



MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies

Présenté par :

M^{elle} NADOUR Malika

SUJET :

**Mise en évidence de quelques propriétés
anti-oxydantes des polyphénols extraits
de l'olive, variété *chamlal***

Devant le jury :

- M ^r MATI ABDERRAHMANE	Professeur	UMMTO	Président
- M ^{me} MATI-MOULTI FARIDA	Maître de conférences, A	UMMTO	Rapporteur
- M ^r RIAZI ALI	Professeur	UMAB	Examineur
- M ^r MOUSSAOUI RAMDANE	Maître de conférences, A	UMMTO	Examineur
- M ^r AMROUCHE TAHAR	Maître de conférences, A	UMMTO	Examineur

Soutenu : Novembre 2010

Remerciements

Je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance à M^{me} Mati F., Maître de conférences à l'UMMTO, pour avoir encadré ce travail. Je la remercie pour sa rigueur scientifique, ses conseils et ses orientations ainsi que pour ses qualités relationnelles.

Je tiens à remercier particulièrement M^r Mati A., Professeur en Biochimie Appliquée à l'UMMTO, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et de mettre à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour mener à bien ce travail ainsi que pour ses qualités relationnelles. Je lui suis très reconnaissante aussi d'avoir accepté la présidence du jury.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail :

- M^r RIAZI A. Professeur à l'université de Mostaganem.,
- M^r MOUSSAOUI R. Maître de conférences à UMMTO.,
- M^r AMROUCHE T. Maître de conférences à UMMTO.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Ce travail est dédié à :

- ceux qui me sont très chers, ma mère et mon père, qui m'ont entouré par leur amour et soutenu tout au long de ces années d'études et qui m'ont toujours redonné confiance en moi et encouragé pour aller de l'avant. Je leur dis infiniment merci, et je les remercierai jamais assez.,
- mes chères sœurs et chers frères qui étaient là pour moi, je les remercie pour leurs soutiens sur tous les plans et les coûts de mains précieux qui m'ont toujours apporté.,
- toute la famille Nadour et Si-Ahmed.,
- mon fiancé M^r Belaid M et sa famille.
- mes amis et mes collègues de laboratoire qui m'ont soutenu au cours de la réalisation de ce travail.

Sommaire

SOMMAIRE

	Pages
Résumé	
Liste des figures et tableaux	
Abréviations	
Introduction	
1^{ère} Partie : Synthèse des données bibliographiques	
I- Caractéristiques générales des composés phénoliques.....	3
1.1 Classification et structure des composés phénoliques.....	3
1.1.1 Les principaux groupes de composés phénoliques	3
1.1.2 Les propriétés des composés phénoliques.....	6
1.1.3 L'alimentation et les polyphénols	7
1.1.4 La disponibilité biologique des composés phénoliques	7
1.1.5 Méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques	9
1.1.5.1 Méthodes d'extraction.....	9
1.1.5.2 Méthodes de quantification	10
1.1.5.3 Méthodes de fractionnement et d'identification.....	11
II- Les composés phénoliques de l'olive.....	11
2.1 Caractéristiques biologiques de l'olivier et de l'olive.....	11
2.1.1 L'olivier.....	11
2.1.2 Les caractéristiques du fruit : l'olive.....	11
2.2 Les composés phénoliques de l'olive et de ses produits dérivés.....	12
2.2.1 Les secoiridoïdes et leurs dérivés.....	12
2.2.2 Esters Phénoliques.....	16
2.2.3 Autres composés phénoliques	16
2.3 Le métabolisme des composés phénoliques de l'olive : Les secoiridoïdes.....	17
2.4 Les activités biologiques des composés phénoliques de l'olive et ses produits dérivés	17
III- Stress oxydant et système antioxydant	20
3.1 Radicaux libres	20
3.1.1 Définition	20
3.1.2 Nature et sources cellulaires.....	20
3.2 Systèmes de défenses antioxydants.....	21
3.2.1 Systèmes antioxydants enzymatiques	23
3.2.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques	24
3.3 Stress oxydatif	25
3.4 Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	26
3.4.1 Mesure de la déplétion en oxygène	26
3.4.2 Piégeage de radicaux libres	26
3.4.3 Mesure de la disparition du substrat.....	27
3.4.4 Mesure des produits d'oxydation.....	27
3.4.5 Autres méthodes	27
3.5 Les marqueurs biologiques du stress oxydatif	27
3.5.1 Mesure de radicaux libres	28
3.5.2 Mesure des systèmes anti-oxydants	28
3.5.3 Marqueurs de la peroxydation lipidique.....	28
3.5.4 Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés.....	30
3.5.5 Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques.....	30
3.6 Stress oxydant dans les globules rouges	31

3.6.1 Structure et organisation du globule rouge	31
3.6.2 Etat redox érythrocytaire	33
3.6.3 Systèmes de défense antioxydante du globule rouge	34

2^{ème} Partie: Partie expérimentale

I- Matériels et méthodes	35
1-1 Matériels	35
1.2 Méthodes	37
1.2.1 Extraction des composés phénoliques	37
1.2.2 Dosage des composés phénoliques totaux	39
1.2.3 Etude de l'activité antioxydante.....	39
1.2.3.1 Pouvoir réducteur	39
1.2.3.2 Capacité de piégeage d'espèces radicalaires	41
1.2.3.3 Etude sur un modèle cellulaire	43
1.2.3.3.1 Test d'hémolyse	43
1.2.3.3.2 Test de la peroxydation lipidique	45
1.2.3.3.3 Evaluation du stress oxydatif des protéines de la membrane érythrocytaire	47
1.2.4 Analyse statistique.....	52
II- Résultats et Discussion.....	53
2.1 Dosage de l'extrait phénolique total.....	53
2.2 Etude de l'activité anti-oxydante	54
2.2.1 Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium.....	54
2.2.2 Pouvoir réducteur par le test phosphomolybdenique	56
2.2.3 Test de piégeage du radical DPPH.....	61
2.2.4 Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	68
2.2.5 Résultats de l'étude sur les érythrocytes humains.....	72
2.2.5.1 Test de l'hémolyse	72
2.2.5.2 Test de la peroxydation lipidique	80
2.2.5.3 Evaluation de l'oxydation des protéines membranaires érythrocytaires.....	90

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Les composés phénoliques (CP) de l'olive font parti du régime méditerranéen connu pour ses effets bénéfiques sur la santé humaine. L'intérêt porté pour ces molécules s'explique par leurs propriétés antioxydantes.

L'objectif de ce travail est l'étude de quelques propriétés anti-oxydantes des composés phénoliques totaux extraits de la pulpe d'olives (CPO) variété *chamlal* ainsi que d'autres CP individuels (l'acide caféique (AC), l'acide gallique (AG), l'acide tannique (AT)). Les activités obtenues sont comparées à celle de la vitamine C (vit C).

Les résultats du dosage des CPO, indiquent la richesse de cette variété en CP ($1633 \pm 0,16$ mg d'équivalent en AG/100 g de pulpe).

Quelques mécanismes à la base de l'effet antioxydant des CPO ont été étudiés. Des méthodes testant l'activité réductrice ainsi que la capacité de piégeage d'espèces radicalaires (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)) ont été réalisées.

Les résultats montrent que les CPO présentent une activité de réduction du fer ($PR_{0,5AU} = 50,55 \pm 3,33 \mu\text{g/ml}$) plus élevée que celle de la vit C. La capacité de piégeage du radical DPPH par les CPO est supérieure ($EC_{50} = 12,60 \pm 0,20$ g/g de DPPH•) à celle de la vit C. Il en est de même pour l'activité de piégeage du H_2O_2 à certaines concentrations.

Ces propriétés antioxydantes des CPO ont été également testées sur un modèle cellulaire correspondant aux érythrocytes humains et particulièrement ses membranes.

La protection par les CPO contre l'hémolyse induite par H_2O_2 a été étudiée. L'effet anti-hémolytique des CPO est assez élevé ($IC_{50} = 86,83 \pm 5,26 \mu\text{g/ml}$), mais reste inférieur à celui de la vit C ($IC_{50} = 40,3 \pm 6,97 \mu\text{g/ml}$) sur ce système.

Sur le système membranaire, les CPO montrent une activité protectrice plus importante ($IC_{50} = 49,27 \pm 1,91 \mu\text{g/ml}$) contre la peroxydation lipidique induite dans des conditions de stress oxydatif par $H_2O_2/FeSO_4$. Paradoxalement, dans ces essais, la vit C présente un effet pro-oxydant.

L'oxydation des protéines membranaires, sous l'effet du système $H_2O_2/FeSO_4$, est évaluée par électrophorèse. Les résultats montrent la protection conférée par les CPO à certaines concentrations contre l'oxydation de la plupart des protéines membranaires. Cependant à de fortes concentrations un effet pro-oxydant est trouvé pour toutes les substances testées (CPO, AG et vit C).

Pour les différentes activités testées en présence de vit C et des CPO, les résultats obtenus indiquent qu'il y'a un effet additif des activités de la vit C et des CPO pour la plupart des tests utilisés.

En conclusion, le travail mené a permis de mettre en relief l'importance des propriétés antioxydantes des CPO. En effet, les CPO, ont un pouvoir important en tant qu'agents réducteurs et en tant que piègeurs de radicaux libres plus que ne le ferait la vit C. Au niveau cellulaire, ces molécules peuvent assurer la protection des constituants membranaires contre les effets du stress oxydant préservant ainsi l'intégrité membranaire.

Mots clés : Composés phénoliques de l'olive/ extraction / stress oxydant/ DPPH/ H_2O_2 / érythrocytes/ membrane érythrocytaire/ électrophorèse.

Abstract

The phenolic compounds (CP) of olive make part of the Mediterranean diet known for its beneficial effects on human health. Interest carried to these molecules is explained by their antioxidant properties.

The purpose of this work was to study some antioxidant properties of the total phenolic compounds extracted from olive pulp (CPO) of *chamlal* variety as well as other individual CP (caffeic acid (CA), gallic acid (GA), tannic acid (TA)). The activities obtained are compared with that of the vitamin C (vit C).

Result of quantification of the CPO indicates richness of this variety in CP (1633 ± 0.16 mg of GA equivalent /100 g of pulp).

Some mechanisms at the base of the antioxidant effect of the CPO were studied. Methods testing the reducing activity as well as the capacity of trapping radical species (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydrogen peroxide (H_2O_2)) were applied.

The results show that the CP show a reducing power ($PR_{0.5AU} = 50.55 \pm 3.33$ μ g/ml) present the higher activity of the reduction of iron than that vit C. The scavenging capacity of radical DPPH by the CPO ($EC_{50} = 12.60 \pm 0.20$ g/g de DPPH \cdot) is higher than that of vit C, in the same way, for scavenging activity of hydrogen peroxide at some concentrations.

These antioxidant properties of the CPO were also tested on a cellular model corresponding to the human erythrocytes and more particularly the erythrocyte membranes.

The protection by CPO against hemolysis induced by H_2O_2 was studied. The results show that all the substances tested exhibit an anti-hemolytic activity. The anti-haemolytic effect of the CPO is rather high ($IC_{50} = 86.83 \pm 5.26$ μ g/ml), but remains lower than that of vit C ($IC_{50} = 40.3 \pm 6.97$ μ g/ml) on this system.

On the membrane system, the CPO show the highest protective activity ($IC_{50} = 49,27 \pm 1,91$ μ g/ml) against lipid peroxidation induced in conditions of oxidative stress by $H_2O_2/FeSO_4$. However, in these tests, vit C presents a pro-oxidant effect.

The oxidation of membrane proteins induced by $H_2O_2/FeSO_4$ system is evaluated by electrophoresis. The result show the protection conferred by the CPO with some concentrations against oxidation of the majority of membrane proteins. However with high concentration, pro-oxidant effect is found for all the substances tested (CPO, AG and vit C).

For the various activities tested in the presence of vit C and CPO, the Results obtained indicate that there is an additive effect of the activities of vit C and CPO for the majority of the tests used.

In conclusion, undertaken work has allowed to underline the importance of the antioxidant properties of the CPO. Indeed the CPO have a significant capacity as reducing agents and as free radical scavenging more than vit C would do it. At the cellular level, these molecules can ensure the protection of membrane components against the effects of the oxidative stress thus preserving the membrane integrity.

Key words: olive phenolics/ extraction/ oxidative stress/ DPPH/ H_2O_2 / erythrocyte/ erythrocyte membrane/ electrophoresis.

Liste des figures

Figure 1 : Structures chimiques des acides phénoliques	4
Figure 2 : Structures chimiques des flavonoïdes.....	5
Figure 3 : Les différentes classes de tannins.....	6
Figure 4 : Les différentes parties composant l'olive.....	12
Figure 5 : La structure de l'oleuropeine	13
Figure 6 : La structure des composés apparentés à l'oleuropeine.....	13
Figure 7 : La structure de l'acétal de méthyle de ligstroside aglycone.....	14
Figure 8 : La structure des dérivés aldehydiques de l'oleuropéine.....	14
Figure 9 : La structure de l'hydroxytyrosol (9) et du tyrosol (10).....	14
Figure 10 : Structures des glycosides de l'hydroxytyrosol et du tyrosol	15
Figure 11 : La structure de la cornoside.....	15
Figure 12 : La structure du verbascoside.....	15
Figure 13 : La structure de nuezhenide.....	16
Figure 14 : La structure des esters phénoliques	16
Figure 15 : Les voies métaboliques responsables de la synthèse des sécoiridoïdes	17
Figure 16 : La réaction de Fenton.....	20
Figure 17 : Principales sources cellulaires de radicaux libres.....	22
Figure 18 : Dismutation de l'anion superoxyde par la SOD.....	23
Figure 19 : Dismutation du peroxyde d'hydrogène par la CAT.....	23
Figure 20 : L'élimination du H ₂ O ₂ par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR.....	23
Figure 21 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydants.....	25
Figure 22 : Les principales réactions de la peroxydation lipidique.....	29
Figure 23 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	29
Figure 24 : Mécanisme de la formation de groupements carbonyles.....	30
Figure 25 : Schéma de la membrane du globule rouge	34
Figure 26 : Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe d'olive... ..	38
Figure 27 : Les réactions mises en jeu dans le test de ferrocyanure de potassium	39
Figure 28 : Structure du DPPH· et sa réduction par l'antioxydant RH.....	41
Figure 29 : La réaction de la formation du chromophore entre MDA et TBA	45
Figure 30 : Mécanisme de polymérisation entre l'acrylamide et le bisacrylamide.....	48
Figure 31 : Courbe étalon du dosage des composés phénoliques totaux	53
Figure 32 : Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium des différentes substances testées (CPO, AG, AC, AT et la vit C).....	55
Figure 33 : Pouvoir réducteur de l'association CPO et vit C sur le ferrocyanure de potassium.....	56
Figure 34 : Comparaison du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium de l'effet additif et de l'effet de l'association CPO et vit C.....	57
Figure 35 : Pouvoir réducteur du molybdène des CPO et de l'AC à différentes concentrations.....	57
Figure 36 : Courbe d'étalonnage de la vit C réalisée avec le test phosphomolybdénique.....	58
Figure 37 : L'effet de l'association CPO et vit C sur l'activité antioxydante mesurée par le test phosphomolybdénique.....	59
Figure 38 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association CPO et vit C sur l'activité antioxydante mesurée par le test phosphomolybdénique.....	59
Figure 39 : Courbe d'étalonnage du DPPH·.....	62

Figure 40 : Le pourcentage de DPPH· résiduel à différentes concentrations d'AG en fonction du temps. [DPPH·] _{Initiale} = 0,1mM.	62
Figure 41 : Le pourcentage de DPPH· résiduel à différentes concentrations d'AC en fonction du temps. [DPPH·] _{Initiale} = 0,1mM.	63
Figure 42 : Le pourcentage de DPPH· résiduel à différentes concentrations de l'AT en fonction du temps. [DPPH·] _{Initiale} = 0,1mM.	63
Figure 43 : Le pourcentage de DPPH· résiduel à différentes concentrations des CPO en fonction du temps. [DPPH·] _{Initiale} = 0,1mM.	64
Figure 44 : Le pourcentage de DPPH· résiduel à différentes concentrations de la vit C en fonction du temps. [DPPH·] _{Initiale} = 0,1mM.	64
Figure 45 : Fraction de DPPH· résiduelle à l'état stationnaire en fonction du rapport quantité en antioxydant (g) / g de DPPH·. [DPPH·] _{Initiale} = 0,1mM.	65
Figure 46 : L'effet de l'association CPO et vit C sur l'activité de piégeage du radical DPPH·. [DPPH·] _{Initiale} = 0,1mM.	66
Figure 47 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association entre les CPO et la vit C sur l'activité de piégeage du radical DPPH·. [DPPH·] _{Initiale} = 0,1mM.	67
Figure 48 : Le pourcentage de piégeage de H ₂ O ₂ (43mM) par les substances testées (CPO, AG, AC, AT et la vit C).	69
Figure 49 : L'effet de l'association CPO et vit C sur le pourcentage de piégeage de H ₂ O ₂ (43mM).	70
Figure 50 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association CPO et vit C sur le pourcentage de piégeage de H ₂ O ₂ (43mM).	70
Figure 51 : L'effet à différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène sur l'induction de l'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v).	72
Figure 52 : Le pourcentage d'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v) induit par H ₂ O ₂ (5mM) en fonction du temps.	73
Figure 53 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v) par les différentes substances testées (AG, AC, AT, CPO et vit C).	76
Figure 54 : L'effet de l'association CPO et vit C sur l'inhibition de l'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v).	77
Figure 55 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association CPO et vit C sur l'inhibition de l'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v).	77
Figure 56 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de protéines.	81
Figure 57 : La formation du MDA sous l'effet des différents systèmes d'oxydation, H ₂ O ₂ et H ₂ O ₂ /FeSO ₄ , sur les membranes érythrocytaires (1mg/ml).	81
Figure 58 : La quantité du MDA formée en fonction du temps sous l'effet du système pro-oxydant H ₂ O ₂ (900mM) /FeSO ₄ (1mM) sur les membranes érythrocytaires (1mg/ml).	83
Figure 59 : Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1mg/ml) par les différents composés phénoliques testés (AG, AC, AT et CPO).	84
Figure 60 : L'effet pro-oxydant de la vit C sur la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1mg/ml) induite par le système H ₂ O ₂ / FeSO ₄ (900mM/1mM).	87
Figure 61 : L'effet de l'association CPO et vit C sur l'inhibition de la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1mg/ml) induite par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ (900mM/1mM).	88
Figure 62 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association CPO et vit C sur l'inhibition de la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1mg/ml).	89
Figure 63 : Electrophorégramme de protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-native (T = 12% ; C = 2,7%)	90
Figure 64 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE SDS.	90

Figure 65 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS.	91
Figure 66 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par H ₂ O ₂	92
Figure 67 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄	93
Figure 68 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ (50mM/30mM) après différents temps d'incubation. PN: Protéine non oxydées.....	96
Figure 69 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ (50mM/30mM) incubées avec différentes concentrations de l'extrait phénolique de l'olive	98
Figure 70 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ (50mM/30mM) incubées à différentes concentrations de l'acide gallique	100
Figure 71 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système H ₂ O ₂ /FeSO ₄ (50mM/30mM) incubées avec différentes concentrations de la vit C.....	102

Liste des tableaux

Tableau I : La distribution de certains polyphénols dans les aliments	8
Tableau II : Le système d'oxydation $H_2O_2/FeSO_4$ des protéines membranaires érythrocytaires	51
Tableau III : Comparaison de l'activité antioxydante exprimée en pourcentage de piégeage du radical DPPH·	61
Tableau IV : Pourcentages d'hémolyse obtenus en présence de différentes concentrations en H_2O_2 et en NaCl.	75

Liste des abréviations

ABTS	Acide 2,2'-Azino-bis(3 ethylbenzthiozoline-6-sulphonique)
AC	Acide caféique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFIDOL	Association Française Interprofessionnelle de l'Olive
AG	Acide gallique
APPH	2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride
ARN	Aide ribonucléique
AT	Acide tannique
BHA	buthylhydroxyanisol
BSA	« Bovine serum abumin » Sérum albumine bovine
CAT	Catalase
CP	Composés phénoliques
CPO	Composés phénoliques totaux extraits de la pulpe d'olives
Da	Dalton
DMPD+	N,N-dimethylphenylenediamine
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ERA	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GP	Glycophorines
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
Hb	Hémoglobine
HPLC	« High- performance liquid chromatography » Chromatographie liquide haute performance
LABAB	Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies
LDL	« Low density lipoprotein » Lipoprotéines de faible densité
mA	Milli ampère
MAE	Extraction assistée par micro-ondes
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
P/V	Poids / volume
PAGE	« PolyAcrylamid Gel Electrophoresis »
PBS	Tampon phosphate salin
PE	Phycoérythrine
PLE	Extraction liquide sous pression
PP	Polyphénols
RL	Radicaux libres
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SFE	Extraction par fluide supercritique
SOD	Superoxydes dismutases
SPE	Extraction en phase solide
T %	% d'acrylamide et de bis-acrylamide dans un volume V de tampon
TBA	Acide 2-thiobarbiturique
TBARs	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique

TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène diamine
TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter
Tris	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
v/v	Volume / volume
VIH	Virus de l'immunodéficience Humaine
vit C	Vitamine C

Introduction générale

Introduction générale

La santé publique se préoccupe comme jamais auparavant des effets préjudiciables de la préparation industrielle des aliments, de l'emploi excessif des conservateurs et des additifs alimentaires qui sont, de plus en plus manifestes.

