhene^{1,2} · Farida Moulti-Mati¹ · Pham My-Chan Dang² ·
Jamel El-Benna² 

Received: 3 April 2017 / Accepted: 29 May 2017
© Springer International Publishing AG 2017

Abstract

Purpose Oleuropein and hydroxytyrosol are polyphenols that are extracted from olives and are major biological active components of olives and olive oil. Oleuropein and hydroxytyrosol exhibit interesting pharmacological effects on cells, and have been shown to have many health benefits such as anti-inflammatory effects. These effects were mainly attributed to their ability to scavenge the reactive oxygen species (ROS) produced by phagocytes such as neutrophils. The aim of this study was to investigate the effect of oleuropein and hydroxytyrosol on other neutrophil functions.

Methods Human neutrophils were isolated from healthy donors. ROS production was measured by luminol-amplified chemiluminescence. Degranulation was assessed by measuring myeloperoxidase activity and Western blots. Chemotaxis was assessed by the under-agarose chemotaxis assay. Phosphorylated proteins were assessed by gel electrophoresis and Western blots.

Results We show that in addition to their ROS scavenging effect, oleuropein and hydroxytyrosol significantly inhibited the bacterial peptide *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF)-induced degranulation of

azurophilic and specific granules as measured by myeloperoxidase and lactoferrin release, respectively. We also show that oleuropein and hydroxytyrosol reduced fMLF-induced neutrophil chemotaxis. Interestingly, both agents impaired the fMLF-induced AKT, p38MAPKinase, and ERK1/2 phosphorylation, signaling molecules that are involved in pathways regulating neutrophil functions.

Conclusion Our data suggest that the anti-inflammatory properties of oleuropein and hydroxytyrosol are not only restricted to their ROS scavenging effect, but also involve the inhibition of two other major pro-inflammatory neutrophil functions.

Keywords Hydroxytyrosol · Oleuropein · Neutrophils · ROS · Degranulation · Chemotaxis · Signaling

Introduction

Polymorphonuclear neutrophils play a key role in host defense against pathogens, as they are the first cells to migrate out of the circulation to the infection site (Nauseef and Borregaard 2014; El-Benna et al. 2016). The process by which pathogens are eliminated begins with adherence of neutrophils to the pathogen and phagocytosis, followed by production of high quantity of reactive oxygen species (ROS) or respiratory burst, and the release of proteases and anti-bacterial peptides into the phagosome through degranulation (Nauseef 2007; Nordenfelt and Tapper 2011).

The oriented migration of neutrophils towards the infection site (also called chemotaxis) is the first necessary and essential step that ensures bactericidal activity. Neutrophil chemoattractants include the fMLF (*N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) bacterial peptide, IL-8,

✉ Jamel El-Benna
jamel.elbenna@inserm.fr

¹ Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Tizi Ouzou, Algeria

² INSERM U1149, CNRS-ERL8252, Centre de Recherche sur l'Inflammation (CRI), Laboratoire d'Excellence Inflamex, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Site Xavier Bichat, 16 Rue Henri Huchard, Paris, France

C5a and leukotriene B4 (LTB4) (Tan and Weninger 2016; Brazil and Parkos 2016). Once at the infectious site, neutrophils recognize the pathogen via different receptors and ligands, and recognition is generally followed by engulfment of the particle, surrounding it with a membrane to form a vacuole called the phagosome. Engulfment of the bacteria initiates the bactericidal program that involves mainly the respiratory burst and degranulation. The respiratory burst is mediated by the phagocyte NADPH oxidase, NOX2, which produces superoxide anion, the precursor of other ROS. Degranulation is the release of granule's contents. Indeed, neutrophils contain four types of granules or vesicles that have different composition and density (Faurschou and Borregaard 2003). Those are azurophilic granules containing myeloperoxidase (MPO), elastase, cathepsins, etc., specific granules containing lactoferrin, lipocalin, membrane receptors, cytochrome b558, etc., tertiary granules, essentially containing gelatinase, and the highly mobilizable secretory vesicles. The release of these granules, i.e., degranulation, is important for immunity and inflammation. While neutrophils are required for host defense, their excessive recruitment and activation (degranulation and respiratory burst) can induce tissue injury contributing to enhanced inflammatory reaction and diseases, such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, septic shock, and more (Babior 2000; Paige 2006; El-Benna et al. 2016). Thus, finding new molecules that inhibit neutrophil functions could lead to new anti-inflammatory drugs.

The mediterranean diet is known to be rich in bioactive compounds, such as polyphenols, flavonoids, beneficial unsaturated fatty acids, and numerous vitamins. In this context, olives and virgin olive oil, which are greatly consumed in this region, are potential sources of bioactive molecules (Owen et al. 2000; Tuck and Hayball 2002; Waterman and Lockwood 2007; Visioli and Bernardini 2011). Oleuropein and hydroxytyrosol are major polyphenols that are found in olives, olive leaves, and olive oil. Oleuropein is the most abundant compound and its enzymatic degradation generates hydroxytyrosol. The health benefits of olive polyphenols are well known in several diseases, such as inflammatory diseases, atherosclerosis, hypertension, degenerative diseases, and cancer (Barbaro et al. 2014; Andreadou et al. 2015; Giner et al. 2016). Oleuropein and hydroxytyrosol are mainly known for their antioxidant effect (Visioli et al. 1998, 2002; O'Dowd et al. 2004; Bedouhene et al. 2014). In particular, they have been shown to scavenge neutrophil ROS production, but their effects on other key inflammatory neutrophil functions have been less studied. The aim of this work was to investigate the effect of oleuropein and hydroxytyrosol on neutrophil degranulation and chemotaxis and the signaling pathways regulating these functions.

Methods

Reagents

Hydroxytyrosol, oleuropein, *ortho*-dianisidine dihydrochloride, fMLF, luminol, Phosphate Buffered Saline (PBS), Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), protease and phosphatase inhibitors, mouse monoclonal anti- β -Actin antibody, protease and phosphatase inhibitors, and salt solutions were from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Dextran T500 was from Pharmacosmos (Holbaek, Denmark), Ficoll was from GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden), SDS-PAGE and Western blotting reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Anti-MPO and anti-Lactoferrin antibodies were from Abcam (Cambridge, UK), anti-phospho-AKT, *p*-p38 and *p*-ERK1/2 and anti-AKT, p38 and ERK1/2 were from cell Signaling Technology (Boston, MA, USA). HRP-conjugated goat anti-rabbit, HRP-conjugated goat anti-mouse, AP-conjugated goat anti-rabbit antibodies and ECL (enhanced chemiluminescence) reagent were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany).

Human neutrophil preparation

Venous heparinized blood obtained from healthy adult volunteers was used to isolate fresh neutrophils by Dextran (T500) sedimentation to remove red blood cells followed by Ficoll density gradient centrifugation (El-Benna and Dang 2007). After hypotonic lysis of red blood cells, the neutrophil pellet was collected and washed in PBS before counting cells. Neutrophils were 96% pure and 99% viable.

Luminol-amplified chemiluminescence assay

Isolated neutrophils (500,000 cells) were resuspended in 500 μ l of HBSS and pre-incubated for 10 min at 37 °C in the presence of luminol (10 μ M) and increasing concentration of oleuropein and hydroxytyrosol. Neutrophils were then stimulated with fMLF (10^{-6} M) and luminol-enhanced chemiluminescence was measured using a luminometer (Biolumat LB937; Berthold, France SAS, Thoiry, France) (O'Dowd et al. 2004).

Cell viability assay

Isolated neutrophils (1×10^6 cells) were resuspended in 1 ml of HBSS and incubated in the presence of increasing concentrations of oleuropein or hydroxytyrosol (10–100 μ M) at 37 °C for 120 min. Cell viability was assessed by trypan-blue exclusion method and results are

presented as the percentage of viable cells compared to untreated cells.

Neutrophil degranulation

Neutrophils (5×10^6 /ml in 500 μ l HBSS) were pre-incubated at 37 °C with or without increasing concentrations of oleuropein and hydroxytyrosol for 60 min prior to adding cytochalasin B (5 μ g/ml) for 5 min. Neutrophils were then stimulated with fMLF (10^{-6} M) for 2 min at 37 °C. The reaction was stopped by centrifugation for 30 s at $12,000 \times g$ (Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg, Germany), supernatants were collected, centrifuged again at $15,000 \times g$ for 10 min at 4 °C, and used for MPO and lactoferrin assays.

Measurement of myeloperoxidase activity

The MPO activity was measured using a modified spectroscopic method described by Bradley et al. (1982). Briefly, 50 μ l of the centrifuged supernatant was mixed with phosphate buffer (350 μ l) and an equal volume of a solution containing 1 mg/ml *ortho*-dianisidine dihydrochloride plus 0.0005% hydrogen peroxide. The change in absorbance at 460 nm was recorded by UVIKON 860 spectrophotometer at 22 °C for 10 min. The results were expressed as percent of control.