Les produits naturels connaissent, depuis quelques années, une montée en popularité et sont le sujet de plusieurs recherches visant entre autre à développer de nouveaux produits thérapeutiques contre les maladies qui demeurent encore sans traitements ainsi que pour palier à l'émergence de la résistance aux traitements déjà existant comme les antibiotiques. En outre, ces produits naturels pourraient avoir des applications dans le domaine agro-alimentaire comme alternative à l'utilisation de conservateurs et d'additifs alimentaires synthétiques.

Les multiples atouts santé des fruits et légumes sont liés à leur richesse en certains micronutriments dont les antioxydants qui apparaissent de plus en plus clairement comme essentiels au bon fonctionnement de notre organisme en le protégeant contre plusieurs maladies

La classe de micronutriments la plus importante correspond aux composés connus sous le nom de polyphénols ou composés phénoliques. Ces composés sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. En moyenne 1 à 2 g de polyphénols sont consommés par jour. Ces molécules végétales sont de plus en plus étudiées et leurs bénéfices santé sont clairement admis.

Chez l'homme, de nombreuses situations physiopathologiques sont associées à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que les radicaux hydroxyles. Lorsque la production d'ERO est trop importante on parle de situation de stress oxydant, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines. Les antioxydants alimentaires dont les polyphénols, pourraient donc être des molécules candidates pour la prévention ou le traitement de ces pathologies liées au stress oxydant.

Dans ce travail, il est question de mettre en évidence les propriétés anti-oxydantes que pourraient avoir spécifiquement les composés phénoliques de la pulpe d'olive (CPO) variété *chamlal*.

Le patrimoine oléicole en Algérie constitue 195 500 hectares avec une production de 179 978 tonnes d'olives et 27 837 tonnes de l'huile d'olive.

Le choix de la variété *chamlal* s'explique par sa prépondérance ; elle représente 40% du verger oléicole algérien. Variété vigoureuse de Kabylie, particulièrement réputée pour la qualité et les propriétés de son huile, la variété *chamlal* donne de 14 à 18 litres/quintal. Cette étude s'inscrit en effet dans un cadre de valorisation de ce patrimoine oléicole.

Ce travail a consisté dans un premier temps en l'extraction des polyphénols totaux de la pulpe d'olive ainsi que la détermination de leur concentration.

Plusieurs méthodes ont été, par la suite, utilisées en vue de tester l'activité antioxydante de ces polyphénols. Des méthodes chimiques testant l'activité réductrice et l'activité de piégeage de certaines espèces radicalaires ont été appliquées. D'autres tests ont été réalisés *in vitro* sur les érythrocytes humains pris comme modèle cellulaire pour

l'évaluation de la protection conférée par les molécules testées contre la mort cellulaire induite par une situation de stress oxydatif préalablement définie. D'autres essais ont été effectués sur un système membranaire correspondant à la membrane érythrocytaire où la protection contre l'oxydation des lipides et des protéines membranaires, par ces molécules phénoliques, a été évaluée.

Au cours de tous ces essais, la vitamine C (vit C) est prise comme référence par rapport à son activité anti-oxydante. Des essais auxquels sont ajoutés les CPO à la vit C ont été évalués afin de déterminer le type d'effet (additif ou synergique) qui ressort suite à leur association.

1^{ère} Partie :
Synthèse des données
bibliographiques

I-Caractéristiques générales des composés phénoliques

1.1 Classification et structure des composés phénoliques

1.1.1 Les principaux groupes de composés phénoliques

Les composés phénoliques (CP) forment un très vaste ensemble de substances dont plus de 8000 sont connues (WILLIAMSON et MANACH, 2005). Ils sont les produits du métabolisme secondaire des végétaux et sont distribués dans tous les organes de la plante (APAK *et al.*, 2007).

Ils sont caractérisés par la présence dans leur structure d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétéroside (HANDIQUE et BARUAH, 2002).

Les polyphénols (PP) présentent plusieurs fonctions. En effet ils interviennent dans certains aspects physiologiques de la plante (lignification, régulation de la croissance, interaction avec certains micro-organismes) dans l'interaction de la plante avec son environnement biologique et physique (résistance aux rayonnements ultraviolets (UV), défense contre les pathogènes) (DANIEL *et al.*, 1999 ; LOGAN *et al.*, 2006 ; TREUTTER, 2006).

En outre les PP contribuent également aux critères de qualité des produits alimentaires (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles et sensorielles...etc) (DAVIS *et al.*, 1997 ; DREWNOWSKI et GOMEZ-CARNEROS, 2000 ; O'CONNELL et FOX, 2001 ; MISNAWI *et al.*, 2004 ; LESSCHAEVE et NOBLE, 2005 ; PREYS *et al.*, 2006).

Le rôle des PP dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison particulièrement de leurs propriétés anti-oxydantes, est également bien étudié (KURODA et HARA, 1999 ; STOCLET *et al.*, 2004 ; SIGNORELLI et GHIDONI, 2005 ; HAN *et al.*, 2007 ; RAWEL et KULLING, 2007 ; RUSSO, 2007 ; XIAO *et al.*, 2007).

Ainsi, les PP peuvent être divisés en une dizaine de classes en fonction de leur structure de base relative au nombre et à la position des groupements hydroxyles et méthoxyles sur le squelette de base. Ils s'étendent de molécules simples telles que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que les tannins.

- **Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques englobent les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (FRANK, 2004) (figure 1).

Les acides hydroxybenzoïques se présentent sous forme libre, estérifiée ou glycosylée (FRANK, 2004). Ils ne se trouvent que dans un petit nombre de plantes et l'acide gallique étant l'acide hydroxybenzoïque le plus répandu.

Les acides hydroxycinnamiques sont les acides phénoliques les plus communs. Ils sont rencontrés notamment sous leur forme glycosylée ou estérifiée par l'acide quinique, shikimique et tartarique (CLIFFORD, 2000).

L'acide caféique sous sa forme libre ou estérifiée constitue l'acide phénolique le plus abondant et représente 75% des acides hydroxycinnamiques totaux contenus dans la plupart des fruits. L'acide caféique et l'acide quinique en se combinant forment l'acide chlorogénique (KING et YOUNG, 1999).



Acides Hydroxybenzoïques

R1=H, R2=R3=R4=OH : Acide gallique
 R1=R4=OH, R2=R3=OH : Acide gentisique
 R1=OH, R2=R3=R4=H : Acide salicylique
 R1=R2=R4=H, R3=OH : Acide p-(OH)-benzoïque
 R1=R4=H, R2=R3=OH : Acide syringique
 R1=R4=H, R3=OH; R2=OCH3 : Acide vanillique

Acides Hydroxycinnamiques

R1=R2=R4=H, R3=OH : Acide p-Coumarique
 R1=R4=H, R2=R3=OH : Acide caféique
 R1=R2=H, R4=OCH3, R3=OH : Acide Ferulique
 R1=H, R2=R4=OCH3, R3=OH : Acide Sinapique

Figure 1 : Structures chimiques des acides phénoliques (DICKO et al., 2006).

• Les flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la classe la plus abondante des CP. En 1999, plus de 6400 flavonoïdes différents ont été identifiés (ROBARD et ANTOLOVICH, 1997 ; TAPIERO et al., 2002). Cette abondance peut être expliquée par l'existence de nombreux modèles de substitution dans lesquels les substituants primaires (par exemple, hydroxyle, méthoxyle, ou groupes glycosyliques) peuvent eux-mêmes parfois être substitués, aboutissant à des structures fortement complexes (CHEYNIER, 2005 ; GIROTTI-CHANU, 2006).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en sous classes sur la base du degré d'hydroxylation et le type de liaison du noyau aromatique au noyau hétérocyclique (BEECHER, 2003 ; MARFAK, 2003). Les différentes sous classes se différencient davantage selon le nombre et la nature des substituants liés aux cycles aromatiques (BEECHER, 2003 ; FRANK, 2004 ; GIROTTI-CHANU, 2006 ; MOHAMMEDI, 2006).

On distingue les flavones, les flavanols (catéchines), les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines (figure 2).

• Les stilbènes

Les Stilbènes sont structurellement caractérisés par la présence d'un noyau 1,2-diphényléthylène avec des substituants hydroxyles sur le noyau aromatique. Ils existent sous forme de monomères et d'oligomères. Le composé le plus connu est le résveratrol, possédant un squelette trihydroxystilbène (ROUPE et al., 2006).

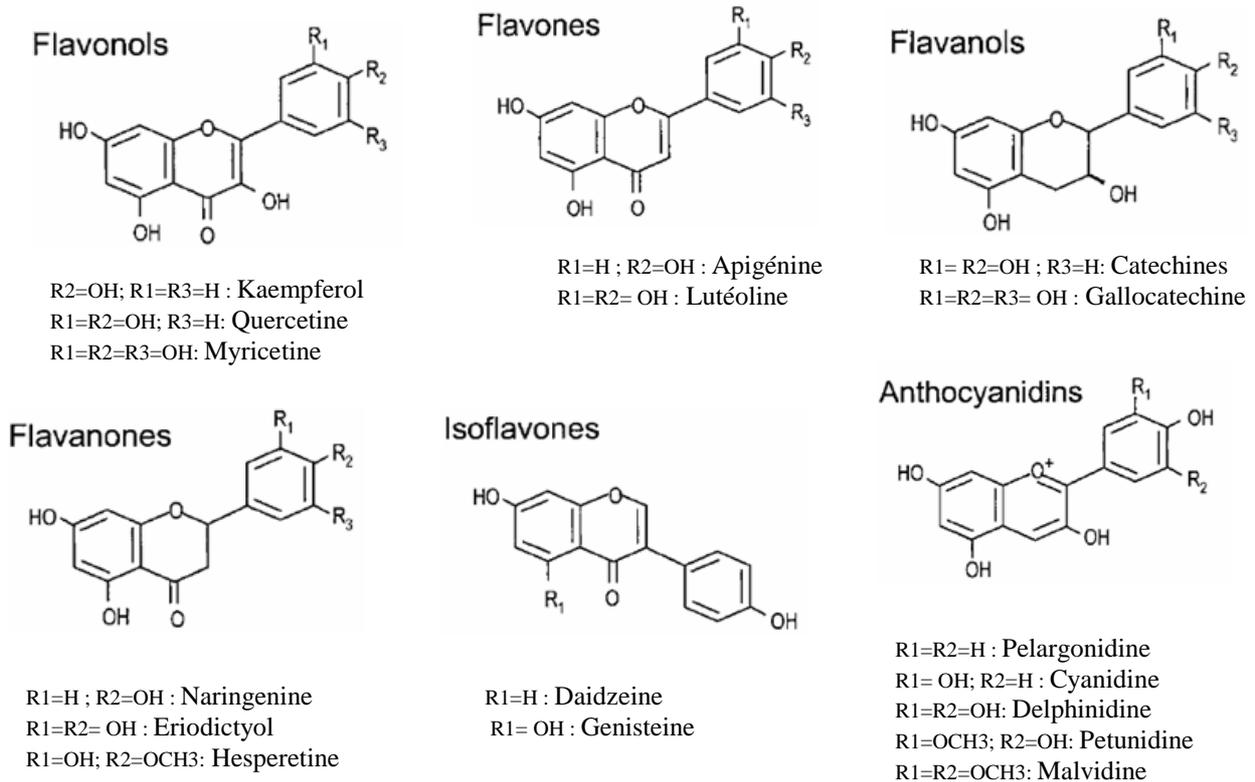


Figure 2 : Structures chimiques des flavonoïdes (MANACH *et al.*, 2004).

- **Les tannins**

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tannins différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (figure 3)(CHUNG *et al.*, 1998 ; HASLAM, 2007).

Les tannins hydrolysables sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Ce sont des esters d'oses et d'acides phénoliques (acides gallique ou ellagique). Ils incluent les gallotannins et les ellagitannins.

Les tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols. Contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide chaud ils se transforment en pigments rouges et, pour cette raison, les formes dimères et oligomères sont dénommées « proanthocyanidines » (DIXON *et al.*, 2005).

Par la formation de complexes avec les protéines, les tannins condensés sont responsables du caractère astringent des fruits et des boissons ainsi que de l'amertume du chocolat. Certains effets physiologiques chez l'animal (croissance) sont dus également à ces interactions (HAGERMAN et BUTLER, 1981 ; AERTS *et al.*, 1999 ; COSME *et al.*, 2008).

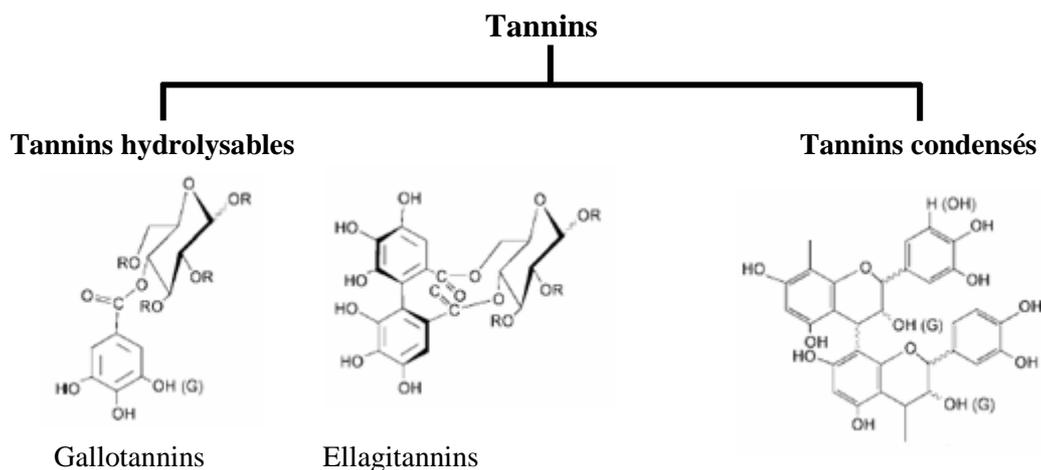


Figure 3 : Les différentes classes de tannins (KHANBABAEI et VAN REE, 2001).

- **Les lignanes et lignines**

Les lignanes proviennent de la condensation initiale de deux molécules phénoliques de type monolignol comme l'alcool coniférylique. Diverses oxydations, réductions ou alkylations conduisent ensuite aux lignanes présents chez les végétaux (sécoisolaricirésinol, pinorésinol, matairesinol) (AURA, 2005).

Les lignines, structurellement liées aux lignanes, font aussi partie des CP. Ils résultent de la polymérisation de trois monolignols, les alcools comarylique, coniférylique et sinapylique (BEGUM *et al.*, 2004).

D'un point de vue fonctionnel, la lignine confère une rigidité à la paroi et empêche la dégradation des polysaccharides pariétaux, de ce fait elle agit comme ligne de défense contre les pathogènes, insectes et autres herbivores (HATFIELD et VERMERRIS, 2001).

D'autres classes de CP existent telles que les coumarines, les sécoiridoïdes, les diferuloylmethanes ou curcumines (OJALA, 2001 ; RYAN *et al.*, 2002).

1.1.2 Les propriétés des composés phénoliques

- **Piégeage des radicaux libres**

La fonction phénol a un caractère plus acide que les autres groupements alcools. Elle perd facilement un proton H^+ pour former l'ion phénolate. La perte d'un hydrogène (proton + électron) engendre la formation d'un radical fortement stabilisé par mésomérie. Cette réactivité chimique confère aux CP leur caractère antioxydant (FERREIRA *et al.*, 2007 ; WANG *et al.*, 2008).

- **Chélation des ions métalliques**

Les PP présentent la capacité de fixer des ions de transition tels que le fer et le cuivre. Ils peuvent de cette manière inhiber la génération des radicaux libres (RL) par la réaction de Fenton (ANGHILERI et THOUVENOT, 2000 ; EBRAHIMZADEH *et al.*, 2008).

- **Complexation moléculaire**

Le noyau phénolique est une unité très favorable à l'interaction avec les protéines. Les interactions peuvent être covalentes ou non covalentes (PAPADOPOULOU et FRAZIER, 2004 ; PRIGENT, 2005).

Ces interactions sont, à titre d'exemple, à l'origine de la sensation d'astringence, lors de l'interaction avec les protéines salivaires riches en proline (LUCK *et al.*, 1994 ; BENNICK, 2002), et l'inhibition de certaines enzymes.

- **Complexation polyphénols-polyphénols**

Ces interactions sont à la base de l'un des mécanismes les plus importants de la stabilisation des couleurs naturelles exprimées par les anthocyanes : la co-pigmentation. Ce phénomène implique principalement les formes colorées des anthocyanes et certains PP tels que les acides hydroxycinnamiques, les flavones et les flavonols (co-pigments) (DANGLES et BDROUILLARD, 1992 ; REIN, 2005 ; GONZALEZ-PARAMAS *et al.*, 2006).

1.1.3 L'alimentation et les polyphénols

Plusieurs études épidémiologiques sont en faveur du rôle des PP dans l'alimentation de part leur capacité à prévenir l'incidence de diverses maladies (ARTS et HOLLMAN, 2005 ; SCALBERT *et al.*, 2005). Toutes les plantes renferment des CP et sont, à ce titre, sources potentielles d'antioxydants (OWEN, GIACOSA, HULL, HAUBNER, WÜRTELE *et al.*, 2000 ; BALASUNDRAM *et al.*, 2006 ; DIMITRIOS, 2006).

Les principales sources alimentaires des CP sont les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales et les graines oléagineuses. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en PP, les boissons telles que les jus de fruits, et surtout le café et le thé en apportent le reste (DREWNOWSKI et GOMEZ-CARNEROS, 2000 ; WOLLGAST et ANKLAM, 2000 ; CIESLIK *et al.*, 2006 ; FARAH et DONANGELO, 2006 ; NACZK et SHAHIDI, 2006).

Le tableau I donne quelques sources alimentaires de certains groupes de CP

1.1.4 La disponibilité biologique des composés phénoliques

Les propriétés biologiques des PP dépendent de leur disponibilité biologique (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000). Il y'a eu des avancées ces dernières années concernant l'absorption et le métabolisme des PP, et il est évident que la plupart des classes en sont absorbées suffisamment pour offrir des possibilités intéressantes d'exercer des effets biologiques (WILLIAMSON et MANACH, 2005).

La première cause déterminante de la disponibilité biologique d'un PP, administré par voie orale, est l'ampleur de son absorption par le tractus gastro-intestinal (DE BOER, 2007).

Le taux d'absorption intestinale est déterminé par la structure des PP qui dépend des facteurs comme le degré de glycosylation/acylation, leur structure, le poids moléculaire (PM), le degré de polymérisation et de leur solubilité (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000).

Tableau I: La distribution de certains polyphénols dans les aliments (KING et YOUNG, 1999).

Les composés phénoliques	Sources alimentaires
<i>Flavonols</i> : quercétine, kaempferol, myricétine, Fistine,	Olive, oignon, laitue, choux, pomme, chicorée, thé vert, banane, tomate, ciboulette
<i>Flavonols</i> : Apigénine, Lutéoline	Olives, céleri,
<i>Flavanols</i> : Catechine, Epicatechine	Poire, thé, pommes...
<i>Isoflavones</i> : Genistéine, Daidzéine	Soja, tofu,
<i>Acides hydroxycinnamiques</i> : acide caféique, ferulique, chlorogénique	myrtille, cerise, poire, pomme, haricots de collée, jus de cerise et de pomme, Kiwi, prune, aubergine, pomme de terre, épinards.
<i>Acide hydroxybenzoïques</i> : acide gallique et ellargique	Framboise, fraise, jus de raisin, mûre, cassis
<i>Tannins condensés</i> : catéchine, polymère d'epicatechine	Raisin, fraise, framboise, noix, prune, pêche, chocolat, vin rouge, thé, café, cidre
<i>Stilbénes</i> : resveratrol	Arachides, raisin

Les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle. Cependant, la plupart des PP existent dans les produits alimentaires sous forme notamment de glycosides ou de polymères qui ne peuvent pas être absorbés sous leur forme native. Ces substances doivent être hydrolysées par les enzymes intestinales telles que la β -glucosidase et la lactase phlorizine hydrolase (LPH) (MANACH *et al.*, 2004 ; DE BOER, 2007).

Une fois absorbés, les PP sont soumis à trois principales types de réactions de conjugaison : méthylation, sulfatation et glucuronidation, réactions catalysées par plusieurs enzymes et ceci au niveau de plusieurs tissus particulièrement le foie (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000).

La flore microbienne du colon joue également un rôle critique dans le métabolisme des CP (WILLIAMSON et MANACH, 2005) qui ne sont pas absorbés dans l'estomac ou dans l'intestin grêle et ceux subissant le cycle entérohépatique (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000 ; MANACH *et al.*, 2004 ; SILBERBERG *et al.*, 2006). Les métabolites des PP peuvent suivre deux voies d'excrétion à savoir, la voie biliaire et la voie urinaire (MANACH *et al.*, 2004).

1.1.5 Méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques

1.1.5.1 Méthodes d'extraction

Le processus d'extraction correspond à la libération des CP à partir généralement des structures vacuolaires et leur diffusion, après rupture des tissus, vers le milieu d'extraction.

L'extraction des CP est une procédure assez difficile en raison de leur grande diversité structurale, ainsi que leur sensibilité aux modifications chimiques, sous l'effet de la température, l'air et la lumière, et aux modifications enzymatiques (NACZK et SHAHIDI, 2004).

- **L'extraction par solvant**

Les CP sont traditionnellement extraits par solvant. Le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate éthylique et, à un moindre degré le propanol, et leurs mélanges sont les solvants les plus fréquemment utilisés pour l'extraction des CP (NACZK et SHAHIDI, 2004).

Plusieurs facteurs influencent l'extraction des CP à partir de la matière végétale tels que le type et le volume du solvant utilisé, la taille des particules de l'échantillon, le temps d'extraction, les conditions de stockage de l'échantillon, le pH et la température (NACZK et SHAHIDI, 2004).

L'extraction par solvant offre un bon rendement en CP, cependant leur grande utilisation poserait des problèmes de santé publique.

A l'heure actuelle, nombre de méthodes alternatives éliminant ou réduisant significativement leur utilisation et qui introduisent une certaine forme d'énergie additionnelle au processus afin de faciliter le transfert des analytes à partir de l'échantillon vers le solvant, sont mises en œuvre (TSAO et DENG, 2004).

- **L'extraction en phase solide**

L'extraction en phase solide (SPE) est employée pour extraire et concentrer des analytes à partir d'une matrice liquide en divisant les composés entre une phase solide et liquide (BENDINI *et al.*, 2003).

C'est une technique simple, rapide et économique et réduit significativement le volume de solvant utilisé. La SPE est également utilisée pour la purification et la pré-concentration de composés vu la sélectivité de l'adsorbant (TSAO et DENG, 2004).

- **L'extraction ultrasonique**

Les méthodes d'extractions ultrasoniques assistées ont été employées pour un grand nombre de matière végétale (PRIEGO-CAPOTE *et al.*, 2004 ; USAQUEN-CASTRO *et al.*, 2006). Elle tire ses avantages de la haute température (qui augmente la solubilité et la diffusion) et de pression (qui favorise le transport et la pénétration) appliquées à l'interface entre la solution de solvant qui est soumise à l'énergie ultrasonique et une matrice solide. Combinée avec l'énergie oxydative des radicaux créés durant la sonolyse, la méthode donne un puissant pouvoir d'extraction.

- **L'extraction assistée par micro-ondes**

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) est une technique qui combine l'utilisation des solvants traditionnels et les micro-ondes. Elle consiste à chauffer le solvant, ayant une bonne polarité, en contact avec l'échantillon au moyen de l'énergie des micro-ondes. Ce qui augmenterait la pénétration du solvant dans la matrice, permettant la dissolution des composés à extraire (LETELLIER et BUDZINSKI, 1999 ; HUDAIB *et al.*, 2003).

La MAE comparée à l'extraction conventionnelle par solvant, offre beaucoup d'avantages à savoir un temps d'extraction plus court, utilisation plus faible de solvant, bonne reproductibilité et une plus grande efficacité d'extraction (TSAO et DENG, 2004).

- **L'extraction par fluide supercritique**

L'extraction par fluide supercritique (SFE) utilise certains gaz, tels que le dioxyde de carbone (CO₂) qui peuvent être liquéfiés à un état appelé fluide supercritique (YRJÖNEN, 2004). Les caractéristiques d'un tel gaz, combinant les propriétés d'un liquide et d'un gaz, aident le fluide à diffuser vers la matrice et avoir accès aux composés à extraire (TSAO et DENG, 2004).

L'avantage de la SFE réside dans le fait que le CO₂ étant un gaz chimiquement inactif, présente une faible toxicité. En outre, elle minimise les processus de dégradation dus à l'air, à la lumière et à la température. Cependant la SFE reste une technique fortement coûteuse (PANSERA *et al.*, 2004).

- **L'extraction liquide sous pression**

L'extraction liquide sous pression (PLE) fonctionne suivant le principe de l'extraction avec des liquides surchauffés et à de hautes pressions. Ceci augmente la solubilité et la diffusion de l'analyte dans le solvant et conduit à la rupture des interactions entre la matrice et le soluté à extraire, accélérant de cette manière le processus d'extraction.

La PLE offre également la possibilité de réaliser l'extraction dans une atmosphère inerte à l'abri de la lumière, réduisant de la sorte les phénomènes de photo-oxydation.

1.1.5.2 Méthodes de quantification

Il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des CP présents dans un extrait végétal non purifié. Néanmoins, une estimation rapide (et souvent très fortement sur-évaluée) de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes.

La quantification par la méthode de Folin est la plus utilisée pour l'estimation du taux des phénols totaux. Cette méthode très sensible mais peu spécifique car beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer, en particulier l'acide ascorbique.

Lorsqu'un CP est très fortement majoritaire dans un matériel végétal donné, on peut alors avoir une estimation approximative rapide de la teneur du matériel à partir du spectre d'absorption (en UV ou dans le visible) de l'extrait global. Le dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) est également réalisé (PIRISI *et al.*, 1997 ; ROGINSKY et LISSI, 2005).

1.1.5.3 Méthodes de fractionnement et d'identification

Différents types d'hydrolyse (alcaline, acide ou enzymatique par des estérases ou des béta glucosidases) ont permis d'apporter des indications précieuses sur les liaisons chimiques associant les différentes molécules formant un CP natif. Ces approches sont cependant très insuffisantes pour élucider la structure fine de ces composés et on fait donc appel à d'autres techniques analytiques comme les séparations chromatographiques sur papier, sur couches minces ou sur colonnes qui ont été largement développées pour l'analyse des CP.

Des méthodes plus performantes telles que l'HPLC, la chromatographie gazeuse (LIBERATORE et al., 2001 ; SAITTA et al., 2002), la résonance magnétique nucléaire (BIANCO et al., 1999 ; RYAN, ROBARDS, PRENZLER et al., 1999) ainsi que l'électrophorèse capillaire (BONOLI et al., 2003 ; ARRAEZ-ROMAN et al., 2006 ; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006 ; ARRAEZ-ROMAN et al., 2007 ; GOMEZ-ROMERO, ARRAEZ-ROMAN, MORENO-TORRES et al., 2007; GOMEZ-ROMERO, ARRAEZ-ROMAN, SEGURA-CARRETERO et al., 2007) sont les plus utilisées actuellement dans un but de séparation et d'identification.

Le couplage de ces techniques à différents détecteurs (la détection UV à une longueur d'onde fixe, la détection à barrette de diodes, la détection fluorimétrique...) s'avère déterminant, améliore davantage leur sensibilité et leur résolution. Ces techniques peuvent être couplées également à la spectrométrie de masse et Maldi-Tof-MS (ANGEROSA et al., 1995 ; TASIOULA-MARGARI et OKOGERI, 2001 ; TAN et al., 2003 ; REED et al., 2005 ; RIOS et al., 2005).

II- Les composés phénoliques de l'olive

2.1 Caractéristiques biologiques de l'olivier et de l'olive

2.1.1 L'olivier

L'olivier est un arbre de taille moyenne, comprise entre 4 et 8 mètres de hauteur suivant les variétés, il est qualifié de séculaire, sa longévité et sa productivité dépassant la centaine d'années (VILLEMUR et DOSBA, 1997).

La superficie mondiale des oliviers est estimée entre 11,2 et 11,50 millions d'hectares (AFIDOL, 2009). Sur la campagne 2009/2010, le prévisionnel annoncé par le Conseil Oléicole International fait état d'une production mondiale en l'huile d'olive de 2 861 500 tonnes et en olives de table de 2 088 000 (AFIDOL, 2009).

L'olivier appartient au genre *Olea* ; de la famille des Oleaceae (RYAN et al., 2002), il est constitué de plusieurs espèces dont *Olea europaea* L.

2.1.2 Les caractéristiques du fruit : l'olive

Au plan botanique, l'olive est une drupe. Elle est structurellement composée de différentes parties, à savoir l'épicarpe, le mésocarpe et l'endocarpe (figure 4). Ce dernier contient la graine, composée de tégument, de l'albumen et de l'embryon (BRESCIA et al., 2007).

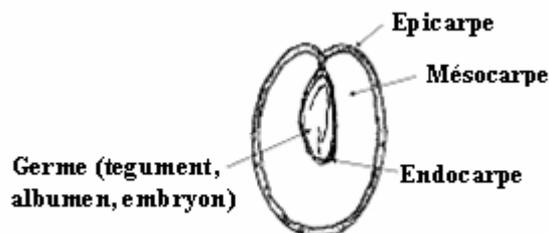


Figure 4 : Les différentes parties composant l'olive (BRESCIA *et al.*, 2007).

2.2 Les composés phénoliques de l'olive et de ses produits dérivés

L'olive ainsi que ses produits dérivés (olives de table, huile d'olive, margines) constituent une source d'une valeur inestimable de composés naturels divers avec des bioactivités importantes (SAIJA et UCCELLA, 2001 ; OWEN *et al.*, 2003 ; ZAFRA *et al.*, 2006 ; KHOUFI *et al.*, 2008).

Ces composés correspondent particulièrement aux antioxydants tels que, les tocophérols, les caroténoïdes, les stérols et les CP. Ces derniers correspondent à plusieurs molécules d'une grande diversité structurale et fonctionnelle (OWEN, MIER *et al.*, 2000 ; BACCOURI *et al.*, 2008).

Les CP de l'olive sont des composés hydroxyaromatiques substitués, qui peuvent être simples, s'agissant de molécules de faible PM, ou complexes, liés à une partie monoterpénique (BIANCO et UCCELLA, 2000).

Au niveau du fruit, une large gamme de structures phénoliques a été rapportée (ROMANI *et al.*, 1999). La classe de CP caractérisant l'olive correspond aux secoiridoïdes et leurs dérivés. Les flavonoïdes, les acides phénoliques et les lignanes en font aussi partie.

Les secoiridoïdes sont caractérisés par un exocycle avec des fonctions 8,9-oléfinique, ils sont connus aussi sous le nom d'oléosides. Ces composés sont restreints aux plantes de la famille Oleaceae (SAIJA et UCCELLA, 2001 ; RYAN *et al.*, 2002).

Ils sont caractérisés par d'autres groupements fonctionnels tels que la fonction alcène, alcoolique et carboxylique, s'agissant de molécules simples, et par des unités glycosidiques et monoterpéniques lorsqu'il s'agit de biomolécules complexes (BIANCO et UCCELLA, 2000).

Lors du processus d'extraction de l'huile d'olive, les CP de l'olive se partagent entre l'huile d'olive et l'eau de végétation appelée aussi margine (MURKOVIC *et al.*, 2004 ; OBIED *et al.*, 2007).

2.2.1 Les secoiridoïdes et leurs dérivés.

- **Oleuropéine**

L'oleuropéine est le premier secoiridoïde qui a été isolé dans les olives en 1960 par PANIZZI *et al.* Ils ont déterminé par la suite sa structure (figure 5) et ont établi que ce composé est responsable, en grande partie, du goût amer des olives (SAIJA et UCCELLA, 2001 ; BIANCO et RAMUNNO, 2006).

Au niveau moléculaire, l'oleuropéine est constituée d'une unité monoterpénique et une unité ortho-diphénolique (BIANCO *et al.*, 2006). C'est un secoiridoïde glucoside qui estérifie un alcool phénolique l'hydroxytyrosol (BIANCO *et al.*, 2007).

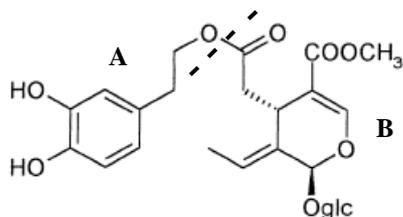


Figure 5 : La structure de l'oleuropeine (TRIPOLI *et al.*, 2005).

A : l'hydroxytyrosol ; B : l'acide elenolique; glc: glucose

L'oleuropéine est rencontrée principalement au niveau de la pulpe d'olive sous forme de glucoside et dans l'huile d'olive notamment sous forme aglycone (TUCK et HAYBALL, 2002). Les feuilles en contiennent aussi. Elle constitue jusqu'à 14% du poids sec du fruit (RYAN, ROBARDS et LAVÉE 1999 ; RYAN *et al.*, 2001 ; SONI *et al.*, 2006).

- **Les composés apparentés à l'oleuropeine**

Plusieurs composés mineurs apparentés à l'oleuropéine ont été isolés dans l'olive, l'huile d'olive et les margines sont rapportés sur la figure 6.

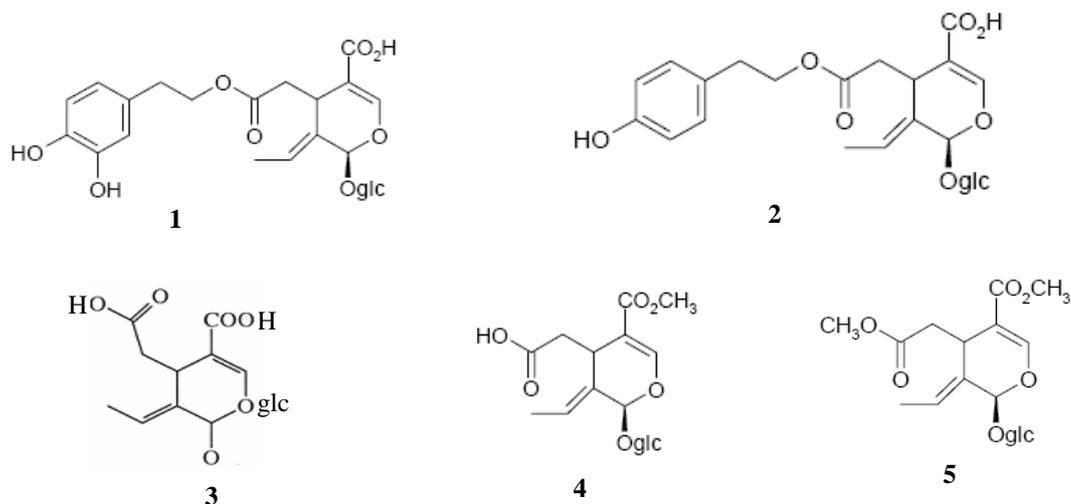


Figure 6 : La structure des composés apparentés à l'oleuropeine (BIANCO *et al.*, 2007).

Le composé (1) demethyl-oleuropéine, est un produit de l'hydrolyse de l'ester méthylique conjugué présent dans la structure de l'oleuropéine. La présence de ce composé augmente pendant la maturation de l'olive. Il se présente au niveau de la pulpe et de l'huile d'olive (SERVILI *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2007).

Le composé (2) ligstroside est très semblable à l'oleuropéine. Il diffère de cette dernière par la présence d'un résidu tyrosol au lieu de l'hydroxytyrosol. Il est rencontré dans la pulpe et l'huile d'olive (UCCELLA, 2001 a ; TRIPOLI *et al.*, 2005, BIANCO *et al.*, 2007 ; YANG *et al.*, 2007).

Le composé (3) l'oleoside, ainsi que ses dérivés, l'oleoside methylester (4) et l'oleoside diméthylester (5) sont retrouvés dans les olives et l'huile d'olive (UCCELLA, 2001 b ; TRIPOLI *et al.*, 2005 ; BIANCO *et al.*, 2007).

Un autre composé (6), ayant été mis en évidence par BIANCO *et al.* (2006), dans l'huile d'olive, est l'acétal de méthyle de ligstroside aglycone (figure 7). Sa présence comme acétal de méthyle suggère que ce composé pourrait être formé à partir de ligstroside lors du processus d'extraction.

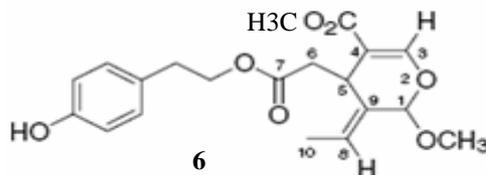


Figure 7 : La structure de l'acétal de méthyle de ligstroside aglycone (BIANCO *et al.*, 2006).