Neutrophil activation, sample preparation and Western blotting analysis

Neutrophils (10×10^6 /400 μ l HBSS) were pretreated with oleuropein, hydroxytyrosol, or buffer, for 60 min, and stimulated with fMLF (10^{-6} M for 30 s) at 37 °C with mild shaking. The reaction was stopped by adding 100 μ l of 5 $\times$ concentrated modified-Laemmli sample buffer (Laemmli 1970; Belambri et al. 2014). Samples were vigorously vortexed, and then denatured for 3 min at 100 °C. Solubilized proteins were stored at -80 °C until use. Neutrophil supernatants and lysates were sonicated prior to being subjected to 10% SDS-PAGE (Eq. 1×10^6 cells/well) using standard techniques. The separated proteins were transferred to nitrocellulose, and then blocked with 5% milk in Tris-buffered saline containing Tween 20 (TBS-T) for 1 h. After blocking, the membranes were probed with the appropriate antibody overnight at 4 °C. After several washes (3 $\times$ 5 min) with TBS-Tween 0.1%, the membranes were incubated with specific antibodies, e.g., anti-MPO (1:10,000); anti-lactoferrin (1:10,000), phospho-Akt, phospho-p38, phospho-Erk, HRP-labeled goat anti-mouse antibody (1:10,000) for actin, and HRP-labeled goat anti-rabbit antibody (1:10,000). The protein bands were revealed by enhanced chemiluminescence

(Santa Cruz, Heidelberg, Germany) (Belambri et al. 2014).

Under-agarose neutrophil chemotaxis assay

The migration of neutrophils was assessed using the under-agarose chemotaxis assay (Nelson et al. 1975). Agarose (0.7%) was dissolved in HBSS by heating for 1 min in a microwave. After cooling to 48 °C, 10% of decomplexed SVF was added to the agarose, and 5 ml of the mixture was added to each culture plate (Falcon plastics, 5 cm diameter). Once the agarose was solidified, four series of three aligned wells (3 mm internal diameter, 3 mm interspace) were punched in the agarose gel in each plate. The agarose cores were removed with a pipet using vacuum. For the chemotaxis assay, cells were resuspended to 100×10^6 cell/ml. Cells treated with increasing concentrations of oleuropein, hydroxytyrosol or control cells were added in the central well (5 μ l), and 5 μ l of the chemoattractant fMLF (10^{-7} M) or buffer PBS was placed in the other wells. Finally, the plates were incubated for 2 h at 37 °C. Cells were viewed by light microscopy (ZEISS) using 40 $\times$ magnification. The chemotaxis index was determined as the ratio of chemotaxis/spontaneous migration.

Statistical analysis

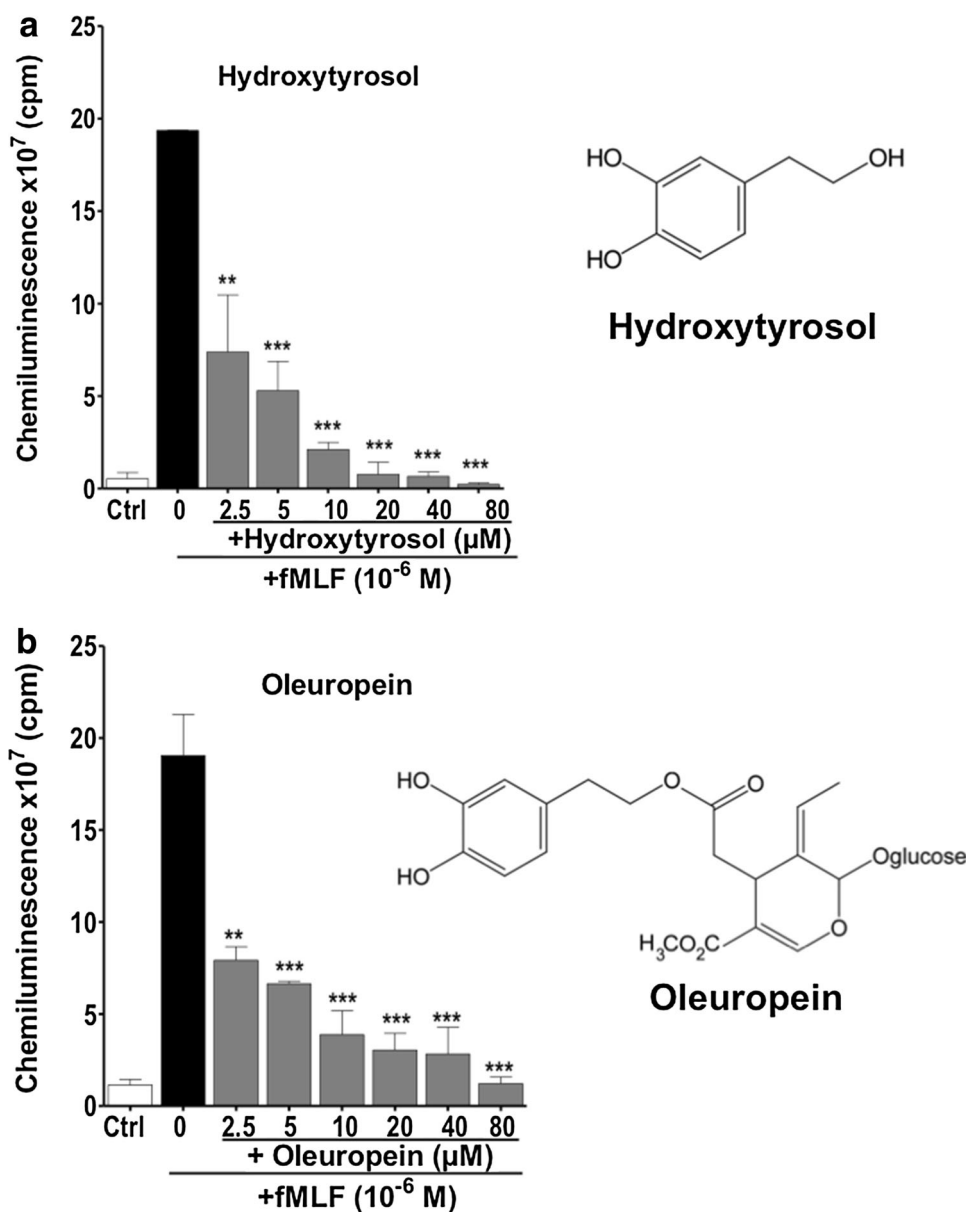
All the experimental data were expressed as mean $\pm$ SEM. The analysis was performed using Graph-Pad Prism version 4.0 for Windows, and the averages for the different groups were compared by one-way ANOVA test. * $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Oleuropein and hydroxytyrosol strongly inhibit fMLF-induced ROS production and are not toxic for human neutrophils

Oleuropein and hydroxytyrosol are polyphenols that have different structure (Fig. 1). They are well known for their potent antioxidant effect. As expected, oleuropein and hydroxytyrosol dose-dependently (2.5–80 μ M) inhibited the fMLF-induced ROS production as assessed by the luminol-amplified chemiluminescence assay (Fig. 1). We thus used these oleuropein and hydroxytyrosol concentrations to study the effect on other neutrophil functions. Furthermore, incubation of neutrophils at 37 °C with different concentrations of oleuropein and hydroxytyrosol for 120 min did not reduce neutrophil viability, even at 100 μ M (Fig. 2) showing that these molecules are not toxic for human neutrophils in these conditions.

Fig. 1 Chemical structure and effect of hydroxytyrosol and oleuropein on fMLF-induced ROS production by human neutrophils. Neutrophils were incubated without or with different concentrations of hydroxytyrosol (**a**) or oleuropein (**b**) for 10 min in the presence of luminol (10 μ M). ROS production was measured after stimulation with fMLF (10⁻⁶ M) using the luminol-enhanced chemiluminescence assay for 30 min. Histograms represent ROS production as calculated by the mean of the total area under the curves. Data are mean $\pm$ SEM of three separate experiments (** P < 0.05, *** P < 0.001)



Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit the release of azurophilic and specific granules from human neutrophils

To investigate the effect of oleuropein and hydroxytyrosol on neutrophil degranulation, cells were incubated with increasing concentrations of polyphenols for 60 min before treatment with cytochalasin B and fMLF, and MPO was assayed as described in the “Methods”. MPO release from fMLF-stimulated neutrophils was inhibited in a dose-dependent manner by oleuropein and hydroxytyrosol (Fig. 3a). This was confirmed by SDS-PAGE and immunoblotting with a specific antibody against MPO, as evidenced by the decrease in MPO levels in the cell-free supernatants (Fig. 3b). The release of lactoferrin, a specific

marker for specific granules was also analyzed using SDS-PAGE/Western blotting and a specific antibody. Indeed, oleuropein and hydroxytyrosol also inhibited lactoferrin release in a dose-dependent manner (Fig. 3c). Thus, these results show that in addition to their ROS scavenging effect, oleuropein and hydroxytyrosol inhibit neutrophil degranulation.

Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit neutrophil migration

Chemotaxis is fundamental for neutrophil recruitment to the inflammation site. Using the agarose neutrophil chemotaxis assay, we showed that PBS did not attract neutrophils while fMLF induced chemotaxis (Fig. 4a,

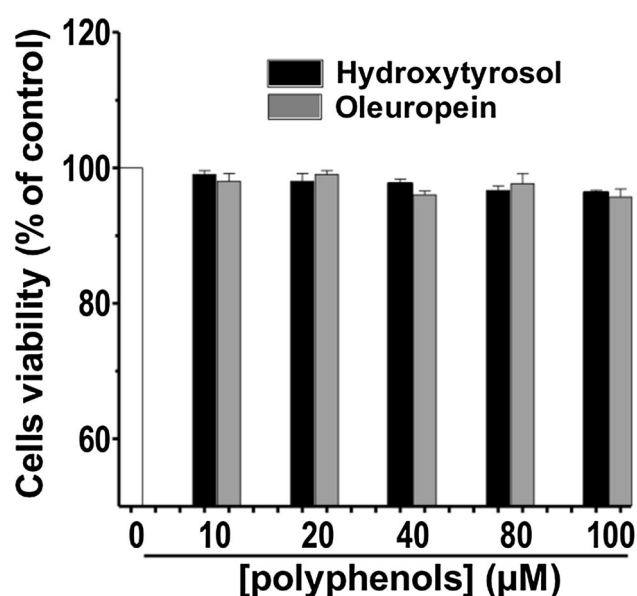


Fig. 2 Effect of hydroxytyrosol and oleuropein on neutrophil viability. Neutrophils were incubated without or with different concentrations of hydroxytyrosol or oleuropein for 120 min at 37 °C. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion and results expressed as % of control untreated cells. Data are mean $\pm$ SEM of three separate experiments

Upper panel). Interestingly, oleuropein and hydroxytyrosol inhibit neutrophil chemotaxis towards fMLF in a dose-dependent manner (Fig. 4a, b).

Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit fMLF-induced AKT, p38MAPK, and ERK phosphorylation in human neutrophils

Several signaling pathways such as the AKT, p38MAPK, and ERK1/2 pathways are involved in neutrophil degranulation and chemotaxis (Heit et al. 2002; Futosi and Mócsai 2016). We thus studied the impact of oleuropein and hydroxytyrosol on the phosphorylation status of these molecules as it reflects their activation. Both molecules reduced the phosphorylation of AKT, p38MAPK and ERK1/2 induced by fMLF without affecting the amount of these kinases (Fig. 5). Thus, the inhibition of the neutrophil functions by oleuropein and hydroxytyrosol could be due to the inhibition of AKT, p38MAPK and ERK1/2 activation.

Discussion

Oleuropein and hydroxytyrosol, two polyphenols present in olives and olive oil, are known for their health benefits, particularly in inflammatory diseases. In this work, we confirmed the inhibition of the stimulated production of ROS by oleuropein and hydroxytyrosol, and showed

that they are also able to inhibit the neutrophil degranulation and chemotaxis induced by a physiological stimulus, such as the bacterial peptide fMLF, and the fMLF-induced AKT, p38MAPK, and ERK1/2 activation.

At inflammatory sites, excessive neutrophil activation can lead to ROS overproduction, excessive release of proteases from granules and recruitment of additional neutrophils to maintain the inflammatory reaction. Others and we have previously reported that the effects of oleuropein and hydroxytyrosol on ROS generation by stimulated neutrophils are mainly due to scavenging of ROS. More specifically, they can scavenge hydrogen peroxide, but not superoxide anion, the product of NOX2 activation and the precursor of hydrogen peroxide (O'Dowd et al. 2004). As expected, oleuropein and hydroxytyrosol were effective at inhibiting ROS production assessed by the luminol-amplified chemiluminescence assay. Other studies have shown that hydroxytyrosol can inhibit other pro-inflammatory processes, such as the production and release of cytokines and other inflammatory agents (Richard et al. 2011; Impellizzeri et al. 2011; Rosignoli et al. 2013; Facchini et al. 2014). As the expression of several pro-inflammatory cytokines is mediated by the activation of NF- κ B, a process mediated by hydrogen peroxide, oleuropein and hydroxytyrosol by scavenging hydrogen peroxide can inhibit cytokine production (Zhang et al. 2009).

Interestingly, our results also show that oleuropein and hydroxytyrosol inhibit neutrophil-directed chemotaxis, suggesting that they may limit neutrophil recruitment to the inflammatory site, a major starting step in the inflammatory reaction. Oleuropein and hydroxytyrosol also inhibited the release of specific and azurophilic granules, which may prevent tissue injury from proteases and other toxic peptides effects. These effects were not due to a toxic effect of oleuropein and hydroxytyrosol as no cell death was noted, even at much higher concentrations than the ones required for inhibition of neutrophil function.

Neutrophil stimulation by fMLF induces several signaling cascades, such as the phosphoinositide-3-kinase (PI3K)–AKT pathway, the Rac–p38MAPK pathway and the Ras–ERK1/2 pathway. These pathways are known to be involved in neutrophil ROS production, degranulation, and chemotaxis (Heit et al. 2002; Futosi and Mócsai 2016). Our results show that oleuropein and hydroxytyrosol inhibit AKT, p38MAPK, and ERK1/2 phosphorylation, suggesting that they may inhibit a common upstream pathway such as trimeric G-protein activation or a protein tyrosine kinase activity. The inhibitory effect of oleuropein on AKT activation was reported also in hepatocellular

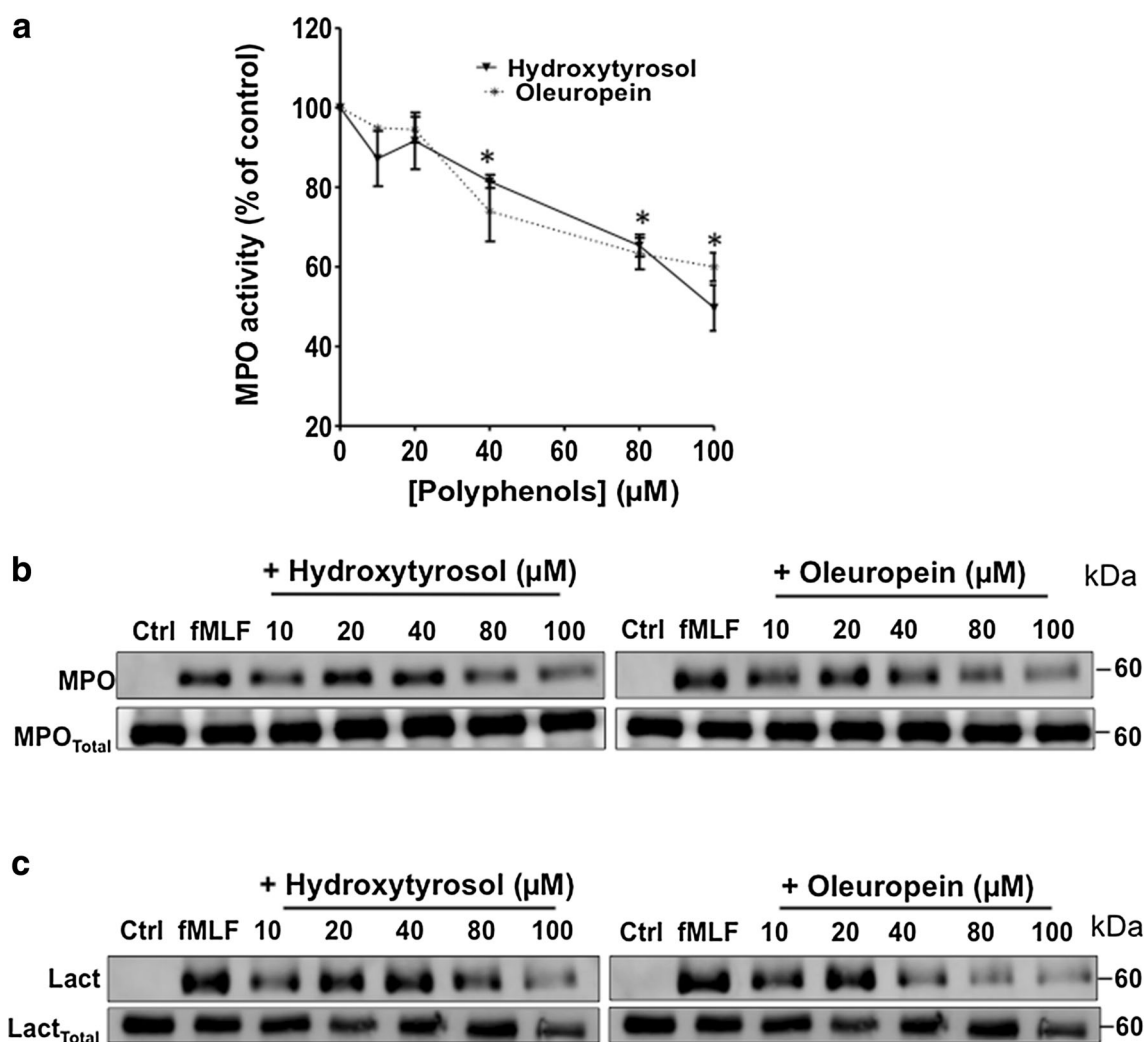


Fig. 3 Effect of hydroxytyrosol and oleuropein on the release of neutrophil azurophilic granules. Neutrophils were incubated without or with different concentrations of hydroxytyrosol or oleuropein, then treated with cytochalasin B and stimulated with fMLF (10^{-6} M). After centrifugation, the supernatants were recovered to measure MPO activity using a spectrophotometric method and expressed as %

of control (fMLF alone). Data are mean $\pm$ SEM of three separate experiments (* $P < 0.05$) (a). Equal amounts of supernatants (MPO- and Lact-upper blots) and total cell lysates (Total) were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis with anti-MPO (b) or anti-lactoferrin (Lact) antibody (c). Representative of three different experiments

carcinoma (Yan et al. 2015; Liu et al. 2016) and PI3Kinase was suggested to be the target. However, it is unknown whether oleuropein and hydroxytyrosol can directly inhibit the activation of AKT. More work is required to identify the exact target of oleuropein and hydroxytyrosol on the signaling pathways involved in neutrophil activation.