Des formes aldéhydiques, dérivées de l'oleuropeine, résultant de l'hydrolyse des structures glucosidiques par la β -glucosidase et des fonctions esters par les estérases de la molécule de l'oleuropeine ont été identifiées (BIANCO *et al.*, 2007).

Les structures 7 et 8 (figure 8) correspondent aux dérivés aldéhydiques de l'oleuropeine.

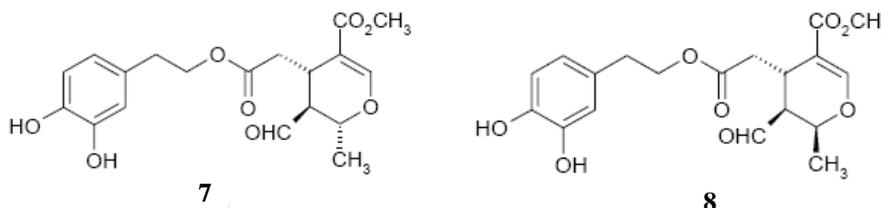


Figure 8 : La structure des dérivés aldéhydiques de l'oleuropeine (BIANCO *et al.*, 2007).

- **Hydroxytyrosol, tyrosol et leurs dérivés**

En fait, l'hydroxytyrosol (9) dans la figure 9 nommé aussi 3,4-dihydroxyphényléthanol, et le tyrosol (10) sont rencontrés dans toutes les parties d'*Olea. europaea* (RYAN *et al.*, 2001).

L'hydroxytyrosol est un composé majeur de la fraction phénolique de l'extrait de l'olive, de l'huile d'olive et des margines, il a été aussi identifié dans le vin (RYAN, ROBARDS *et LAVEE* 1999 ; ALLOUCHE *et al.*, 2004 ; ZAFRA *et al.*, 2006 ; DE LEONARDIS *et al.*, 2007).

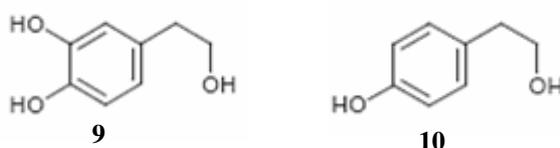


Figure 9 : La structure de l'hydroxytyrosol (9) et du tyrosol (10) (BIANCO *et al.*, 2007).

Les glucosides de tyrosol et de l'hydroxytyrosol constituent la principale partie des CP mineurs de l'olive. Les formes glycosides et aglycones sont particulièrement retrouvées au niveau de l'huile d'olive (TSIMIDOU *et al.*, 1992).

La figure 10 donne les glucosides du tyrosol (11, 12) et de l'hydroxytyrosol (13, 14 et 15). Le composé 11 est également connu sous le nom de salidroside qui a été identifié au niveau de la graine (grignon).

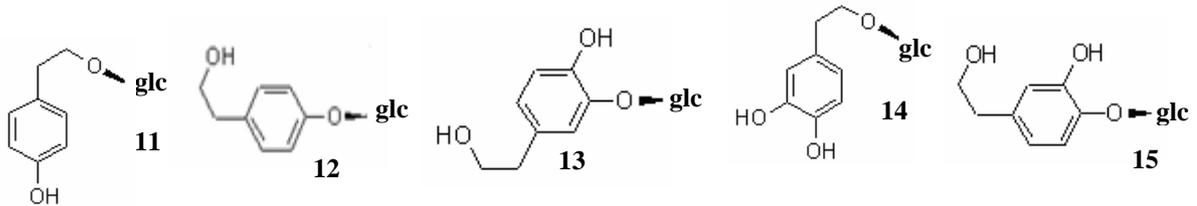


Figure 10 : Structures des glycosides de l'hydroxytyrosol et du tyrosol (BIANCO et RAMUNNO, 2006).

- **Cornoside**

La présence de la cornoside (16) dans la pulpe d'olive a été rapportée pour la première fois en 1993 par SCARPATI *et al.* qui l'a isolé du cultivar de *leccino*. Par la suite BIANCO *et al.* (2007) ont montré que le cornoside (Figure 11) constitue, ainsi que l'oleuropéine, l'un des CP glucosidiques principaux présents chez *Olea europaea*.

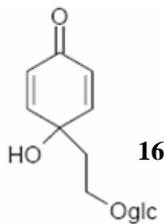


Figure 11 : La structure de la cornoside (BIANCO *et al.*, 2007).

- **Verbascoside**

Le verbascoside (17) dont la structure est rapportée sur la figure 12 est retrouvé au niveau de la pulpe d'olive, dans les margine et l'huile d'olive (SERVILI *et al.*, 2004 ; TRIPOLI *et al.*, 2005).

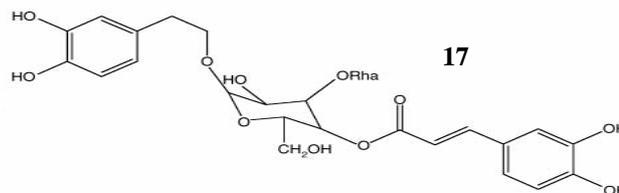


Figure 12 : La structure du verbascoside (TRIPOLI *et al.*, 2005). Rha : rhamnose.

• **Nuezhenide**

Le composé nommé nuezhenide (18) (figure13) se trouve uniquement au niveau du noyau (RYAN et ROBARD, 1998 ; SERVILI et *al.*, 1999).

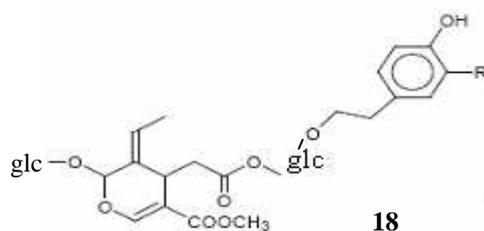


Figure 13 : La structure de nuezhenide (RYAN et ROBARD, 1998).

2.2.2 Esters Phénoliques

La fraction phénolique la moins polaire de l'*Olea europaea* est constituée par des phénols estérifiés par un acide gras. Les phénols estérifiés n'étant pas complètement solubles dans le milieu aqueux.

Parmi ces esters phénoliques, l'ester de tyrosol ou tyrosiloleate (UCCELLA, 2001 a ; BIANCO et *al.*, 2004) et l'ester de l'hydroxytyrosol (BIANCO et *al.*, 2006 ; BIANCO et *al.*, 2007), ont été isolés à partir de l'olive et de l'huile d'olive respectivement (figure 14).

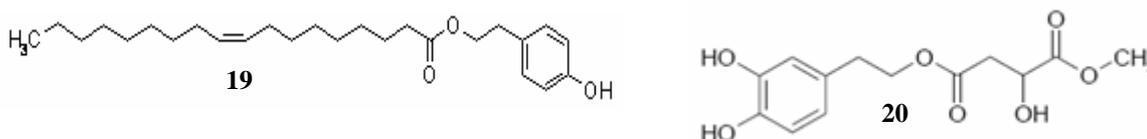


Figure 14 : La structure des esters phénoliques (BIANCO et *al.*, 2007).

19 : Tyrosiloleate ; 20 : l'ester de l'hydroxytyrosol

2.2.3 Autres composés phénoliques

Les acides phénoliques font également partie de la fraction phénolique de l'olive. L'acide caféique, 2-coumarique, 4-coumarique, elenolique (glycosylé ou pas), ferulique, gallique, homovanillique, p-hydroxyphenylacétique, syringique, vanillique, 4-hydroxybenzoïque sont les acides phénoliques les plus rencontrés dans l'olive et l'huile d'olive (NERGIZ et ONAL, 1991 ; TSIMIDOU et *al.*, 1992 ; RYAN, ROBARDS et LAVÉE 1999 ; RYAN et *al.*, 2001 ; SERVILI et *al.*, 2004).

Les flavonoïdes, plus particulièrement les flavonols, sont retrouvés dans les olives. La quercétine, la rutine, la luteoline, l'apigénine et l'hesperidine sont les flavonoïdes les plus rencontrés (RYAN et *al.*, 2001 ; OWEN et *al.*, 2003).

Quelques lignanes ont été identifiés dans l'huile d'olive tels que le + pinosésinol, le composé le plus rencontré, ainsi que ses dérivés : (+)-1-Acétosésinol et (+)-1-hydroxypinosésinol (BENDINI et *al.*, 2007 ; YANG et *al.*, 2007).

2.3 Le métabolisme des composés phénoliques de l'olive : Les secoiridoïdes

Les secoiridoïdes peuvent être synthétisés par deux voies différentes (figure 15) à partir d'un seul composé à savoir l'acide deoxyloganique. L'acide deoxyloganique est le précurseur de la biosynthèse des oleosides (RYAN *et al.*, 2002).

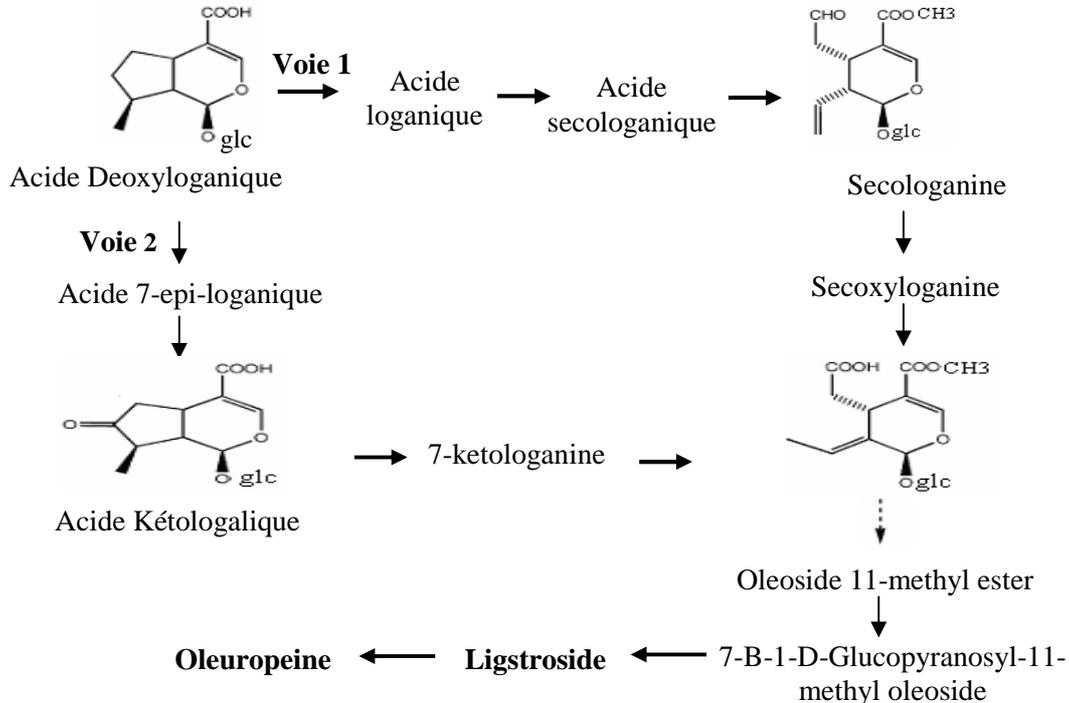


Figure 15 : Les voies métaboliques responsables de la synthèse des secoiridoïdes (RYAN *et al.*, 2002).

2.4 Les activités biologiques des composés phénoliques de l'olive et ses produits dérivés

Les PP rencontrés dans les olives sont doués d'une panoplie d'activités biologiques dont certaines sont citées et présentées succinctement ci-dessous (ALARCON DE LA LASTRA *et al.*, 2001; TRIPOLI *et al.*, 2005 ; KHAN *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007 ; WATERMAN *et al.*, 2007 ; LOCKWOOD, 2007 ; SERVILI *et al.*, 2009 ; CICERALE *et al.*, 2010 ; OMAR, 2010).

- **Activité anti-oxydante et anti-inflammatoire**

Les CP de l'olive dont les secoiridoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, l'oleuropeine et ses dérivés l'hydroxytyrosol et le tyrosol ont montré leur pouvoir antiradicalaire *in vitro* et *in vivo* (VISIOLI *et al.*, 2000 ; VISIOLI *et al.*, 2000). Ils sont capables de piéger les ERO telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'anion superoxyde (O₂^{•-}) (SALAMI *et al.*, 1995 ; VISIOLI, BELLOMO *et al.*, 1998 ; MORENO, 2003 ; O'DOWD *et al.*, 2004) et les espèces réactives de l'azote telles que le monoxyde d'azote (NO[•]) et le peroxyde d'azote (ONOO^{•-}) (DE LA PUERTA *et al.*, 2001).

Les effets anti-inflammatoires de ces PP s'exercent par la diminution du stress oxydatif en piégeant les RL, en inhibant les enzymes intervenant dans le mobilisation de l'acide arachidonique (la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase)(BITLER et *al.*, 2005 ; PUEL et *al.*, 2006) et en réduisant la libération des médiateurs de l'inflammation (le thromboxane B2 et le leucotriène B4, interleukine-1...) (MILES et *al.*, 2005 ; VISIOLI et *al.*, 2005 ; BOGANI et *al.*, 2007). La production de l'interleukine 1-béata par les monocytes est également diminuée sous l'effet de l'oleuropéine glycoside selon MILES et *al.* (2005).

Le contrôle de l'expression des gènes de l'inflammation, tels que le NFkB, notamment par l'hydroxytyrosol et le tyrosol a été également mis en évidence (MORENO, 2003 ; MAIURI et *al.*, 2005).

- **Effets anti-athérosclérotiques et cardioprotecteurs**

Il y'a de plus en plus d'évidences que la modification oxydative des lipoprotéines de faible densité (LDL) joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose et considéré comme marqueur biochimique des maladies cardiovasculaires (MANNA et *al.*, 2004 ; COVAS et DE LA TORRE et *al.*, 2006 ; PERONA et *al.*, 2006).

En effet l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine protègent les particules des LDL de l'oxydation induite par le radical peroxy et les métaux, de manière dépendante de la dose (SALAMI et *al.*, 1995 ; VISIOLI et *al.*, 1995 ; GALLI et VISIOLI, 1999 ; FITO et *al.*, 2000 ; WISEMAN et *al.*, 2002).

Des études *in vivo* ont montré également, chez des animaux recevant un régime alimentaire riche en hydroxytyrosol ou en oleuropéine, leur capacité à augmenter la résistance des LDL à l'oxydation, à réduire le taux du cholestérol et des triglycérides au niveau du plasma. Dans certains organes, ils sont capables d'augmenter le taux plasmatique en HDL-cholestérol et à réduire la pression artérielle (HUANG et *al.*, 1991 ; CONI et *al.*, 2000 ; BENKHALTI et *al.*, 2002 ; MARRUGAT et *al.*, 2004 ; FITO et *al.*, 2005 ; FKI et *al.*, 2005 ; COVAS et NYSSONEN et *al.*, 2006).

Il a été montré que les CP sont incorporés dans les LDL, avec d'autres antioxydants alimentaires, ce qui expliquerait l'augmentation de la résistance de ces molécules à l'oxydation (COVAS et DE LA TORRE et *al.*, 2006 ; DE LA TORRE-CARBOT et *al.*, 2007).

Les CP de l'huile d'olive préviennent également les désordres cardiovasculaires et la formation de plaques d'athérome par la diminution de la formation de médiateurs intervenant dans le recrutement des leucocytes vers le site inflammatoire ainsi que l'inhibition de l'agregation plaquettaire par l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol (PETRONI et *al.*, 1997 ; DE LA PUERTA et *al.*, 1999 ; ANDRIKOPOULOS et *al.*, 2002; RUANO et *al.*, 2005 ; GONZALEZ-SANTIAGO et *al.*, 2006 ; SINGH et *al.*, 2007; BOGANI et *al.*, 2007).

- **Effets anticancéreux, antiprolifératifs et antimitogéniques**

L'oleuropéine et l'hydroxytyrosol présentent des effets protecteurs contre le cancer du sein, du colon, de la prostate et de la peau (TRICHOPOULOU et *al.*, 1995 ; BUDIYANTO et

al., 2000 ; OWEN, GIACOSA, HULL, HAUBNER, SPIEGELHALDER *et al.*, 2000 ; QUILLES *et al.*, 2002 ; BABICH et VISIOLI, 2003 ; CORONA *et al.*, 2007).

Ils agissent généralement sur la prolifération, l'apoptose, la différenciation ainsi que la migration de la cellule cancéreuse (DELLA RAGIONE *et al.*, 2000 ; LOPEZ *et al.*, 2004 ; FABIANI *et al.*, 2006 ; ABAZA *et al.*, 2007). Selon HAMDI et CASTELLON (2005), l'oleuropéine inhibe la prolifération et la migration des cellules cancéreuses (cellules du sein, du colon) en empêchant la réplication, la motilité et l'invasion des cellules tumorales. Elle pourrait même affecter le cytosquelette en perturbant l'organisation des filaments d'actine dans la cellule. En tant qu'antioxydant, elle protège, ainsi que son dérivé l'hydroxytyrosol, les cellules des dommages génétiques menant à l'activation des oncogènes (MENENDEZ *et al.*, 2007).

- **Activité anti-bactérienne et anti-virale**

Les activités anti-microbiennes de l'oleuropéine, de hydroxytyrosol et de tyrosol et des autres phénols ont été étudiés *in vitro* contre beaucoup de micro-organismes pathogènes : bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*), mycoplasmes, champignons, virus et protozoaires (FLEMING *et al.*, 1973 ; FURNERI *et al.*, 2002 ; DEL RIO *et al.*, 2003 ; WINKELHAUSEN *et al.*, 2005 ; BATTINELLI *et al.*, 2006 ; SOLER-RIVAS *et al.*, 2006 ; SOUSA *et al.*, 2006 ; BAIDEZ *et al.*, 2007). L'action anti-microbienne des phénols est liée à leur capacité à dénaturer les protéines et sont généralement classés comme agents agissant en surface (CATURLA *et al.*, 2005 ; CASAS-SANCHEZ *et al.*, 2007). Leur action conduirait à la fuite des constituants cellulaires tels que les protéines, potassium et le phosphate des bactéries. Ces effets pourraient être dus à la destruction du peptidoglycane ou aux dommages de la membrane cellulaire.

Des activités antivirales (LEE-HUANG *et al.*, 2003 ; MICOL *et al.*, 2005 ; LEE-HUANG *et al.*, 2007) notamment contre le virus de l'immunodéficience Humaine (VIH), ont été également décrites. En effet l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine sont des inhibiteurs de la fusion et de l'intégration du HIV-1 à la cellule hôte. L'oleuropéine peut aussi interférer avec la synthèse des acides aminés nécessaires pour l'activité virale prévenant ainsi la diffusion, le développement et l'attaque de la membrane cellulaire (LEE-HUANG *et al.*, 2007).

- **Autres activités biologiques**

En plus des activités pré-citées, les CP de l'olive et ses dérivés, peuvent renforcer les défenses immunitaires (VISIOLI, BELLOSTA *et al.*, 1998) et prévenir d'autres maladies liées au stress oxydatif et à l'inflammation, telles que l'ostéoporose (PUCEL *et al.*, 2004), les désordres neurologiques (POLZONETTI *et al.*, 2004 ; BAZOTI *et al.*, 2006 ; BU *et al.*, 2007), le diabète (AL-AZZAWIE *et al.*, 2006 ; SATO *et al.*, 2007 ; HAMDEN *et al.*, 2009), les maladies rhumatismales (LINOS *et al.*, 1999).

III- Stress oxydant et système antioxydant

3.1 Radicaux libres

3.1.1 Définition

Un RL est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un électron non apparié sur l'orbitale externe. Cette caractéristique lui confère une grande réactivité (demi-vie courte). Ils peuvent être des ERO ou des espèces réactives de l'azote (ERA) (HALLIWELL, 1994 ; GOUDABLE et FAVIER, 1997 ; BERGER, 2006 ; AFONSO *et al.*, 2007).

En effet pour devenir stables, les RL réagissent avec d'autres molécules plus stables pour capter ou céder leurs électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux en initiant des réactions en cascade (JANUEL, 2003 ; AFONSO *et al.*, 2007 ; GUEYE, 2007).

3.1.2 Nature et sources cellulaires

- Nature

En biologie, les RL sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l'oxygène (O₂) lorsque sa réduction n'est pas complète, donnant lieu à des espèces radicalaires dites primaires telles que O₂^{•-} et le radical hydroxyle (•OH). (JANUEL, 2003 ; SERVAIS, 2004 ; GUEYE, 2007).

Les ERO regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de O₂ (O₂^{•-}, HO•, peroxydes ROO•, alkoxydes RO•) mais également les composés non radicalaires tels que H₂O₂, l'oxygène singulet (¹O₂), les hydroperoxydes (ROOH), le nitroperoxyde ou l'acide peroxyntreux (ONOOH), acide hypochloreux (HOCl) et l'ozone (O₃) (CROSS *et al.*, 1992 ; ARUOMA, 1998 ; FAVIER, 2003 ; JANUEL, 2003 ; FONTAINE *et al.*, 2002 ; SERVAIS, 2004 ; IRITI et FAORO, 2008).

Certains RL formés chez les êtres vivants tels que O₂^{•-} ou NO• ne sont pas très réactifs, ce qui explique leur utilisation en tant que médiateurs régulant des fonctions biologiques (vasodilatation, prolifération neuronale...etc) et au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus (BERARD, 1997 ; HENNEBELLE, 2006).

Des espèces comme ROO• et HO• sont particulièrement réactives (HENNEBELLE, 2006) avec la plupart des molécules biologiques et sont issues respectivement de l'oxydation des lipides et du clivage de H₂O₂ par la réaction de Fenton sous l'influence de cations métalliques tels que Fe²⁺ ou Cu⁺ (HALLIWELL *et al.*, 2000 ; GAETKE et CHOW, 2003 ; GUEYE, 2007) (figure 16).



Figure 16 : La réaction de Fenton.

D'autres ERO comme ¹O₂, H₂O₂ ou ONOOH qui ne sont pas des RL, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de RL (FAVIER, 2003). En effet H₂O₂ produit de la dismutation de O₂^{•-} est beaucoup plus stable que ce dernier et a la capacité de diffuser à travers les membranes biologiques.

- **Source des dérivés réactifs de l'oxygène**

Dans l'organisme il y'a de nombreuses sources de ERO dont l'importance varie selon les tissus. En plus de la réaction de Fenton, les autres sources cellulaires des ERO sont enzymatiques et non enzymatiques.

- **Sources majeures**

Des enzymes comme la NADPH oxydase et la xanthine oxydase participent activement à la génération des RL.

La NADPH oxydase intéragit avec le substrat intracellulaire (NADH,H⁺, ou NADPH,H⁺) et libère O₂^{•-}. Ce dernier sera à l'origine de la synthèse de H₂O₂ et de l'hypochlorite (ClO⁻) (HALLIWELL, 1991 ; FONTAINE et *al.*, 2002 ; HALLIWELL, 2006).

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme qui génère du superoxyde en présence d'oxygène et de xanthine ou hypoxanthine.

La mitochondrie en plus de son rôle dans la production de l'énergie cellulaire, elle est considérée comme une des principales sources des ERO dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, au cours du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, O₂^{•-} est produit par réaction de l'oxygène avec un radical semi-ubiquinone (FONTAINE et *al.*, 2002 ; HALLIWELL, 2006).

- **Autres sources**

A côté des sources majeures des ERO précitées, d'autres sources cytosoliques ou présentes dans divers organites cellulaires (peroxysome, réticulum endoplasmique,...etc) peuvent avoir également un rôle dans la production des ERO telles que les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450), les NO synthases et les enzymes de la voie de l'acide arachidonique.

L'auto-oxydation des petites molécules telles que les monoamines, le glucose et de l'hémoglobine peut être à l'origine de la production de ERO. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'anion superoxyde (SERVAIS, 2004 ; GUEYE, 2007).

La figure 17 récapitule les différentes sources de radicaux libres.

3.2 Systèmes de défenses antioxydants

Les ERO, molécules produites par divers mécanismes physiologiques, sont utiles à l'organisme à une certaine dose, mais leur production peut devenir excessive ou résulter de mécanismes toxiques exogènes (GUEYE, 2007). L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficace contre la surproduction d'ERO et de ERN.

Le terme antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable (protéine, lipide, acide nucléique), retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (HALLIWEL, 1995).

La nature du système antioxydant varie en fonction des tissus et les types cellulaires et selon qu'il s'agisse de milieu intracellulaire ou extracellulaire (CHAUDIÈRE et FERRARI-ILIOU, 1999). Dans l'organisme, on distingue des systèmes antioxydants enzymatiques et des systèmes non enzymatiques.

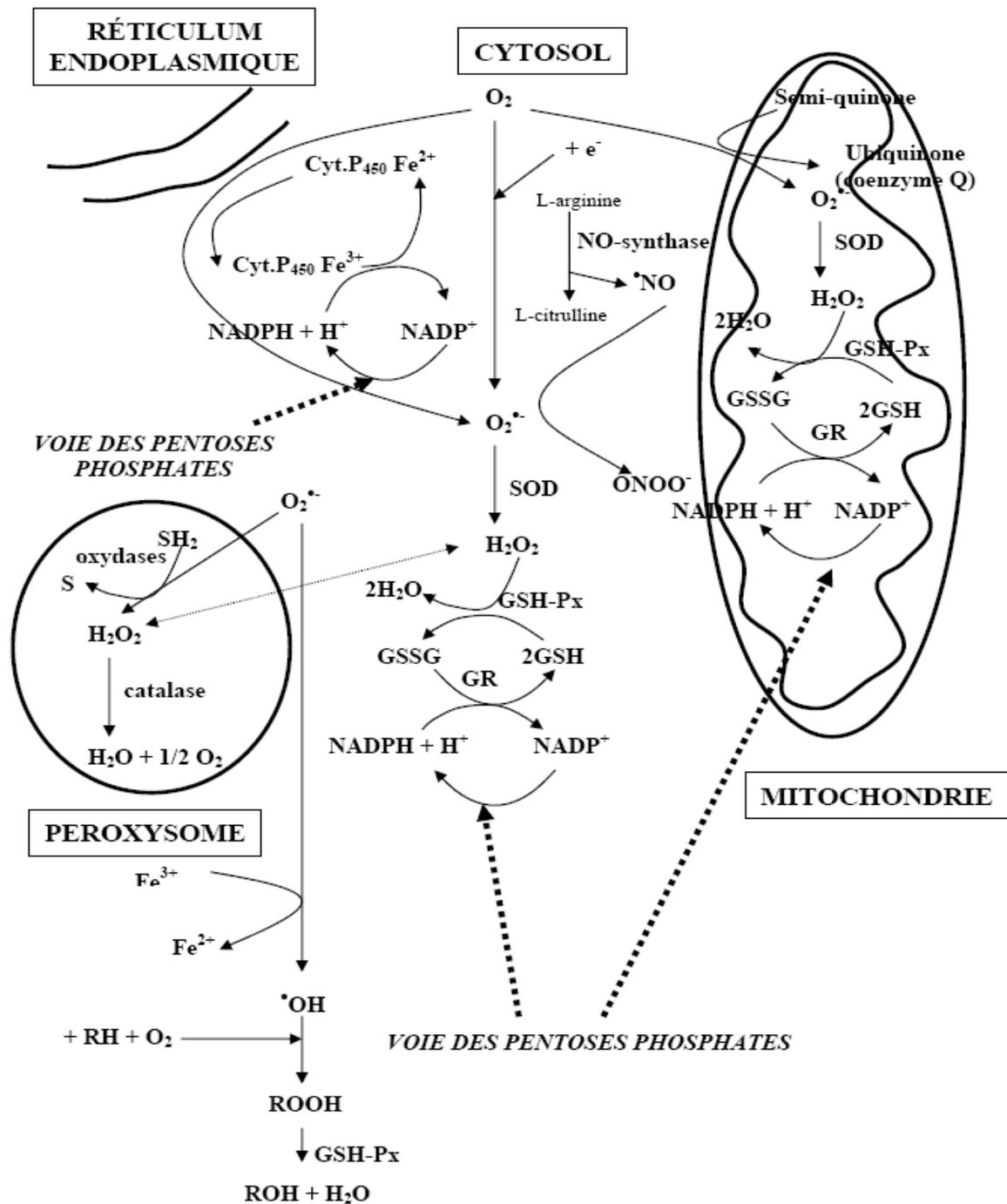


Figure 17: Principales sources cellulaires de radicaux libres (GUEYE, 2007). RH: acide gras polyinsaturé, SH₂: substrat réducteur, S: substrat oxydé, SOD: superoxyde dismutase, GSH-Px: glutathion peroxydase, GR: glutathion réductase, GSH: glutathion réduit, GSSG: glutathion oxydé.

3.2.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

- **Superoxyde dismutase**

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des enzymes ubiquitaires catalysant la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (JANUEL, 2003 ; AFONSO *et al.*, 2007) selon la réaction suivante donnée par la figure 18 :

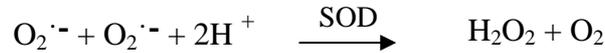


Figure 18 : Dismutation de l'anion superoxyde par la SOD.

- **Catalase**

La catalase ou CAT est une protéine hémique composée de 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec Fe^{3+} lié au site actif (GUEYE, 2007). Elle catalyse la dismutation du H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante donnée par la figure 19 :



Figure 19 : Dismutation du peroxyde d'hydrogène par la CAT.

La CAT se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules (JANUEL, 2003) mais aussi dans le cytoplasme (SERVAIS, 2004).

- **Glutathion peroxydase**

La glutathion peroxydase (GPx) fait partie d'un système complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H_2O_2 mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de la peroxydation des lipides (SERVAIS, 2004).

La GPx est l'enzyme clef du système et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion oxydé (GSSG) est réduit par la glutathion réductase (GR). Les réactions mises en jeu sont les suivantes et représentées par la figure 20 :

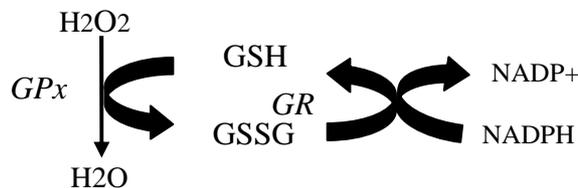


Figure 20 : L'élimination du H_2O_2 par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR.

- **Peroxyredoxines**

Les peroxyredoxines, ou thioredoxines peroxydases ont été découvertes assez récemment, exercent leur rôle antioxydant à travers leur activité peroxydase, ou H_2O_2 , le peroxynitrite et de nombreux hydroperoxydes sont des substrats (NETTO *et al.*, 2007).

Leur rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes est expliqué par leur quantité importante et par leur large distribution dans la cellule (cytosol, mitochondries, peroxysomes, associées au noyau ou aux membranes) (HALLIWELL, 2006).

D'autres enzymes comme les thiorédoxines réductases et l'hème oxygénase présentent également une activité antioxydante relativement importante (RAHMAN *et al.*, 2006).

3.2.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques

L'action protectrice des enzymes est complétée par des molécules antioxydantes pouvant être d'origine endogène, synthétisées par l'organisme, ou exogène lorsqu'elles sont apportées par l'alimentation (MOURE *et al.*, 2001; BENZIE, 2003 ; BERGER, 2005 ; PINCEMAIL *et al.*, 2007).

- **Composés endogènes**

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, l'acide lipoïque, le coenzyme Q, l'albumine,... etc (ROZANOWSKA *et al.*, 1999 ; BACOT, 2004 ; BUDNIKOV et ZIYATDINOVA, 2005 ; JAMES *et al.*, 2004 ; SERAFINI, 2006).

Le GSH, le thiol majeur au niveau intracellulaire, est l'antioxydant endogène le plus important qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes et le $NO\cdot$ (BLOUET, 2006).

Des protéines comme la transferrine, la ferritine, la céruléoplasmine, agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+} / Fe^{3+} ou Cu^{2+} / Cu^+ et les maintiennent dans un état inactif pour la formation d'ERO par la réaction de Fenton (PINCEMAIL *et al.*, 2002 ; SERAFINI, 2006).

Les protéines du choc thermique ("heat shock protein") interviennent aussi en protégeant les biomolécules contre les agressions, notamment les oxydations (PENG *et al.*, 2000 ; WIRTH *et al.*, 2003 ; GUEYE, 2007).

- **Composés exogènes**

Des composés tels que la vitamine E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), les caroténoïdes et les PP, apportés par l'alimentation, agissent en piégeant les RL et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (NEVE, 2002 ; PINCEMAIL et DEFRAIGNE, 2003 ; BERGER, 2005 ; SOARES, 2005 ; GUEYE, 2007).

La figure 21 illustre la régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défense antioxydants.

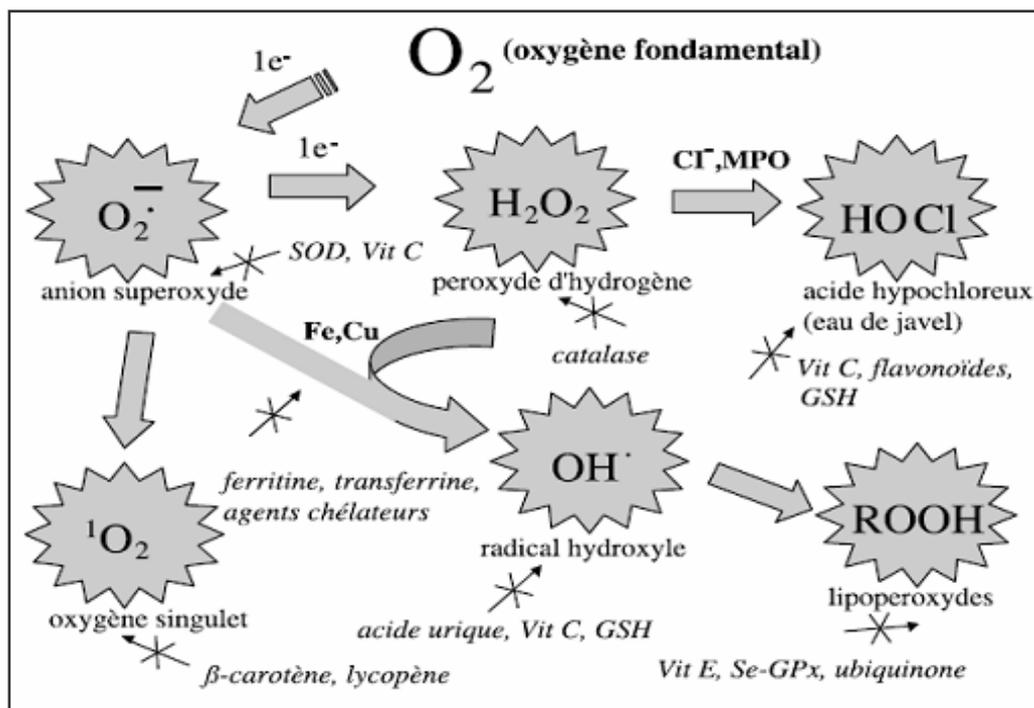


Figure 21 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydants (PINCEMAIL et *al.*, 2002). MPO : myeloperoxidase.

3.3 Stress oxydatif

- **Définition et origines**

A de faibles concentrations, les ERO, ou les ERA, sont impliquées dans la modulation de la fonction cellulaire (différenciation, prolifération, apoptose), dans les voies de signalisation cellulaire (second messenger, action sur l'expression des gènes) et dans la modulation de la réponse immunitaire (THANNICKAL et FANBURG, 2000 ; SEIFRIED et *al.*, 2007). A des concentrations plus élevées, ces radicaux peuvent être néfastes (COULON, 2004).

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif est la conséquence d'un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défense antioxydants et la production d'ERO, en faveur de ces derniers (BACOT, 2004 ; BERGER, 2006).

Une surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, rayons UV et gamma, herbicides, métaux toxiques), une activité physique intense (NEVE, 2002 ; COULON, 2004 ; GUEYE, 2007), sont autant de facteurs pouvant être à l'origine du stress oxydatif.

- **Conséquences**

Les dommages liés à un stress oxydant se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN, des protéines (WINYARD et

al., 2005), des lipides, des glucides ou encore de la perturbation des voies de signalisation cellulaires (OWUOR et KONG, 2002 ; SOARES, 2005, WINYARD *et al.*, 2005).

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant est ainsi un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies multifactorielles (les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les rhumatismes, les maladies neurodégénératives...etc) et l'accélération du processus du vieillissement (HALLIWELL et GROOTVELD, 1987 ; DARLEY-USMAR *et al.*, 1995 ; ALLEN, 1998 ; JANUEL, 2003 ; SORG, 2004 ; SOARES, 2005 ; BLOUET, 2006 ; AFONSO *et al.*, 2007 ; VALKO *et al.*, 2007).

3.4 Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Ces méthodes impliquent essentiellement l'interaction avec les RL ou l'interaction avec les métaux.

Plusieurs méthodes permettant l'évaluation de la capacité antioxydante *in vitro* sont utilisées (ANTOLOVICH *et al.*, 2002 ; ARUOMA, 2003 ; BUDNIKOV et ZIYATDINOVA, 2005 ; ROGINSKY et LISSI, 2005 ; APAK *et al.*, 2007 ; LAGUERRE *et al.*, 2007). Certaines de ces procédures examinent l'inhibition par les antioxydants de la production des RL ou encore mesurent ou évaluent l'inhibition par ces mêmes molécules des divers composants de la réaction d'oxydation. Certaines de ces méthodes sont données ci-dessous.

3.4.1 Mesure de la déplétion en oxygène

L'étude cinétique de la consommation de l'oxygène permet de mesurer la durée de la phase d'initiation de la peroxydation lipidique en présence d'agents antioxydants. Ces méthodes mesurent l'augmentation du poids consécutive à la fixation d'oxygène sur les acides gras. La mesure optique de la consommation de l'oxygène a également été développée (WANG *al.*, 1991 ; BERSET et CUVELIER, 1996).

3.4.2 Piégeage de radicaux libres

Il existe plusieurs tests qui visent à tester l'activité de piégeage des RL parmi lesquels le test au 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le test de l'acide 2,2'-Azino-bis(3 ethylbenzthiozoline-6-sulphonique (ABTS), et le test de la réduction du radical Fermy's (MILLER *al.*, 1993 ; GARDNER *al.*, 1998 ; NENADIS et TSIMIDOU, 2002).

Pour l'ensemble de ces tests, la concentration du radical dans le milieu réactionnel est suivie par spectrophotométrie. La diminution de l'absorbance du radical en présence de l'antioxydant renseigne sur la capacité de piégeage de RL.

Une autre version DPPH, combinée avec l'analyse HPLC est suggérée par BANDONIENE et MUKOVIC (2002).