Conclusion

The absorption of olive oil polyphenols has been studied by several groups. Oleuropein and hydroxytyrosol are hydrolyzed and absorbed in the intestinal tract in a dose-

dependent manner, and they can reach high concentrations. However, the regular intake of these compounds may provide an effective concentration in blood and improve their effects on cells. In addition, the low cost and low toxicity of olive polyphenols make their use as immune-modulating and anti-inflammatory molecules which is a promising therapy for inflammatory diseases, especially as we demonstrate that their activity is not just limited to their ROS scavenging effect, but may also involve the dampening of neutrophil degranulation and chemotaxis, two major neutrophil pro-inflammatory functions.

Fig. 4 Effect of hydroxytyrosol and oleuropein on neutrophils chemotaxis. Neutrophils (100×10^6 cell/ml) were pretreated with increasing concentrations of hydroxytyrosol (Hy) or oleuropein (Ole). Treated cells ($5 \mu\text{l}$) with or without (control) agents were added in the central well, $5 \mu\text{l}$ of the chemoattractant fMLF (10^{-7} M) or buffer PBS were placed in the other wells, and the plates were incubated for 120 min at 37°C . Migration was determined using a ZEISS microscope. A representative experiment showing neutrophil migration towards fMLF (a). The chemotaxis index was determined as the ratio of the migrated distance of cells with hydroxytyrosol or oleuropein towards FMLF over the migration to fMLF alone. Data are mean $\pm$ SEM of four separate experiments (** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$) (b)

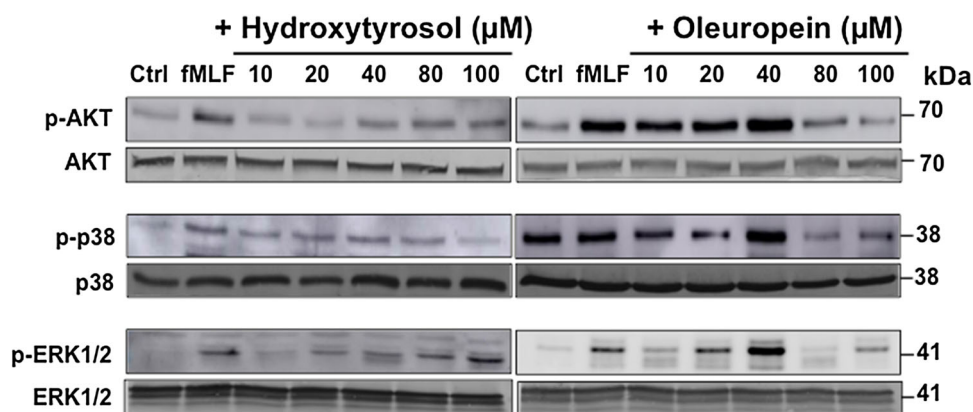
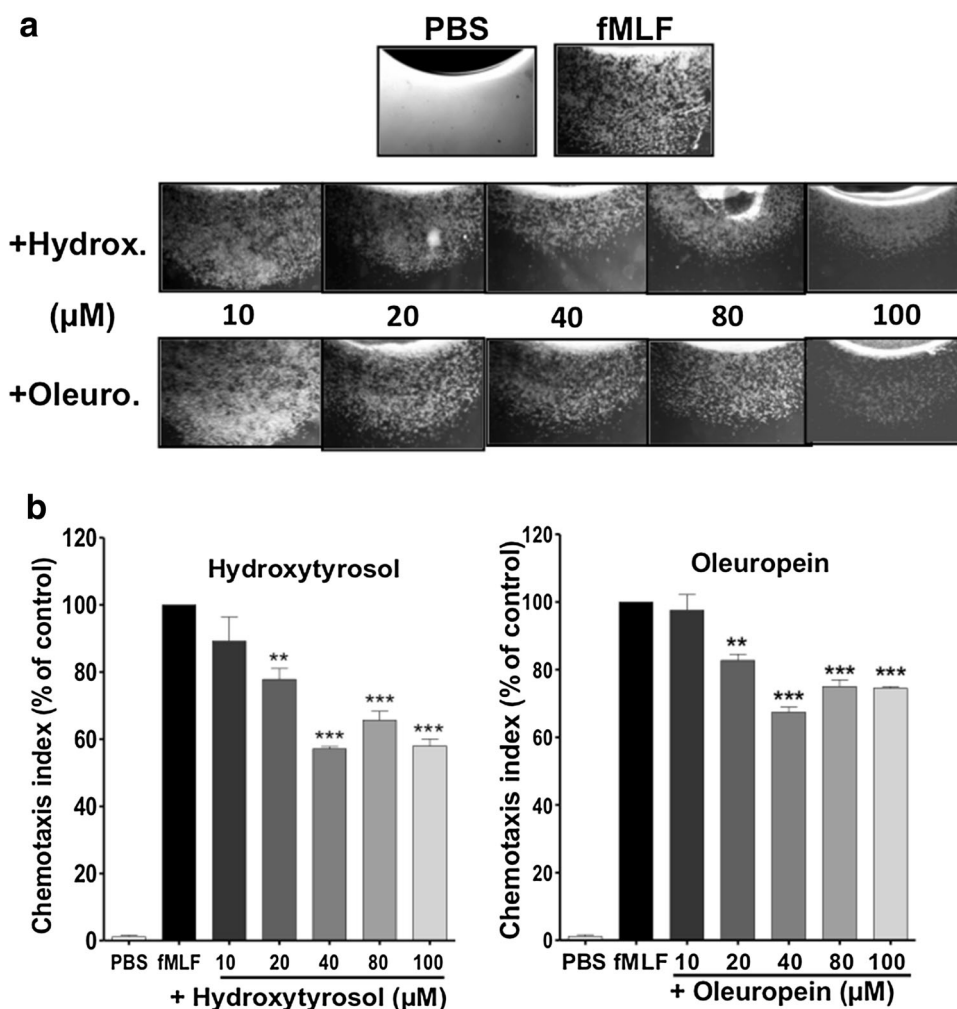


Fig. 5 Effect of hydroxytyrosol and oleuropein on fMLF-induced phosphorylation of AKT, p38MAPK, and ERK1/2 in human neutrophils. Neutrophils (5×10^6 in $400 \mu\text{l}$) of HBSS were pre-incubated with increasing concentrations of hydroxytyrosol and oleuropein at 37°C for 60 min, before stimulation with fMLF

(10^{-6} M) for 2 min. The reaction was stopped by adding $5 \times$ Laemmli sample buffer and proteins were denatured. Samples were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis with anti-phospho-AKT (*p*-AKT), *p*-p38, *p*-ERK1/2, AKT, p38, and ERK1/2 antibodies. Representative of three different experiments

Acknowledgements This research was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Labex-INFLAMEX, University Denis-Diderot Paris7 and Vaincre La Mucoviscidose (VLM). The authors thank Martine Torres, Ph.D. for her critical leasing of the manuscript and editorial help.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no competing conflict of interest.