FOGLIANO *et al.* (1999) ont proposé également une autre version du test ABTS plus simple, plus productible et moins coûteuse où ABTS+ est remplacé par le radical-cation stable DMPD+ dérivé de N,N-diméthylphénylènediamine.

3.4.3 Mesure de la disparition du substrat

Dans ce type de tests, la réduction de la décoloration de substrats comme la corcine (test de décoloration de la corcine) et de β -carotène (test de décoloration de la β -carotène) est suivie en présence de substances antioxydantes (MILLER, 1971 ; BORS *al.*, 1984 ; TUBARO *al.*, 1998). La décoloration de la corcine et de la β -carotène est induite respectivement par les radicaux peroxydes et les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

La disparition du substrat peut être également suivie par des méthodes utilisant des composés luminescents tels que le luminol. L'atténuation de la chemiluminescence est produite en présence d'antioxydants (ROGINSKY et LISSI, 2005).

3.4.4 Mesure des produits d'oxydation

L'oxydation des systèmes complexes génère certains produits d'oxydation détectables par des méthodes physicochimiques.

La peroxydation lipidique peut être suivie par le dosage de produits d'oxydation primaires tels que les hydroperoxydes et les diènes conjugués. Des produits d'oxydation secondaires sont également quantifiés à l'exemple du malondialdéhyde (MDA).

On parle également de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Plusieurs substrats ont été utilisés dans la détermination de TBARS, incluant les échantillons tissulaires, l'acide linoléique, d'autres acides gras et les LDL (LAGUERRE *et al.*, 2007).

D'autres analytes volatiles principalement des cétones, des alcools et des hydrocarbures pouvant être également dosés pour l'évaluation de la peroxydation lipidique.

3.4.5 Autres méthodes

- **Méthodes utilisant les substances fluorescentes**

Dans Le test phycoerythrine, des protéines naturelles hautement fluorescentes β -phycoerythrine et R-phycoerythrine (PE), sont utilisées (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

L'intensité de la fluorescence de PE diminue avec le temps sous le flux du radical peroxy formé par thermolyse du radical 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride (APPH). La présence d'un antioxydant inhibe ou ralentit la diminution de l'intensité de la fluorescence. Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et le test TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter) ont le même principe, avec comme différence la protéine fluorescente utilisée et la manière dont les résultats sont exprimés (LISSI *et al.*, 1995 ; CAO *et al.*, 1997).

- **Méthodes basées sur la réduction d'ions métalliques**

Le test FRAP (ferric reducing antioxidant power) et le test de l'activité réductrice sur le ferricyanure de potassium, sont basés sur la capacité des phénols à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} . La réduction est accompagnée par la formation de complexes colorés avec le fer réduit (ANTOLOVICH *et al.*, 2002 ; ARUOMA, 2003 ; APAK *et al.*, 2007).

La capacité des molécules antioxydantes à réduire le cuivre et le molybdène sont également utilisées pour l'évaluation de leur pouvoir antioxydant (APAK *et al.*, 2007).

3.5 Les marqueurs biologiques du stress oxydatif

En absence de systèmes anti-oxydants suffisamment efficaces, une surproduction de RL est capable de provoquer des lésions directes de molécules biologiques telles que l'oxydation des acides nucléiques, des lipides, et des protéines (DE ZWART et *al.*, 1999) ainsi que la modulation de certains processus de signalisation cellulaire (PAHLAVANI et REMMEN, 1997 ; KLOTZ, 2005).

3.5.1 Mesure de radicaux libres

Les difficultés dans la mesure des RL résident dans le fait que leur durée de vie est extrêmement courte et leur lieu de production est souvent inaccessible à la biopsie ou que le prélèvement n'est pas sans danger.

Les RL peuvent être mesurés généralement grâce à l'utilisation de la résonance para-électronique (GUEYE, 2007).

3.5.2 Mesure des systèmes anti-oxydants

Il est possible, pour évaluer un stress oxydant, de mesurer l'activité de certaines enzymes antioxydantes (SOD, Gpx, GR, CAT, et la thioréductase) ou de mesurer la concentration de tous les antioxydants non enzymatiques (vit C, glutathion, tocophérol, β -carotène, ubiquinol).

Ces déterminations sont possibles aussi bien dans le sérum qu'au niveau des éléments figurés du sang et même dans les organes.

3.5.3 Marqueurs de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique désigne l'attaque des lipides (principalement les acides gras polyinsaturés) par des RL, comme le radical hydroxyle (HO•), et former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette attaque des lipides peut concerner aussi bien les phospholipides membranaires que les lipoprotéines circulantes (GUEYE, 2007).

Les radicaux diènes conjugués, sous l'action de l'oxygène, se transforment en hydroperoxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et alcanes volatiles.

Selon LEFEVRE et *al.* (1998), les produits issus de la peroxydation lipidique semblent être les meilleurs marqueurs du stress oxydant dont l'isoprostane, le MDA, le 4-hydroxynonéal (DE ZWART et *al.*, 1999 ; CRACOWSKI et *al.*, 2000 ; LUBRANO et *al.*, 2002 ; BACOT, 2004 ; SERVAIS, 2004 ; DURAND et *al.*, 2005).

Les principales réactions (1 à 6) de la peroxydation lipidique sont données par la figure 22.

Ce processus est déclenché par la capture de l'atome d'hydrogène par un radical initiateur de l'oxydation tel que $\cdot\text{OH}$, qui mène à la formation du radical alkyl L \cdot (réaction 1 : étape d'initiation). Ce dernier réagit avec l'oxygène pour former les radicaux peroxydes LOO \cdot (réaction 2), qui peuvent capturer des atomes d'hydrogène de molécules avoisinantes (LH), avec production des hydroperoxydes lipides (LOOH) (Réaction 3). La répétition des réactions 2 et 3 constitue l'étape de propagation (réactions en chaîne). Cette étape prend fin

par la réaction entre deux RL, produisant des produits non radicalaires : c'est l'étape de terminaison (réactions 10 –12).

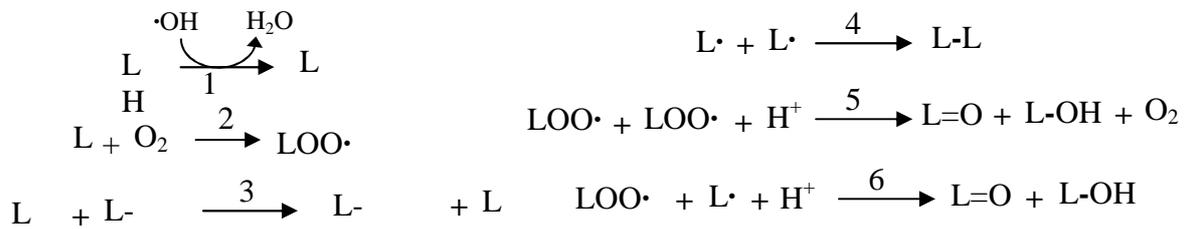


Figure 22 : Les principales réactions de la peroxydation lipidique (WLODEK et KUSIOR, 2006).

Un exemple de mécanisme d'oxydation d'un acide gras qu'est l'acide arachidonique ainsi que les produits d'oxydation obtenus sont illustrés dans la figure 23.

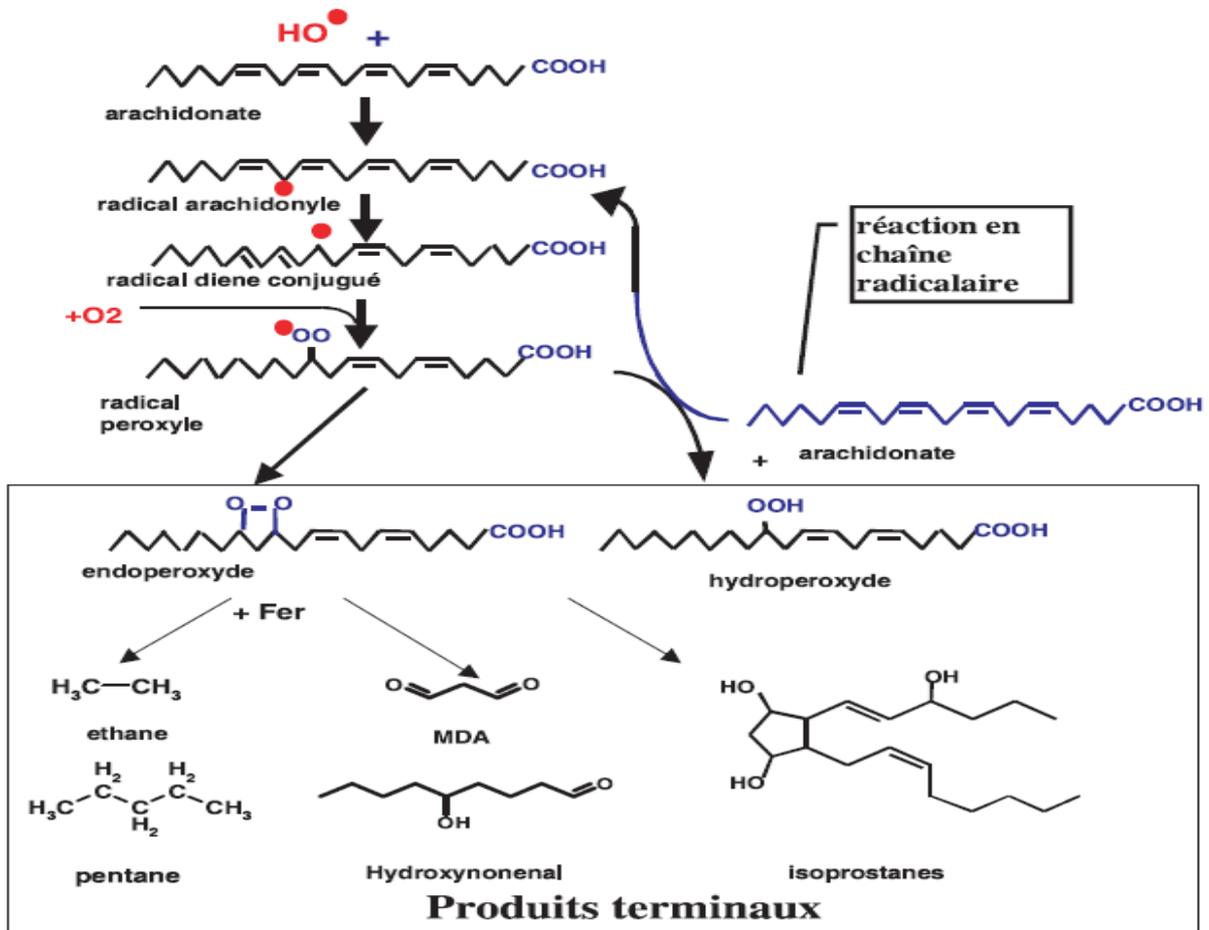


Figure 23 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (FAVIER, 2003).

3.5.4 Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés

Les protéines peuvent également être la cible de réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications sous l'action des ERO et des ERN, ou des métaux de transition (STADTMAN, 1990).

Les dommages oxydatifs induits sur les protéines par les RL peuvent conduire à des modifications structurales (dimérisation, polymérisation, fragmentation, modification des acides aminés) et fonctionnelles (perte d'activité enzymatique, altération du processus de la protéolyse) (DE ZWART et al., 1999 ; FAVIER, 2003 ; HENNEBELLE, 2006).

Des marqueurs d'oxydation des protéines, en particulier le sulfoxyde de méthionine, la nitrotyrosine et l'ortho-tyrosine, les groupements carbonylés ou dicarbonylés ont été décrits comme présentant une meilleure spécificité (DAVIES et al., 1999; FAVIER, 2003).

L'essentiel du mécanisme de la formation de groupements carbonyles protéiques est donné par la figure 24. Un RL à l'exemple du radical hydroxyle, peut provoquer la coupure de la chaîne peptidique avec formation d'un groupement carbonylé. Brièvement l'arrachement d'un radical hydrogène par $\cdot\text{OH}$ sur le C_α forme un $\text{C}\cdot$ qui peut réagir avec O_2 et former un radical hydroperoxyde. Celui-ci peut se dégrader après formation d'intermédiaires en composé carbonylé (LEVINE et al., 2000 ; BOURDON et al., 2004).

La modification de protéines par oxydation est un agent causal et un facteur de risque de plusieurs maladies liées au vieillissement (maladie d'Alzheimer, parkinson...etc) (HOUSSET, 1990 ; HENNEBELLE, 2006).

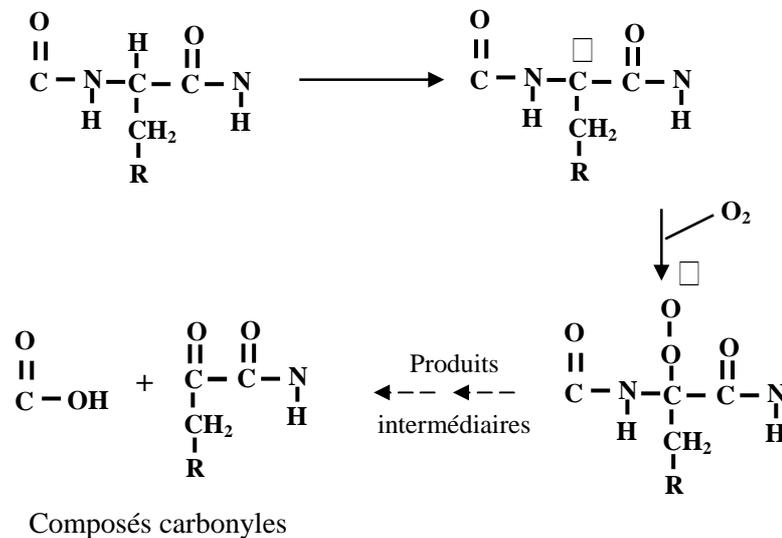


Figure 24 : Mécanisme de la formation de groupements carbonyles (BOURDON, 2004).

3.5.5 Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques

Les acides ribo- et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) constituent des cibles cellulaires importantes pour les attaques radicalaires (HALLIWELL 1999 ; HALLIWELL, 2002 ; COLLINS, 2005). Des modifications de bases, des cassures simple-brin ou double-brin de la chaîne oligonucléotidique peuvent être produites (FAVIER, 2003 ; HENNEBELLE, 2006). Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la répllication du génome.

De nombreux produits de réaction des RL sur l'ADN ont été identifiés, tels que la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine et la thymidine glycol. Ces derniers se sont révélés être les

marqueurs les plus intéressants de l'oxydation de l'ADN (WISEMAN et *al.*, 1995 ; WISEMAN et HALLIWELL, 1996 ; DE ZWART et *al.*, 1999).

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les ERO attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage (FAVIER, 2003).

Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H₂O₂ et •OH, qui entraîneront la coupure de protéines ou de leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glyco-oxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires (FAVIER, 2003).

3.6 Stress oxydant dans les globules rouges

3.6.1 Structure et organisation du globule rouge

Le globule rouge (hématie, érythrocyte) est une cellule anucléée ayant la forme d'un disque biconcave. Il présente un diamètre de 7,5 microns et une épaisseur de 2,5 microns sur les bords et de 1 micron au centre. C'est une cellule très déformable et élastique (OPREA-MITROFAN, 2006).

La fonction principale du globule rouge est de véhiculer l'oxygène dans l'organisme. Pour se faire, l'hématie doit maintenir son élasticité membranaire et doit conserver son hémoglobine (Hb) à l'état fonctionnel où le fer héminique est à l'état ferreux (ÇIMEN, 2008).

➤ La membrane des globules rouges

Comme toutes les membranes vivantes, la membrane érythrocytaire est composée de deux couches monomoléculaires de lipides dans lesquelles sont localisées de nombreuses protéines membranaires.

Elle renferme 50% de protéines, 40% de lipides et 10% de glucides. Ces derniers, appelés glycanes, sont conjugués soit à des protéines (glycoprotéines), soit à des lipides (glycolipides) (OPREA-MITROFAN, 2006 ; ÇIMEN, 2008).

• Les protéines

La membrane érythrocytaire contient près d'une dizaine de protéines majeures et plusieurs protéines mineures qui ont été mises en évidence en 1982 par électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide (ROSENBLUM et *al.*, 1982).

La nomenclature des protéines majeures est déterminée par leur mobilité en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodécylsulfate de sodium (SDS) (PAGE-SDS) qui les sépare en fonction de leur masse moléculaire. Les résultats obtenus par l'électrophorèse ont conduit à l'introduction de la notion de "bande" pour définir ces protéines. Pour les identifier, ces bandes ont été numérotées dans l'ordre décroissant de leurs masses moléculaires (OPREA-MITROFAN, 2006).

Ces protéines ont un rôle dans le contrôle de la forme cellulaire, de l'attachement à d'autres cellules ou substrats et à l'organisation de domaines spécialisés de la membrane (ÇIMEN, 2008).

Les protéines membranaires du globule rouge ont été classées en deux catégories: les protéines intégrées et les protéines périphériques. Les plus importantes sont données ci-dessous.

○ **Protéines intégrées**

Les protéines intégrées sont associées directement aux acides gras des lipides membranaires grâce aux séquences d'acides aminés hydrophobes qu'elles contiennent (SCHENKEL-BRUNNER, 1995).

-La protéine bande 3

La bande 3 est une protéine transmembranaire, composée de domaines protéiques bien distincts de point de vue structural et fonctionnel. Le domaine c-terminal traverse les couches lipidiques de la membrane et contrôle les échanges anioniques. Le domaine amino-terminal est cytosolique et interagit avec l'ankyrine. Elle a PM de 95 kDa (OPREA-MITROFAN, 2006 ; YIQIN et JUNFAN, 2007).

-Les glycophorines

Les plus importantes sialoglycoprotéines sont les glycophorines (GP) (A, B, C, D, E). La GPA est la plus sialylée des glycoprotéines de la membrane érythrocytaire (50%), elle porte donc la plupart des charges négatives de cette dernière. Leur PM va de 17 à 36 kDa (OPREA-MITROFAN, 2006 ; YIQIN et JUNFAN, 2007).

La GPA est reconnue comme une glycoprotéine très importante dans le domaine de l'immunologie en raison du fait qu'elle porte les déterminants de quelques épitopes spécifiques du système ABO (OPREA-MITROFAN, 2006).

○ **Protéines périphériques du cytosquelette**

Le cytosquelette est associé à la surface cytoplasmique de la membrane et est formé par différents polypeptides qui interagissent fortement entre eux et avec les protéines transmembranaires.

-La spectrine (α et β)

Elle représente 25 à 30% des protéines totales de la membrane (GALLAGHER et FORGET, 1993). C'est une longue protéine fibrillaire constituée de 2 chaînes polypeptidiques : α (ou bande 1) ayant un PM de 240 kDa et β (ou bande 2) de PM de 220 kDa. Ces hétérodimères s'associent en tétramères. Les tétramères de spectrine s'unissent à leur extrémité distale par l'intermédiaire de courts filaments d'actine (GALLAGHER et FORGET, 1993 ; OPREA-MITROFAN, 2006 ; YIQIN et JUNFAN, 2007).

- la protéine 4.1

Elle représente environ 6% des protéines membranaires totales et peut être séparée par PAGE-SDS en deux isoformes (4.1a et 4.1b) avec des PM de 80 et 78 kDa respectivement. Cette protéine facilite les interactions entre l'actine et la spectrine (OPREA-MITROFAN, 2006 ; YIQIN et JUNFAN, 2007).

-L'actine (ou bande 5)

L'actine, un autre composant majeur du cytosquelette, est lié à la spectrine par l'intermédiaire de la bande 4.1. Elle fait partie du complexe de jonction et représente l'une des

deux protéines qui assurent la continuité entre le cytosquelette et la membrane plasmique (OPREA-MITROFAN, 2006).

-L'ankyrine (ou bande 2.1)

L'ankyrine, la protéine d'ancrage, a pour rôle de rattacher le squelette membranaire au reste de la membrane. Elle possède deux domaines, l'un se lie spécifiquement et fortement à une zone particulière de la chaîne β de la spectrine et l'autre se lie à une région de la protéine de la bande 3 (PETERS et LUX, 1993).

- **Les lipides**

La majorité des lipides de la membrane érythrocytaire sont représentés par les phospholipides (20%), le cholestérol (16%) et les glycolipides (4%).

- **Les phospholipides**

Les phospholipides prédominants sont la phosphatidylcholine (28%), la phosphatidyléthanolamine (26%), la sphingomyéline (25%) et la phosphatidylsérine (13%). On trouve aussi, en faibles quantités, l'acide phosphatidique (2%), le phosphatidylinositol (1%) et la lysophosphatidylcholine (1%). Les lipides sont répartis asymétriquement dans la membrane, la majeure partie de la phosphatidylcholine (65-75%) et la sphingomyéline est orientée vers l'extérieur de la cellule, tandis que la phosphatidylsérine (96%) est dans le cytoplasme (OPREA-MITROFAN, 2006).

- **Le cholestérol**

Le cholestérol et ses esters font partis d'une classe de lipides membranaires, les stéroïdes. Ils représentent 30 à 50 % des lipides des membranes plasmiques. Son rôle est de stabiliser et de maintenir la fluidité de la membrane (OPREA-MITROFAN, 2006).

- **Les glycolipides**

Une partie des lipides sont glycosylés et constituent la classe des glycolipides qui sont représentés par les globosides, les trihexoside-céramides et les dihexoside-céramides.

Les glycophorines érythrocytaires s'intègrent entre les phospholipides dans la couche bilamellaire, avec les longs axes hydrophobes des acides gras plantés dans la couche lipidique (OPREA-MITROFAN, 2006).

Le schéma de la structure de la membrane du globule rouge est donné par la figure 25.

3.6.2 Etat redox érythrocytaire

La richesse du globule rouge en oxygène, en Hb et en fer ainsi que la membrane érythrocytaire en acides gras poly-insaturés, rend le globule rouge susceptible aux dommages peroxydatifs.

Différents facteurs mènent à la formation des RL ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HO\cdot$) dans les érythrocytes dont l'auto-oxydation de l'Hb et la réaction de Fenton (DUMASWALA et ZHUO, 1999).

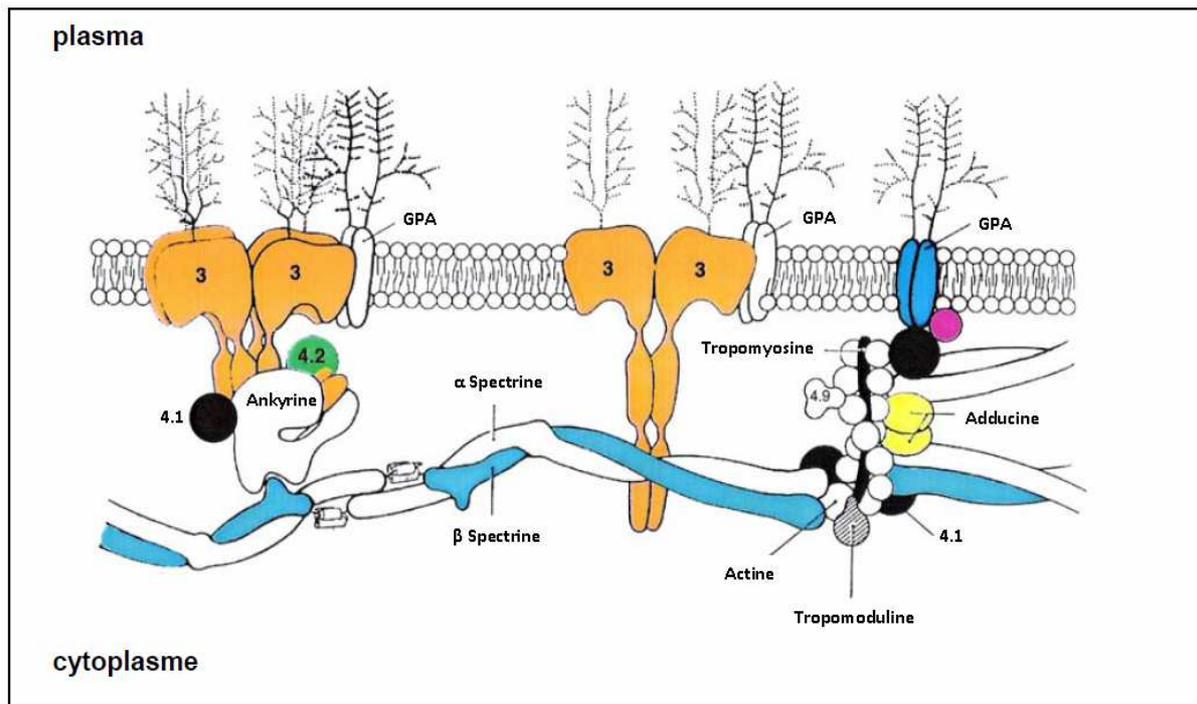


Figure 25 : Schéma de la membrane du globule rouge (YIQIN et JUNFAN, 2007). 3 : bande 3; GPA et GPC: glycophorine A et C respectivement; 4.1 : bande 4.1 ; 4.2 : bande 4.2

3.6.3 Systèmes de défense antioxydante du globule rouge

Les hématies tout comme les autres cellules de l'organisme sont dotées d'un système de défense antioxydant englobant les défenses non enzymatiques (vitamine E, caroténoïdes, la vit C, glutathion, acide urique, céruloplasmine, transferrine, haptoglobine, bilirubine) et enzymatiques (la SOD, la CAT, la GPx) (ÇIMEN, 2008).

L'Hb présente également des propriétés antioxydantes. Ainsi les globules rouges sont les piegeurs majeurs de NO dans la circulation (SCOTT et *al.*, 1993 ; ÇIMEN, 2008).

Un autre système antioxydant correspond à un complexe protéolytique multicatalytique. Ce complexe appelé les hydrolases de protéines oxydées (Oxidized protein hydrolase) ou OPH est responsable de la dégradation des protéines intracellulaires dans les érythrocytes. Ces protéases dégradent préférentiellement les agrégats de protéines oxydées (FUJINO et *al.*, 2000).

2^{ème} Partie :
Partie expérimentale

I- Matériels et méthodes

Le travail expérimental est réalisé au sein du laboratoire de biochimie appliquée et biotechnologies de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université Moloud Mammeri de Tizi Ouzou.

1-1 Matériels

• Appareils

Les appareils utilisés sont les suivants:

- Evaporateur rotatif (IKA-DEST);
- unité d'électrophorèse sur mini cuves verticales (Hoeffer SE 200) comprenant : cuves d'électrophorèse, générateur de courant (max : 250V et 100mA), plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 x 8 cm), espaceurs d'épaisseurs variées (0,75 ; 1 ; 1,5 mm) ;
- balance de précision à 0,01mg (SARTORIUS) et balances analytiques à affichage digital (0,01g) (Denver Instrument) ;
- spectrophotomètre UV Visible (SCHIMADZU, Japon) ;
- pH mètre (Hanna-instruments) ;
- lyophilisateur à plateau (BETA, Allemagne) ;
- centrifugeuses: normale non réfrigéré (max 16000xg, SIGMA); réfrigérée, max 28 000 x g (SIGMA) ;
- agitateurs variés (de tubes, à plateau, à barreaux magnétiques chauffant et non chauffant...);
- bain Marie (Memmert, Allemagne) ;
- dégazeur à ultrason (NEY 19B, USA);

• Petit matériel

- Verrerie (fiolle à vide, béchers, erlen Meyer, fiolle à vide, fioles à jauge, éprouvettes, entonnoirs, mortier ...);
- micropipettes, micro-seringue Hamilton ;
- papier Watman N° 40.

• Produits chimiques et réactifs

▪ Réactifs spécifiques

Acrylamide, N, N'-méthylène-bis-acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, dodécyl sulfate de sodium (SDS), glycine, β -mercaptoéthanol, persulfate d'ammonium, N, N, N', N' tétraméthyléthylène diamine (TEMED), réactif de Folin-Ciocalteu, composés phénoliques (acide gallique, acide caféique et acide tannique), acide ascorbique (vitamine C), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot), peroxyde d'hydrogène.

▪ Sels

Carbonate de sodium, chlorure de sodium, hydroxyde de sodium, persulfate d'ammonium, sulfate d'ammonium, tartrate de sodium, trishydroxyméthylaminométhane (TRIS), ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆), chlorure de fer (FeCl₃), molybdate d'ammonium

((NH₄)₂ MoO₄), phosphate de sodium (NaH₂PO₄, Na₂H₂PO₄), sulfate de fer (FeSO₄), chlorure de sodium (NaCl) et azide de sodium.

- **Acides**

Acide acétique, acide chlorhydrique, acide trichloroacétique.

- **Solvants organiques**

Méthanol, acétate d'éthyle, hexane, éthanol, glycérol.

- **Matériel végétal**

Des olives vertes de la variété *chamlal* ont été récoltées dans la région de Kabylie (TIZI-OUZOU) précisément au village de MEZDATAT-BETROUNA le 27 Octobre 2007.

Les olives justes après leur récolte, ont été nettoyées puis pesées est réparties en fractions de 200g dans des sachets puis congelées à une température de -20°C.

- **Matériel biologique**

- **Préparation des érythrocytes**

Les expériences ont été réalisées sur du sang sain humain récolté sur héparine ou citrate comme anticoagulants. Les érythrocytes sont isolés et stockés à 4°C selon YUAN et *al.*, (2005).

Les cellules sanguines ont été, dans un premier temps, isolées par centrifugation à 3000xg du sang récolté, pendant 10 minutes à 4°C. Le plasma et la couche de globules blancs (buffy coat) ont été enlevés par aspiration et les érythrocytes ont été repris dans un tampon isotonique, le tampon phosphate salin (PBS) pH 7,4. Après mélange par retournement, l'échantillon a été centrifugé à nouveau (3000xg, 10min, 4°C), le surnageant a été enlevé soigneusement par pipetage au moyen d'une pipette pasteur ou d'une micropipette. Le lavage a été répété 2 fois.

Les érythrocytes lavés sont resuspendus dans le même volume de PBS. Les échantillons sont conservés à 4°C.

- **Préparation des membranes érythrocytaires**

La préparation des membranes érythrocytaires a été réalisée en utilisant la méthode proposée par SHIVA SHANKAR REDDY et *al.* (2007).

Selon cette méthode, à environ 2 ml de sédiment érythrocytaire préalablement lavé, est rajouté 28 ml de tampon PBS hypotonique (20 mOsm, pH 7,4) (tampon de lyse) et après agitation douce, les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 40 min à 20 000xg.

Après centrifugation, le surnageant a été décanté en évitant d'entraîner les membranes puis éliminé délicatement par aspiration, tandis que le culot a été resuspendu dans le même tampon de lyse pour une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions.

Un total de 4 lavages a été nécessaire pour que les membranes soient pratiquement dépourvues de toute trace visible d'hémoglobine.

Enfin les membranes sont resuspendues dans le même volume de tampon isotonique (PBS) et conservées à 4°C.

○ **Protéines**

- Sérum albumine bovine (BSA), (SIGMA ; USA) ;
- protéines marqueurs : Un kit pour l'étalonnage des gels d'électrophorèse en PAGE-SDS a été utilisé. Ce kit, préparé au sein du laboratoire LABAB comprends 4 protéines de PM connu : l' α -lactalbumine, la β -lactoglobuline, l'ovalbumine et BSA.
- Hémoglobine (SIGMA ; USA).

1.2 Méthodes

1.2.1 Extraction des composés phénoliques

La procédure suivie pour l'extraction des CP totaux de la pulpe d'olives vertes est basée sur la méthode décrite par BRENES et *al.*, (1995) avec certaines modifications introduites par SAVARESE et *al.*, (2007).

La pulpe d'olive (10g) a été d'abord broyée puis mélangée avec un système de solvant méthanol: eau (80/20, v/v). L'extraction est réalisée sous agitation à température ambiante pendant 30min. Le mélange est par la suite centrifugé pendant 10 min à 3000xg. Le surnageant est filtré sous vide à travers un papier Watman n° 40.

Cette extraction est répétée trois fois sur le culot de pulpe récupéré après chaque centrifugation. L'extrait au méthanol aqueux est collecté et le solvant organique est évaporé à 40°C

sous vide au rotavapor. La phase aqueuse est récupérée puis délipidée au moyen de l'hexane. Les CP sont ensuite extraits avec l'acétate d'éthyle à partir de l'extrait aqueux délipidé.

Après évaporation de l'acétate d'éthyle sous vide, le résidu sec est solubilisé dans 2 ml du méthanol. Le protocole d'extraction est illustré dans la figure 26.

Plusieurs études rapportent que les solvants polaires sont les plus employés pour l'extraction des PP (OBIED et *al.*, 2005).

Le mélange méthanol-eau a été déterminé comme étant le meilleur solvant d'extraction des PP à partir de la pulpe d'olive. Un temps d'extraction de 30 minutes donne un rendement maximal (RYAN et *al.*, 2001 ; OBIED et *al.*, 2005).

Le solvant utilisé pour l'extraction des CPO est le mélange méthanol-eau (80 :20, v/v). MONTEDORO et *al.* (1992), ont rapporté que ce mélange est le solvant d'extraction le plus efficace pour les CP simples et hydrolysables.

L'acétate d'éthyle est utilisé pour réaliser des extractions à partir de matrice liquides. Il peut être à l'origine de la perte de certains biophénols glycosylés. Cependant ce solvant est sélectif et est le plus convenable pour extraire les monomères phénoliques à moyen et faible PM grâce à sa polarité importante (LESAGE-MEESSEN et *al.*, 2001 ; ALLOUCHE et *al.*, 2004).

Le lavage par l'hexane permet la délipidation du matériel, ainsi que l'élimination de la chlorophylle et des caroténoïdes, sans perte de CP (RYAN et *al.*, 2001).

Les CP sont des espèces chimiques réactives et sont vulnérables à l'oxydation, la conjugaison, l'hydrolyse, la polymérisation et la complexation. Ceci est aggravé par le contact

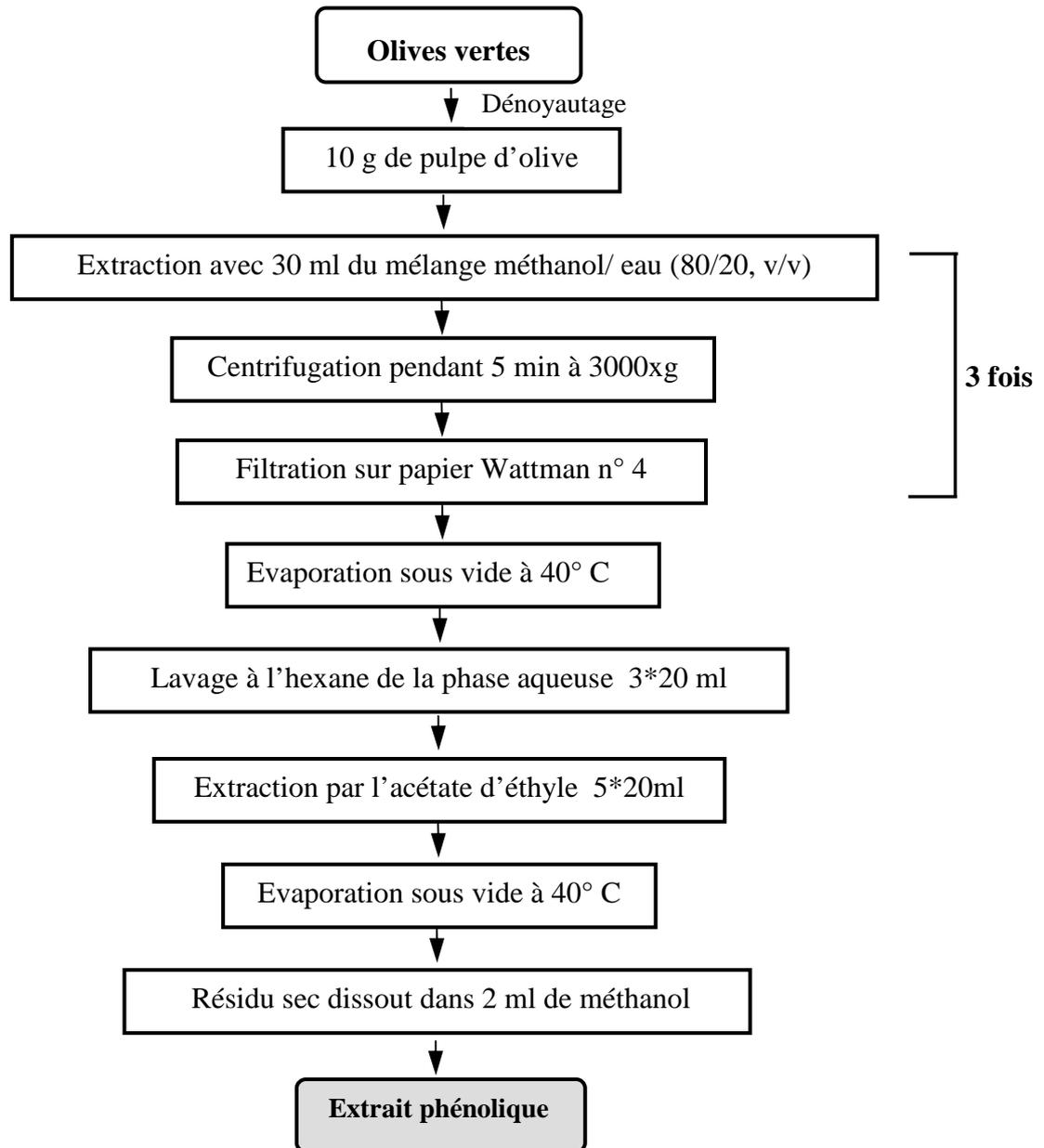


Figure 26 : Protocole d'extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe d'olive (BRENES *et al.*, 1995).

direct avec les enzymes et leurs substrats durant le broyage et la malaxation (OBIED et *al.*, 2005).

Selon OBIED et *al.* 2005, le méthanol agit sur la paroi cellulaire et inhibe l'action enzymatique, une simple stratégie pour supprimer ou réduire l'action enzymatique est d'ajouter le méthanol suivi de l'eau, c'est ce qui a été réalisé au cours de nos extractions.

1.2.2 Dosage des composés phénoliques totaux

- Principe

La concentration des CP totaux a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Elle repose sur la grande oxydabilité des CP. Le réactif utilisé est un mélange de phosphomolybdate et tungstate de sodium, qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en milieu alcalin en un chromogène de couleur bleu. La coloration produite est proportionnelle (absorption maximale comprise entre 725 et 750) à la quantité en phénols totaux.

- Protocole expérimental

Le dosage des CP totaux extraits de la pulpe d'olives (CPO) est réalisé selon la procédure décrite par GUTFINGER (1981).

Un volume de 0,1 ml de l'extrait phénolique de la pulpe d'olive est dilué avec l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume de 5 ml dans un tube à essai de 10 ml. A cela sera additionné 0,5 ml de réactif de Folin Ciocalteu. Après 3 minutes d'incubation, 1 ml de la solution de carbonate de sodium NaCO₃ (35%) est ajouté. Le mélange réactionnel est agité puis dilué jusqu'à un volume final de 10 ml.