References

- Andreadou I, Benaki D, Efentakis P, Bibli SI, Milioni AI, Papachristodoulou A, Zoga A, Skaltsounis AL, Mikros E, Iliodromitis EK (2015) The natural olive constituent oleuropein induces nutritional cardioprotection in normal and cholesterol-fed rabbits: comparison with preconditioning. *Planta Med* 81:655–663
- Babior BM (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109:33–44
- Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, Balsano C (2014) Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J Mol Sci* 15:18508–18524
- Bedouhene S, Hurtado-Nedelec M, Sennani N, Marie JC, El-Benna J (2014) Polyphenols extracted from olive mill wastewater exert a strong antioxidant effect in human neutrophils. *Int J Waste Resour* 4:161
- Belambri SA, Dang PM, El-Benna J (2014) Evaluation of p47phox phosphorylation in human neutrophils using phospho-specific antibodies. *Methods Mol Biol* 1124:427–433
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G (1982) Measurement of cutaneous inflammation; estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78:206–209
- Brazil JC, Parkos CA (2016) Pathobiology of neutrophil-epithelial interactions. *Immunol Rev* 273:94–111
- El-Benna J, Dang PM (2007) Analysis of protein phosphorylation in human neutrophils. *Methods Mol Biol* 412:85–96
- El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie JC, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PM (2016) Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev* 273:180–193
- Facchini A, Cetrullo S, D'Adamo S, Guidotti S, Minguzzi M, Facchini A, Borzi RM, Flamigni F (2014) Hydroxytyrosol prevents increase of osteoarthritis markers in human chondrocytes treated with hydrogen peroxide or growth-related oncogene α . *PLoS One* 9:e109724
- Faurschou M, Borregaard N (2003) Neutrophils granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 14:1317–1327
- Futosi K, Mócsai A (2016) Tyrosine kinase signaling pathways in neutrophils. *Immunol Rev* 273:121–139
- Giner E, Recio MC, Rios JL, Cerdá-Nicolás JM, Giner RM (2016) Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice. *Mol Nutr Food Res* 60:242–255
- Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P (2002) An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* 159:91–102
- Impellizzeri D, Esposito E, Mazzone E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Morittu VM, Procopio A, Britti D, Cuzzocrea S (2011) The effects of oleuropein aglycone, an olive oil compound, in a mouse model of carrageenan-induced pleurisy. *Clin Nutr* 30:533–540
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Liu M, Wang J, Huang B, Chen A, Li X (2016) Oleuropein inhibits the proliferation and invasion of glioma cells via suppression of the AKT signaling pathway. *Oncol Rep* 36:2009–2016
- Nauseef WM (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 219:88–102
- Nauseef WM, Borregaard N (2014) Neutrophils at work. *Nat Immunol* 15:602–611
- Nelson RD, Quie PG, Simmons RL (1975) Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Immunol* 115:1650–1656
- Nordenfelt P, Tapper H (2011) Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol* 90:271–284
- O'Dowd Y, Driss F, Dang PM, Elbim C, Gougerot-Pocidalo MA, Pasquier C, El-Benna J (2004) Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 68:2003–2008
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H (2000) Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol* 1:107–112
- Paige L (2006) Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2:98–108
- Richard N, Arnold S, Hoeller U, Kilpert C, Wertz K, Schwager J (2011) Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta medica* 77(17):1890–189734
- Rosignoli P, Fuccelli R, Fabiani R, Servili M, Morozzi G (2013) Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes. *J Nutr Biochem* 24:1513–1519
- Tan SY, Weninger W (2016) Neutrophil migration in inflammation: intercellular signalrelay and crosstalk. *Curr Opin Immunol* 44:34–42
- Tuck KL, Hayball PJ (2002) Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem* 13:636–644
- Visioli F, Bernardini E (2011) Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Curr Pharm Des* 17:786–804
- Visioli F, Bellomo G, Galli C (1998) Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 247:60–64
- Visioli F, Poli A, Galli C (2002) Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev* 22:65–75
- Waterman E, Lockwood B (2007) Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev* 12:331–342
- Yan CM, Chai EQ, Cai HY, Miao GY, Ma W (2015) Oleuropein induces apoptosis via activation of caspases and suppression of phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B pathway in HepG2 human hepatoma cell line. *Mol Med Rep* 11:4617–4624
- Zhang X, Cao J, Jiang L, Zhong L (2009) Suppressive effects of hydroxytyrosol on oxidative stress and nuclear Factor-kappaB activation in THP-1 cells. *Biol Pharm Bull* 32:578–582

Original Article

Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils

Samia Bedouhène^{1,2,3}, Farida Moulti-Mati³, Margarita Hurtado-Nedelec^{1,2,4}, Pham My-Chan Dang^{1,2}, Jamel El-Benna^{1,2}

¹INSERM-U1149, CNRS-ERL8252, Centre de Recherche sur l'Inflammation, Paris, France; ²Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire d'Excellence Inflamex, DHU FIRE, Faculté de Médecine, Site Xavier Bichat, Paris, France; ³Laboratoire de Biochimie Analytique et de Biotechnologie, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algeria; ⁴Département d'Immunologie et d'Hématologie, UF Dysfonctionnements Immunitaires, HUPNVS, Hôpital Bichat, Paris, France

Received April 21, 2017; Accepted June 14, 2017; Epub July 25, 2017; Published July 30, 2017

Abstract: Reactive oxygen species (ROS) are produced by numerous biological systems and by several phagocytes such as neutrophils and macrophages. ROS include mostly superoxide anion, hydrogen peroxide, singlet oxygen and hydroxyl radical, which are involved in a variety of biological processes such as immunity, inflammation, apoptosis and cell signaling. Thus, there is a need for a sensitive and reliable method to measure ROS. The luminol-amplified chemiluminescence technique is widely used to measure ROS production by neutrophils; however, it is unclear which ROS species are detected by this technique. In this study, we show that Xanthine/Xanthine oxidase (XXO), a known superoxide-producing system, stimulated a luminol-amplified chemiluminescence in the absence of horseradish peroxidase (HRPO), while the presence of HRPO enhanced the response. Both reactions were inhibited by superoxide dismutase (SOD), but not by catalase, confirming that superoxide anion, and not hydrogen peroxide, is the species oxidizing luminol to produce chemiluminescence. Glucose/Glucose oxidase (GGO), a known hydrogen peroxide-producing system, did not induce luminol-amplified chemiluminescence in the absence of HRPO; however, addition of HRPO resulted in a chemiluminescence response, which was inhibited by catalase, but not by SOD. Myeloperoxidase (MPO), isolated from human neutrophils, was also able to enhance the superoxide- and hydrogen peroxide-dependent luminol-amplified chemiluminescence. The production of ROS by stimulated human neutrophils was detected by luminol-amplified chemiluminescence, which was only partially inhibited by SOD and catalase. Interestingly, adding HRPO to stimulated neutrophils increased the luminol-amplified chemiluminescence, which was strongly inhibited by SOD, but not by catalase. These results show that (a) luminol-amplified chemiluminescence is able to detect superoxide anion in the absence of peroxidases, but not hydrogen peroxide; (b) in the presence of peroxidases, luminol-amplified chemiluminescence is able to detect both superoxide anion and hydrogen peroxide; and (c) luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by neutrophils, especially in the presence of HRPO.

Keywords: ROS, superoxide anion, hydrogen peroxide, luminol-amplified chemiluminescence, neutrophils

Introduction

Production of reactive oxygen species (ROS) by phagocytes such as neutrophils, monocytes and macrophages is essential for host defense against pathogens [1-3]. This is demonstrated by the genetic disease, chronic granulomatous disease (CGD) where patients suffering from this disease have recurrent infections because their phagocytes are unable to produce ROS, and thus cannot kill and eliminate pathogens [4, 5].

The phagocyte NADPH oxidase (NOX2) is responsible for the production of superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) [2, 6], which generates hydrogen peroxide (H_2O_2) in the presence of protons. H_2O_2 reacts with $O_2^{\bullet -}$ to form hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) [2, 6, 7], and is used by myeloperoxidase to produce hypochlorous acid (HOCl) [1, 7], a powerful killing agent. NOX2 is composed of two membrane proteins (gp91phox, p22phox) and four cytosolic proteins (p47phox, p67phox, p40phox and the small GTPase Rac1/2) that assemble with activation [6, 8]. Although the

Superoxide anion detection by chemiluminescence

physiological ROS production is important for innate immunity, excessive phagocyte activation releasing excessive ROS can induce oxidative stress and damage membrane lipids, DNA and proteins, leading to cell death and tissue injury [9-12]. ROS are known to be involved in numerous pathologies, notably inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases (IBD), atherosclerosis, diabetes, neurodegenerative diseases, cancer, and during the aging process [13-15].

A large number of methods have been developed for measure ROS production, which are based on detection by colorimetry, fluorescence or chemiluminescence, depending on the probe used [16-20]. The ideal technique should be highly sensitive, specific for one ROS species, and should not interfere with cellular functions. Among these techniques, luminol-amplified chemiluminescence has been largely used to detect ROS production [16-19]. Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione) is a redox-sensitive compound that emits blue luminescence when oxidized. This technique has been reported to be peroxidase-dependent and to detect all ROS species. It has the advantages to be very sensitive and to detect both intra- and extra-cellular ROS as it can diffuse into cells.

To better understand the ROS species that are detected by luminol-amplified chemiluminescence, we first used *in vitro* known systems that can specifically generate superoxide anion or hydrogen peroxide, and compared the chemiluminescence response in the presence of different enzymes known to interact with ROS. We then used the same approach with neutrophils stimulated to produce ROS. We report here that luminol is mainly oxidized by superoxide anion.

Methods

Reagents

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione), xanthine (X), xanthine oxidase (XO), SOD, human leukocyte MPO (EC 1.7.1.11), HRPO, diisopropyl fluoro phosphate (DFP), Ficoll, Dextran, cytochrome c, trypan blue, Dulbecco's Phosphate-buffered saline (PBS), Hanks' balanced salt solution (HBSS), 4-phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) were all purchased

from Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Solutions were prepared by dilution in phosphate-buffered saline (PBS) immediately before use.

Isolation of human neutrophils

Neutrophils were isolated from heparinized venous fresh blood from healthy volunteers using Dextran (T500) to remove red blood cells, followed by centrifugation over Ficoll-Paque to remove mononuclear cells, and hypotonic lysis to remove any remaining contaminating red blood cells [21, 22]. The neutrophils were washed in PBS by centrifugation and suspended in the same buffer.

Purification of MPO-rich azurophilic granules

Neutrophils were treated with DFP, a protease inhibitor, and were lysed by nitrogen cavitation. Granules were isolated by Percoll gradient using standard techniques [23]. Azurophilic granules were lysed in and the resulting solubilized content used in the chemiluminescence assay [24].

Cytochrome c reduction assay

Xanthine-xanthine oxidase (XXO)-derived superoxide production was determined in 1 mL PBS pH 7.4 containing xanthine (100 μ M) and xanthine oxidase (10 mU) in the presence of cytochrome c (1 mg/mL) and with or without SOD or catalase. Glucose (5 mM) and Glucose oxidase (2.5 mU) (GGO) were used to produce hydrogen peroxide and assayed similarly. Superoxide anion production was determined by measuring ferricytochrome c reduction with a UVIKON 860 spectrophotometer at 550 nm over 10 min. For the neutrophils, cells (1×10^6) were pre-incubated 10 min at 37°C with cytochrome c (1 mg/mL) in PBS, and were then stimulated with PMA (100 ng/ml) at 37°C, with or without SOD or catalase. Superoxide anion production was determined as above [25].

Luminol-amplified chemiluminescence assay

Superoxide anion and hydrogen peroxide were produced by the XXO and GGO systems, respectively, as described above. Chemiluminescence was evaluated with a luminometer (Auto Lumat LB953 model, EG & G Berthold), where light emission was recorded in c.p.m (counted pho-

Superoxide anion detection by chemiluminescence

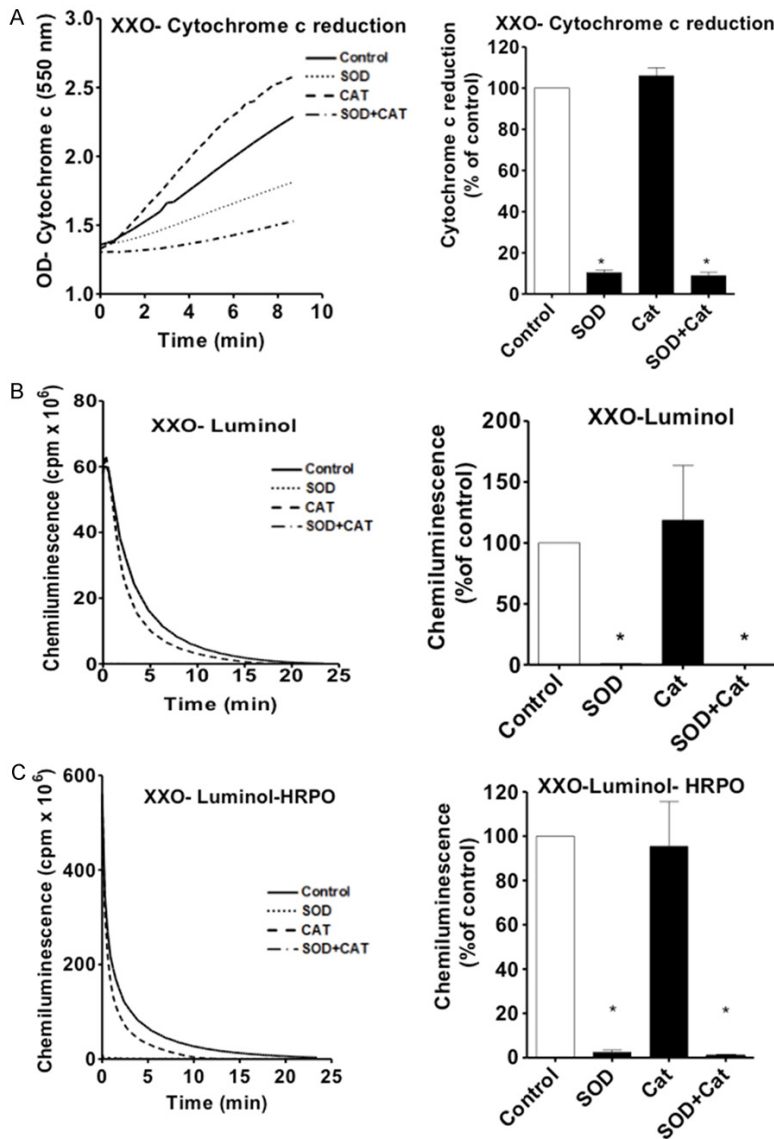


Figure 1. Production of superoxide anion by the xanthine-xanthine oxidase (XXO) system and detection by different methods. XXO-derived superoxide production was determined in 1 mL PBS containing xanthine (100 μ M) and xanthine oxidase (10 mU) in the presence of cytochrome c (A), luminol (10 μ M) alone (B) or luminol and HRPO (5 mU) (C). Absorbance of reduced cytochrome c and luminol-amplified chemiluminescence were measured over 15 min. When indicated SOD (30 mU) or catalase (186 mU) or both were added before starting the reaction. Left panels show one representative experiment and right panels show a quantification analysis of 5 experiments. Results are expressed as means $\pm$ SEM; n=5, *P<0.01.

tons per minute) during 30 min at 37°C [25, 26]. Neutrophils ($5 \times 10^5/0.5$ ml) were suspended in HBSS in the presence of luminol (10 μ M) for 10 min at 37°C. Cells were then stimulated with PMA (100 ng/ml), with or without HRPO (5 mU), SOD (30 mU) or catalase

(186 mU). Chemiluminescence was measured as above.

Statistical analyses

Statistical analyses between were performed using one-way ANOVA test with Tukey's Multiple Comparison post-test. *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001 values were considered as significant.

Results

Superoxide anion is detected by luminol-amplified chemiluminescence in the absence or presence of HRPO

We first used Xanthine-xanthine oxidase (XXO) to produce superoxide anion and different assays to detect its production. As expected, XXO was able to induce the reduction of cytochrome c at 550 nm, and SOD inhibited this reaction and not catalase (Figure 1A). XXO was also able to induce a luminol-amplified chemiluminescence response in the absence of HRPO (Figure 1B). Surprisingly, the presence of HRPO enhanced the chemiluminescence response by approx. 10 fold (Total ROS production: $1.83 \pm 0.22 \times 10^8$ cpm with luminol alone compared to $17.99 \pm 0.55 \times 10^8$ cpm with luminol + HRPO, n=5, P<0.01) (Figure 1C). Interestingly, luminol-amplified chemiluminescence in the absence or presence of HRPO

was inhibited by SOD, but not by catalase, confirming that superoxide anion, and not hydrogen peroxide, is responsible for luminol oxidation in these reactions. These results show that superoxide anion alone is able to induce a luminol-dependent chemiluminescence response,

Superoxide anion detection by chemiluminescence

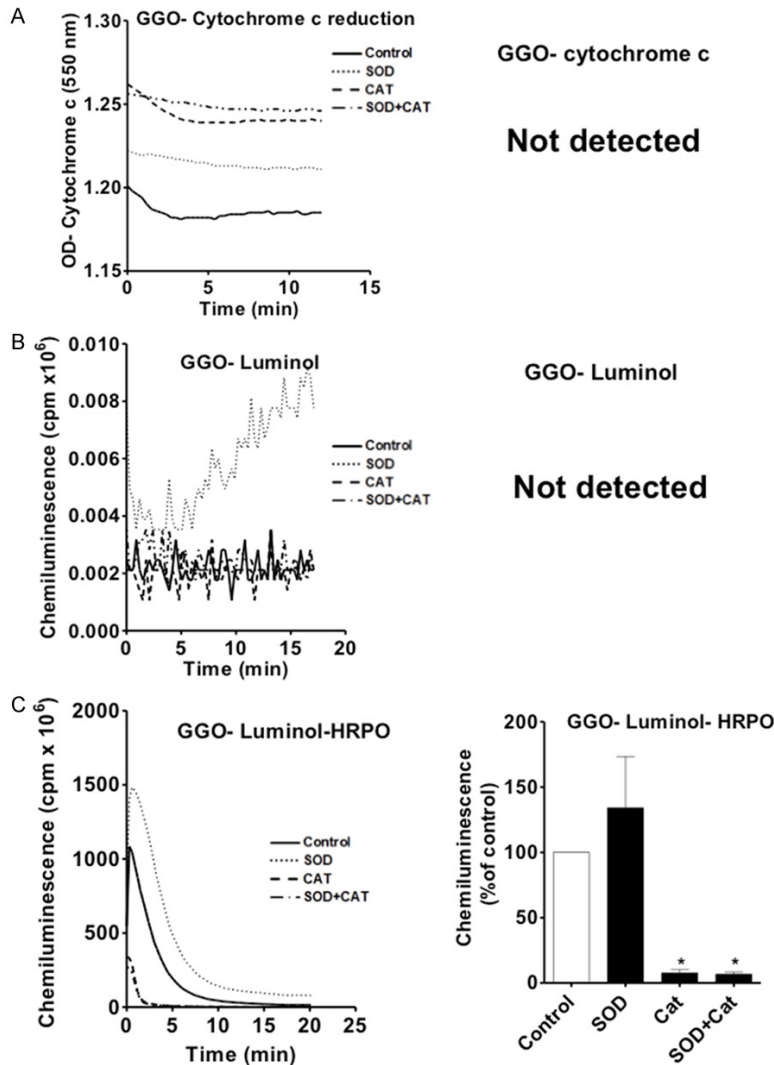


Figure 2. Production of hydrogen peroxide by the glucose-glucose Oxidase (GGO) and detection by different methods. GGO-derived hydrogen peroxide production was determined in 1 mL PBS containing glucose (5 mM) and GGO (2.5 mU) in the presence of cytochrome c (A) luminol (10 μ M) alone (B), or luminol and HRPO (5 mU) (C). Absorbance of reduced cytochrome c and luminol-amplified chemiluminescence were measured over 15 min. When indicated SOD (30 U) or catalase (186 U) or both were added before starting the reaction. Left panels show one representative experiment and right panels show a quantification analysis of 5 experiments. Results are expressed as means $\pm$ SEM; n=5, *P<0.01.

and that HRPO enhances this reaction independently of H₂O₂.

Hydrogen peroxide is detected by luminol-amplified chemiluminescence only in presence of HRPO

We next used Glucose-Glucose oxidase (GGO) to produce hydrogen peroxide, which did not reduce cytochrome c, as expected (Figure 2A).

In the absence of HRPO, GGO did not oxidize luminol (Figure 2B), but was able to induce a chemiluminescence response when HRPO was added to the reaction (Figure 2C). This reaction was inhibited by catalase, but not by SOD, confirming that hydrogen peroxide, and not superoxide anion, reacts with HRPO to oxidize the luminol. The same results were obtained using commercial hydrogen peroxide (data not shown). Thus, hydrogen peroxide alone cannot induce a luminol-amplified chemiluminescence signal, contrary to superoxide anion, and HRPO is required for hydrogen peroxide-induced chemiluminescence.

The neutrophil MPO is able to use superoxide anion as well as hydrogen peroxide to generate luminol-dependent chemiluminescence

As HRPO induced the amplification of superoxide and hydrogen peroxide chemiluminescence signals, we wanted to check if another peroxidase, i.e., the neutrophil MPO, had the same effect. Results show that MPO present in azurophilic granules enhanced the superoxide-dependent chemiluminescence response generated by XXO (Total ROS production: $1.77 \pm 0.42 \times 10^8$ cpm with luminol alone as compared

to $14.59 \pm 0.32 \times 10^8$ cpm with luminol + MPO, n=5, P<0.01). The luminol and MPO-amplified chemiluminescence was inhibited by SOD, but not catalase, confirming the role of superoxide anion (Figures 1B and 3A). The GGO system generated a chemiluminescence response only in the presence of MPO, and this reaction was inhibited by catalase, but not by SOD, confirming the role of hydrogen peroxide (Figures 2B and 3B). These results show that MPO is able

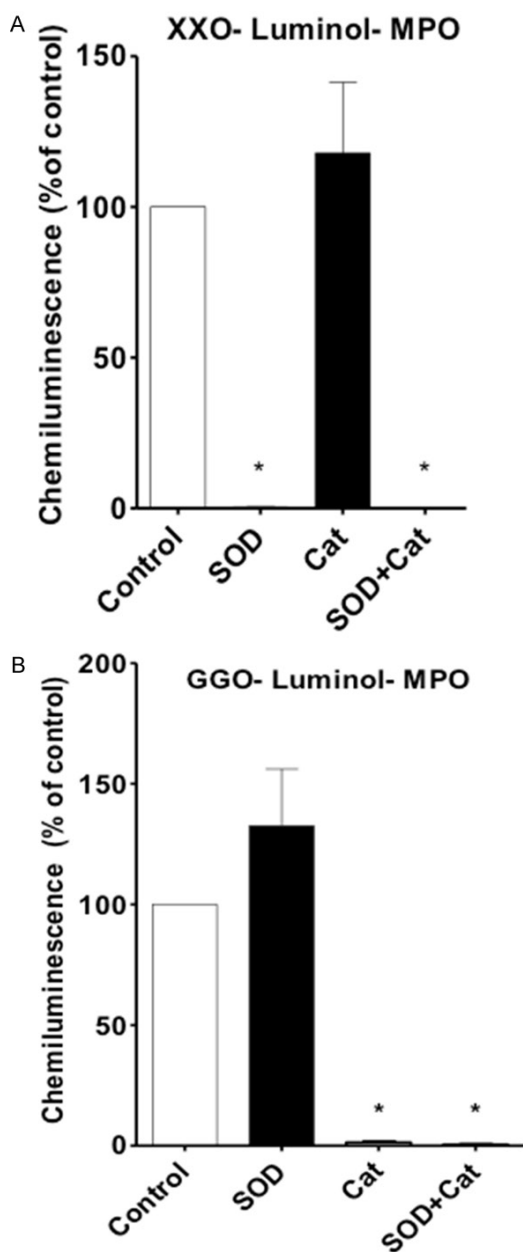


Figure 3. Human MPO is able to enhance superoxide anion-dependent chemiluminescence. XXO-derived superoxide production was determined in 1 mL PBS containing xanthine (100 μ M) and xanthine oxidase (10 mU) in the presence of luminol (10 μ M) alone or luminol and MPO-containing granules, and chemiluminescence was measured during 15 min, total chemiluminescence of each condition was quantified and compared to control (A). GGO-derived hydrogen peroxide production was determined in 1 mL PBS containing glucose (5 mM) and GGO (2.5 mU) in the presence of luminol (10 μ M) alone or luminol and MPO-containing granules, and chemiluminescence was measured during 15 min, total chemiluminescence of each condition was quantified and compared to control (B). When indicated SOD (30 mU) or catalase (186 mU) or both were added before starting the reaction. Results are expressed as means $\pm$ SEM; $n=5$, * $P<0.01$.

to use superoxide anion or hydrogen peroxide to generate a luminol-amplified chemiluminescence response.

Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide produced by neutrophils

We then used the same techniques to assess neutrophil ROS production. As expected, PMA-activated neutrophils induced the reduction of cytochrome c, which was inhibited by SOD, but not by catalase (**Figure 4A**). On the other hand, both SOD and catalase inhibited the chemiluminescence generated by PMA-activated neutrophils (**Figure 4B**). The SOD inhibition was greater than the catalase inhibition, suggesting that mainly superoxide anion produced by neutrophils oxidized the luminol to generate a chemiluminescence response. Interestingly, HRPO enhanced the chemiluminescence response, which was only inhibited by SOD, but not by catalase (**Figure 4C**). Thus, in the presence of HRPO, the luminol-amplified chemiluminescence assay mainly detects superoxide anion when produced by neutrophils.

Discussion

Luminol-amplified chemiluminescence has been widely used for the detection of ROS produced by a variety of cells and enzyme systems. However, the exact nature of the ROS species detected by this technique is not entirely clear. In this study, we used different approaches to answer this question, such as enzymes known to produce a given type of ROS species (XXO for superoxide anion and GGO for hydrogen peroxide), and enzymes known to specifically catabolize them (SOD for superoxide anion and catalase for hydrogen peroxide) in order to compare the signals generated with the luminol-amplified chemiluminescence. The results presented here revealed that luminol-amplified chemiluminescence is able to detect superoxide anion in the absence of peroxidases, while in the presence of peroxidases, both superoxide anion and hydrogen peroxide were detected by the assay. Notably, both HRPO and MPO peroxidases enhanced the superoxide-dependent luminol-amplified chemiluminescence.

It was believed for a long time that chemiluminescence with luminol is mainly due to the reaction of hydrogen peroxide with the MPO present in phagocytes [27, 28]. Because of the complexity of the ROS reactions, we first used cell-free enzyme systems to produce a given

Superoxide anion detection by chemiluminescence

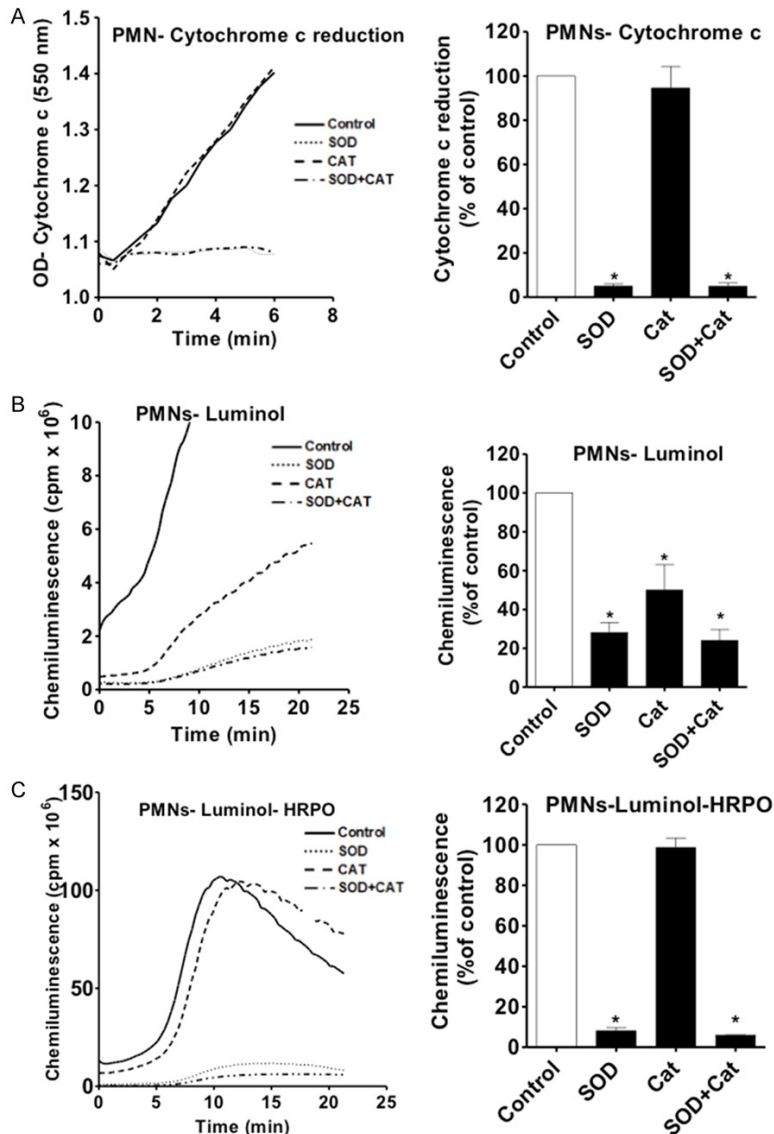


Figure 4. Superoxide and hydrogen peroxide production by neutrophils measured by different approaches. Neutrophils (10^6 cells in 1 ml) were pre-incubated for 10 min at 37°C with cytochrome c (1 mg/ml) in HBSS, and stimulated with PMA (100 ng/ml) with or without SOD (30 U) or/and catalase (186 U). Reduction of cytochrome c was determined by measuring the OD at 550 nm using a UVIKON 860 spectrophotometer at 550 nm (A). Neutrophils (10^6 cells) were re-suspended in 0.5 ml HBSS in the presence of luminol (10 μM) for 10 min at 37°C . Cells were stimulated with PMA (100 ng/ml), without (B) or with HRPO (5 mU) (C), and chemiluminescence was measured. Where indicated SOD (30 mU) or/and catalase (186 mU) were added before starting the reaction. Left panels show one representative experiment and right panels show a quantification analysis of 5 experiments. Results are expressed as means $\pm$ SEM; $n=5$, $*P<0.01$.

type of ROS species. The XXO system, known to produce superoxide anion, was able to generate a chemiluminescence signal in the absence of peroxidases; however, HRPO and MPO did enhance this signal. This chemiluminescence

was not due to hydrogen peroxide, which is generated via superoxide anion dismutation, as SOD, but not catalase, inhibited this signal. In addition, hydrogen peroxide alone, produced by GGO, could not generate a chemiluminescence signal, indicating that the presence of peroxidases is absolutely required for hydrogen peroxide to oxidize luminol and generate chemiluminescence. These results also suggest that HRPO and MPO can use both superoxide anion or hydrogen peroxide as substrate.

Interestingly, when using PMA-stimulated human neutrophils, luminol-amplified chemiluminescence was inhibited by SOD and to a lesser extent by catalase. As superoxide anion does not diffuse from the site of production, and added SOD is extracellular, the results obtained in the presence of SOD suggest that the superoxide anion produced by stimulated neutrophils was mainly released extracellularly. The ROS portion that was SOD-insensitive may be due to the superoxide anion produced intracellularly as luminol can cross the plasma and granules membranes and detect intracellular ROS production, or to the extracellular MPO/ H_2O_2 reaction as intracellular hydrogen peroxide can diffuse extracellularly. Interestingly, the addition of extracellular HRPO enhanced the luminol-amplified chemiluminescence response and SOD almost completely inhibited this reaction without any effect of catalase. This observation was also reported by Lundqvist and Dahlgren using isoluminol, which only detects extracellular ROS [29].

The SOD-inhibitable cytochrome c reduction technique has been the standard assay to measure superoxide production, especially by stimulated neutrophils, and it has the advantages to be specific for extracellular superoxide anion and quantitative [20]. However, this assay is not very sensitive, and thus cannot be used to measure superoxide anion in systems producing low levels of ROS, such as with the other members of the NOX family, unless using cumulative end point measurements. In contrast, the SOD-inhibitable luminol-amplified chemiluminescence (with or without HRPO) is very sensitive and can be used as a NOX assay. Another advantage of the luminol is that it is not toxic and can be used *in vivo* to measure superoxide anion and hydrogen peroxide in different pathological models [30-32]. Contrary to the cytochrome c-reduction assay, luminol-amplified chemiluminescence does not reflect the exact amount of superoxide anion produced, as luminol by itself can generate this molecule [33].

In summary, the luminol-amplified chemiluminescence assay is very easy to use and is a high sensitivity method. Luminol is also cost effective compared to cytochrome c. Thus, luminol-amplified chemiluminescence can be used to specifically detect superoxide anion in the absence of peroxidases such as HRPO and MPO. However, in the presence of peroxidases, luminol-amplified chemiluminescence is even more sensitive, but SOD and catalase must be used as controls to discriminate between superoxide anion and hydrogen peroxide as the luminol oxidizing agent.

Acknowledgements

This research was supported by INSERM, CNRS, Labex INFLAMEX, University Denis-Diderot Paris7 and VLM (Vaincre La Mucoviscidose). The authors wish to thank Dr. Martine Torres for her editorial help.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Dr. Jamel El-Benna, INSERM-U1149, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 Rue Henri Huchard, Paris F-75018, France. Tel: 33 1 57 27 77 23; E-mail: jamel.elbenna@inserm.fr

References

- [1] Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 2007; 219: 88-102.
- [2] El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multi-component enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53: 199-206.
- [3] Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014; 15: 602-11.
- [4] Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, Avcin T, de Boer M, Bustamante J, Condino-Neto A, Di Matteo G, He J, Hill HR, Holland SM, Kannengiesser C, Köker MY, Kondratenko I, van Leeuwen K, Malech HL, Marodi L, Nunoi H, Stasia MJ, Ventura AM, Witwer CT, Wolach B, Gallin JI. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis* 2010; 45: 246-65.
- [5] Kannengiesser C, Gérard B, El Benna J, Henri D, Kroviarski Y, Chollet-Martin S, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C, Grandchamp B. Molecular epidemiology of chronic granulomatous disease in a series of 80 kindreds: identification of 31 novel mutations. *Hum Mutat* 2008; 29: E132-49.
- [6] Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464-76.
- [7] Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998; 12: 3007-17.
- [8] Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 2005; 386: 401-16.
- [9] Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C246-56.
- [10] Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 153-64.
- [11] Ben-Mahdi MH, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, O'Dowd Y, El-Benna J, Pasquier C. Xanthine oxidase-derived ROS display a biphasic effect on endothelial cells adhesion and FAK phosphorylation. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 9346242.
- [12] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- [13] Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109: 33-44.

Superoxide anion detection by chemiluminescence

- [14] Segel GB, Halterman MW, Lichtman MA. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 359-72.
- [15] El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie JC, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PM. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev* 2016; 273: 180-93.
- [16] Edwards SW. The O-2 generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. *Methods* 1996; 9: 563-77.
- [17] Freitas M, Lima JL, Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal Chim Acta* 2009; 649: 8-23.
- [18] Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232:3-14.
- [19] Nauseef WM. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840: 757-67.
- [20] Nauseef WM. Identification and quantitation of superoxide anion: essential steps in elucidation of the phagocyte "respiratory burst". *J Immunol* 2014; 193: 5357-8.
- [21] El Benna J, Dang PM, Andrieu V, Vergnaud S, Dewas C, Cachia O, Fay M, Morel F, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA. P40phox associates with the neutrophil Triton X-100-insoluble cytoskeletal fraction and PMA-activated membrane skeleton: a comparative study with P67phox and P47phox. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 1014-20.
- [22] El-Benna J, Dang PM. Analysis of protein phosphorylation in human neutrophils. *Methods Mol Biol* 2007; 412: 85-96.
- [23] Clemmensen SN, Udby L, Borregaard N. Subcellular fractionation of human neutrophils and analysis of subcellular markers. *Methods Mol Biol* 2014; 1124: 53-76.
- [24] Bachoual R, Talmoudi W, Boussetta T, Braut F, El-Benna J. An aqueous pomegranate peel extract inhibits neutrophil myeloperoxidase in vitro and attenuates lung inflammation in mice. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1224-8.
- [25] Hurtado-Nedelec M, Makni-Maalej K, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PM, El-Benna J. Assessment of priming of the human neutrophil respiratory burst. *Methods Mol Biol* 2014; 1124: 405-12.
- [26] Boussetta T, Gougerot-Pocidalo MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, Bournier O, Kroviarski Y, Zhou XZ, Malter JS, Lu PK, Bartegi A, Dang PM, El-Benna J. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF-alpha-induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood* 2010; 116: 5795-802.
- [27] Briheim G, Stendahl O, Dahlgren C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1984; 45: 1-5.
- [28] Ushijima Y, Totsune H, Nishida A, Nakano M. Chemiluminescence from human polymorphonuclear leukocytes activated with opsonized zymosan. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 401-9.
- [29] Lundqvist H, Dahlgren C. Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 785-92.
- [30] Botz B, Bölcskei K, Kereskai L, Kovács M, Németh T, Szigeti K, Horváth I, Máthé D, Kovács N, Hashimoto H, Reglődi D, Szolcsányi J, Pintér E, Mócsai A, Helyes Z. Differential regulatory role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 2739-50.
- [31] Gross S, Gammon ST, Moss BL, Rauch D, Harding J, Heinecke JW, Ratner L, Piwnica-Worms D. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat Med* 2009; 15: 455-61.
- [32] Chen WT, Tung CH, Weissleder R. Imaging reactive oxygen species in arthritis. *Mol Imaging* 2004; 3: 159-62.
- [33] Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 995-1022.