Les densités optiques (DO) sont mesurées à 725 nm après une heure d'incubation.

L'acide gallique (AG) est utilisé comme standard pour la préparation de la courbe d'étalonnage dans une gamme allant de 0-100 µg/10ml de la solution d'échantillon.

1.2.3 Etude de l'activité antioxydante

1.2.3.1 Pouvoir réducteur

• Le pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium

- Principe

Le pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium mesure la capacité de l'antioxydant à pouvoir donner les électrons. La réduction des ions ferriques (Fe³⁺) en ions ferreux (Fe²⁺) est évaluée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance de la solution bleu-verte résultante à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance indique un pouvoir réducteur plus élevé.

Le détail réactionnel est donné par les réactions ci-dessous représentées par la figure 27:

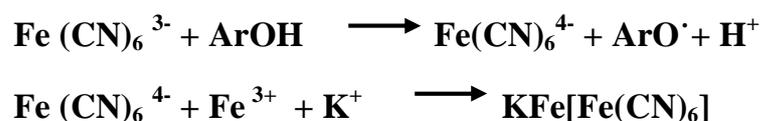


Figure 27 : Les réactions mises en jeu dans le test de ferrocyanure de potassium (APAK et *al.*, 2007).

- Protocole expérimental

L'évaluation du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium est réalisée suivant le protocole décrit par OYAIKU (1986).

Un volume de 2,5 ml de différentes concentrations (0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 et 80µg/ml) des composés à tester (CPO, AG, acide caféique (AC), acide tannique (AT) et vitamine C (vit C)) est mélangé avec 2,5 ml du tampon phosphate pH 6,6 et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$; 1%).

Après incubation à 50 °C pendant 20 minutes, la réaction est arrêtée par l'addition de 2,5 ml de l'acide trichloroacétique (10 % ; P/V). Le mélange est ensuite centrifugé à 1000xg pendant 8 minutes. 2,5ml du surnageant est mélangé avec le même volume d'eau distillée et 1ml d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3$, 0,1 %). L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

Les essais sont réalisés trois fois pour l'ensemble des composés testés.

On note que pour l'ensemble des tests réalisés dans ce travail, l'effet donné en combinant une concentration constante en CPO avec des concentrations croissantes en vit C (la concentration maximale n'excède pas la moitié de celle des CPO) a été déterminée. La concentration en CPO choisie est celle donnant une faible activité. Le but est de savoir est-ce que cette association entre la vit C et les CPO va-t-elle améliorer l'activité testée par synergie.

L'étude du pouvoir réducteur des CPO en présence de vit C est donc réalisée. Ainsi le pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium est déterminé pour une concentration de 20µg/ml de CPO en présence de concentrations croissantes en vit C (2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 9 et 10µg/ml).

- **Test phosphomolybdénique**

- Principe

Ce test est basé sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) par la substance à tester conduisant à la formation d'un complexe phosphate/Mo (V) à pH acide qui absorbe à 695 nm.

- Protocole expérimental

La capacité réductrice de l'extrait phénolique et de certains composés de référence (vit C, AC) est évaluée selon la méthode de PRIETO *et al.* (1999).

Un aliquote de 0,1 ml de l'échantillon à différentes concentrations (200 ; 500 ; 800 et 1000 µg/ml) est ajouté à un volume de 1 ml de la solution réactionnelle (acide sulfurique 0,6M, phosphate de sodium 28 mM, et molybdate d'ammonium 4 mM). Concernant le blanc, 0,1 ml du méthanol est utilisé à la place de l'échantillon.

Les mélanges réactionnels sont incubés dans un bain marie à 95°C pendant 90 min. Après incubation, les échantillons sont laissés refroidir à température ambiante, et la DO est ensuite mesurée à 695 nm contre le blanc.

Les essais sont réalisés trois fois pour l'ensemble des composés testés.

La capacité antioxydante est exprimée en DO et en équivalents de vit C en $\mu\text{g/g}$ d'échantillon. Pour cela une courbe d'étalonnage est réalisée donnant la DO à 695nm en fonction de la concentration en vit C.

L'étude du pouvoir à réduire le molybdène par les CPO est étudié également en présence de la vit C. Ainsi le pouvoir réducteur par le test phosphomolybdénique est déterminé pour une concentration de $500\mu\text{g/ml}$ de CPO en présence de concentrations croissantes en vit C (50 ; 100 ; 150 ; 200 et $250\mu\text{g/ml}$).

1.2.3.2 Capacité de piégeage d'espèces radicalaires

- Test de piégeage du radical DPPH•

- Principe

Cette méthode utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), un radical libre, coloré, stable, facile à doser et capable d'arracher les atomes hydrogène labiles des groupements OH les plus réactifs, et présentant un maximum d'absorption à 517 nm.

En présence d'un antioxydant, le DPPH• est réduit en DPPH et sa réduction se traduit par le passage de la couleur violette de la solution à la couleur jaune. Ceci conduit à la diminution de l'absorbance du radical libre à 517nm.

La structure ainsi que la réaction impliquant le DPPH• se résume dans la figure 28 de la façon suivante :

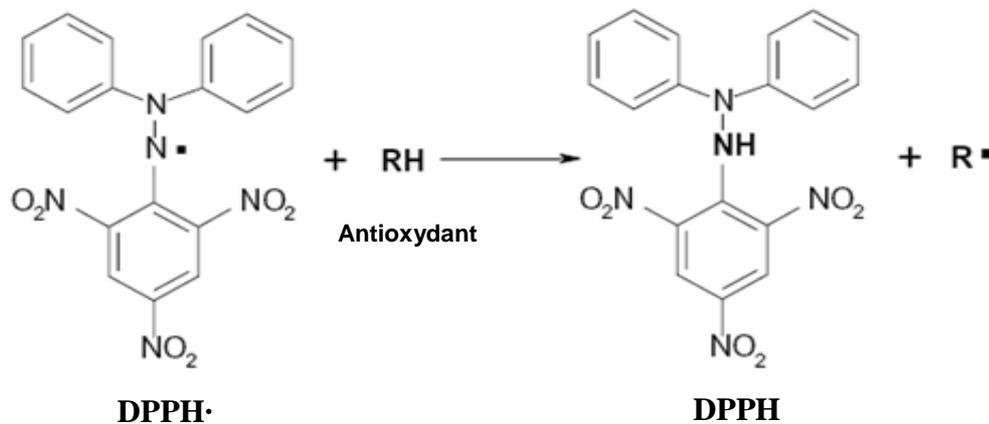


Figure 28 : Structure du DPPH• et sa réduction par l'antioxydant RH (PAIXAO et al., 2007).

- Protocole expérimental

La capacité de piégeage du DPPH• est déterminée suivant la méthode décrite par BRAND-WILLIAMS et al. (1995).

Brièvement, 2 ml d'une solution de DPPH• (0,1mM dans de l'éthanol) est ajoutée à $20\mu\text{l}$ des composés à tester (CPO, AG, AC, AT et vit C) à différentes concentrations (80 ; 150 et $250\mu\text{g/ml}$ dans l'éthanol). Le mélange est par la suite agité.

La cinétique de diminution de la quantité du radical DPPH• est déterminée jusqu'à atteindre l'état stationnaire.

Les DO sont prises à 517nm comme suit : après 0,5 min, 1min, 1,5min, 2min, 2,5min, 3,5min, 4,5min et 5,5min de la réaction, ensuite chaque 5 minutes jusqu'à l'obtention d'un plateau.

L'activité antioxydante est exprimée de deux manières, en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• et en terme cinétique en pourcentage de DPPH• résiduel en fonction du temps.

L'activité de piégeage du radical DPPH• est calculée en utilisant la formule suivante :

Le % de piégeage du radical DPPH• = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$

Où

A₀: l'absorbance du contrôle à temps t = 0 en absence des composés à tester.

A₁: l'absorbance de l'échantillon à temps t (temps nécessaire pour atteindre l'état stationnaire), il varie suivant la substance testée et sa concentration.

L'expression des résultats en pourcentage de DPPH• résiduel en fonction du temps est calculée par la formule suivante :

Le % de [DPPH•] résiduel = $([DPPH•]_t / [DPPH•]_{t=0}) \times 100$

Où

[DPPH•]_{t=0}: la quantité de DPPH• à temps t = 0.

[DPPH•]_t : la quantité de DPPH• à temps t.

La quantité de DPPH• est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage préparée à partir d'une gamme de concentrations connues en DPPH•.

- Calcul des EC₅₀

La concentration efficace EC₅₀ est définie comme étant la concentration en antioxydant nécessaire pour réduire la concentration initiale en DPPH• ($C_{DPPH• (t=0)}$) par un facteur de deux. Les valeurs des EC₅₀ sont déterminées à partir d'une courbe représentant la fraction de DPPH• résiduelle en fonction du rapport antioxydant en g/g de DPPH•.

La capacité de piégeage du radical DPPH• par les CPO en présence de vit C a été déterminée. Ainsi l'activité est déterminée pour une concentration en CPO de 150µg/ml en présence de concentrations croissantes en vit C (0 ; 10 ; 20 ; 40 ; 60 et 80 µg/ml).

- **Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène**

- **Principe**

- Cette méthode consiste à évaluer la capacité d'une substance à piéger l'eau oxygénée H₂O₂. Ceci est réalisé par simple incubation de la substance à tester en présence de H₂O₂. La quantité en H₂O₂ résiduelle dans le milieu réactionnel est déterminée par la mesure de son absorbance à 230 nm.

- Protocole expérimental

La capacité des différents composés à piéger H₂O₂ est déterminée selon la méthode de RUCH *et al.* (1989).

Un volume de 2 ml de la substance à tester à différentes concentrations (10 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200 et 250µg/ml) est ajouté à 1 ml de la solution de H₂O₂ (43mM), préparée dans un tampon phosphate à pH 7,4.

La réaction est incubée à température ambiante pendant 15 min, et l'absorbance est mesurée à 230 nm contre le blanc contenant le tampon phosphate sans le peroxyde d'hydrogène.

Le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les composés testés est calculé selon la formule ci-dessous :

$$\text{Le \% de piégeage de H}_2\text{O}_2 = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : absorbance du contrôle en absence de l'échantillon.

A₁ : absorbance en présence de l'échantillon.

Toutes les données sont mesurées trois fois.

La capacité de piégeage de H₂O₂ par les CPO en présence de vit C a été également déterminée. Ainsi l'activité est déterminée pour une concentration en CPO de 100µg/ml en présence de concentrations croissantes en vit C (5 ; 15 ; 30 et 45 µg/ml).

1.2.3.3 Etude sur un modèle cellulaire

1.2.3.3.1 Test d'hémolyse

o L'action hémolytique du peroxyde d'hydrogène

- Protocole expérimental

L'action hémolytique du H₂O₂ a été étudiée selon la méthode de TEDESCO *et al.* (2001) avec certaines modifications.

Un volume de 100 µl d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v) est incubé avec 100 µl de H₂O₂ à différentes concentrations (0,1mM ; 1mM ; 2mM ; 5mM et 10mM).

Après agitation douce, les tubes sont incubés dans un bain marie à 37°C pendant 3 heures avec agitation douce chaque 30 minutes.

Après incubation, le contenu de chaque tube est dilué par 8 volumes de PBS, puis centrifugé à 3000xg pendant 10 minutes. Les surnageants sont récupérés et la lecture des DO est réalisée à 540 nm.

Le pourcentage d'hémolyse est déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Le \% d'hémolyse} = (A / A_0) \times 100$$

Avec:

A₀: absorbance maximale donnée par les érythrocytes complètement hémolysés dans l'eau distillée.

A : absorbance de l'échantillon incubé en présence de différentes concentrations de H₂O₂.

○ **La cinétique de l'hémolyse peroxyque**

Le système d'oxydation choisi est celui utilisant H₂O₂ à une concentration de 5 mM. Le taux d'hémolyse des érythrocytes incubés en présence de 5mM de H₂O₂ a été déterminé en fonction du temps après 30, 60, 90, 120, 150, 180 et 240 minutes d'incubation.

Le taux d'hémolyse est déterminé comme précisé ci-dessus.

○ **L'action du peroxyde d'hydrogène sur la fragilité osmotique**

L'effet de H₂O₂ sur la fragilité osmotique a été étudié afin de confirmer que c'est bien l'atteinte de la membrane érythrocytaire qui était à l'origine de l'hémolyse induite par H₂O₂.

La procédure appliquée est la méthode de O'DELL et *al.* (1987) légèrement modifiée. Un volume de 100 µl de la suspension d'érythrocytes (5%, v/v), est incubé pendant 3 heures avec 100µl de H₂O₂ à différentes concentrations (0 ; 1 ; 5 et 10 mM).

Après incubation, 2 ml de PBS à pH7,4 avec des concentrations variées en NaCl (0,3% ; 0,4% et 0,9%) est additionné à chaque tube. Les tubes sont laissés au repos à la température ambiante pendant 30 min, puis centrifugés à 3000xg.

L'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm. L'hémolyse dans chaque tube est exprimée par rapport à l'hémolyse totale induite par l'eau distillée comme calculée précédemment.

○ **L'inhibition de l'hémolyse**

- Principe

Cette méthode consiste à évaluer la capacité d'un composé à inhiber l'hémolyse induite par un stress oxydatif sous l'action d'ERO (ou autre radical). L'intensité de l'hémolyse est estimée par la mesure de l'absorbance de l'hémoglobine libérée après hémolyse à 540 nm. Une substance est d'autant plus anti-hémolytique que la DO enregistrée est faible.

- Protocole expérimental

Le protocole du test concernant l'activité inhibitrice de l'hémolyse est réalisé selon la méthode décrite par TEDESCO et *al.* (2001) avec certaines modifications.

A 100 µl d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v), sont ajoutés 100 µl de différentes concentrations (50 ; 100 et 150µg/ml) des substances à tester (CPO, AG, AC, AT et vit C) préparées dans le PBS et 100 µl de H₂O₂ (5 mM dans PBS).

Avant l'addition du composé à tester, l'activité de la catalase est inhibée par incubation des globules rouges avec 100 µl de l'azide de sodium (1mM) pendant 10 minutes à 37°C (SENTURK et *al.*, 2001)

Le mélange réactionnel des différents échantillons a été agité doucement, puis incubé dans un bain marie à 37°C pendant 3 heures. Une agitation douce est réalisée chaque 30 minutes pour l'ensemble des échantillons, durant la période d'incubation.

Après incubation, le mélange de chaque tube est dilué par 8 volumes de PBS, puis centrifugé à 3000xg pendant 10 minutes. Les surnageants sont récupérés et la lecture des DO est réalisée à 540 nm. Chaque essai est réalisé 3 fois.

Le pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse s'exprime comme suit :

$$\text{Le \% de l'inhibition de l'hémolyse} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

A_0 : l'absorbance du contrôle en absence de la substance à tester.

A : l'absorbance de l'échantillon en présence de la substance à tester.

L'inhibition de l'hémolyse par les CPO en présence de vit C a été également déterminée. Ainsi l'activité est déterminée pour une concentration en CPO de 50µg/ml en présence de concentrations croissantes en vit C (5 ; 10 ; 15 et 20µg/ml).

1.2.3.3.2 Test de la peroxydation lipidique

- Principe

Le MDA est un indice de la peroxydation lipidique globale. La méthode est basée sur la détection spectrophotométrique du complexe entre le MDA et l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) (figure 29). Le complexe MDA-TBA présente un maximum d'absorption à 532 nm.

Deux molécules de TBA se fixent sur une molécule de MDA, à 100°C en milieu acide pour donner un complexe de couleur rose.

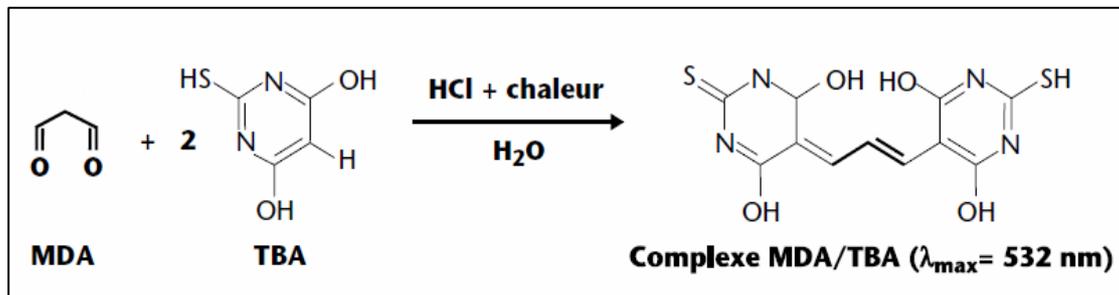


Figure 29 : La réaction de la formation du chromophore entre MDA et TBA (LAGUERRE *et al.*, 2007). MDA : malondialdéhyde ; TBA : acide 2-thiobarbiturique

- La détermination de la teneur en protéines

- Principe

La méthode de LOWRY *et al.* (1951) a été utilisée pour la détermination de la teneur en protéines dans l'échantillon de membrane érythrocytaires. C'est un dosage colorimétrique basé sur deux réactions. Une réaction de type Biuret, par laquelle les molécules polypeptidiques donnent en milieu basique un complexe cuivrique coloré et une réaction par laquelle les noyaux phénoliques de la tyrosine et du tryptophane et à un degré moindre de l'histidine, réduisent le réactif de Folin-ciocalteau.

L'intensité de la coloration développée est proportionnelle à la concentration en protéines dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 750 nm.

- Protocole expérimental

A 1 ml d'échantillon, contenant entre 25µg -100µg de protéines, est rajouté 5 ml d'une solution appelée C qui est un mélange d'une solution alcaline et d'une solution cuivrique (annexe 1). Ce mélange est laissé pendant 10 min à température ambiante.

Un volume de 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu est additionné. Après incubation à l'abri de la lumière pendant 30 minutes, les DO sont lues à 750 nm.

Une droite d'étalonnage a été réalisée avec des solutions de concentrations croissantes de BSA dans les mêmes conditions (annexe 1).

• **Protocole expérimental du test de la peroxydation lipidique**

Les membranes des globules rouges sont soumises à deux types de stress oxydants. Le but de cela est la définition d'un système d'oxydation fort qui induirait l'oxydation des lipides membranaires.

○ **Définition d'un système pro-oxydant**

➤ **Système d'oxydation par H₂O₂**

- Protocole expérimental

1 ml de membranes érythrocytaires (1mg/ml) est additionné de 300µl de H₂O₂ à différentes concentrations (0,01 ; 0,250 ; 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 200 ; 500 et 900mM). L'incubation est réalisée pendant 3 h.

Après incubation, le dosage du MDA est réalisé. Un volume de 1 ml de chaque échantillon de membranes érythrocytaires soumis au stress oxydatif, est traité par 2 ml d'HCl (1N) contenant l'acide trichloracétique (15%) et le TBA (0,75%). Les tubes sont alors chauffés à 100°C pendant 30 minutes, refroidis dans un bain de glace puis leur contenu est centrifugé à 3000xg pendant 10 minutes (BUEGE et AUST, 1978).

Les surnageants, contenant les complexes MDA-TBA, sont récupérés et l'absorbance est mesurée à 532 nm.

Les concentrations en MDA sont exprimées en µM/mg de protéines membranaires et déterminées en utilisant le coefficient d'extinction de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

➤ **Système d'oxydation H₂O₂/ FeSO₄**

Le même protocole a été appliqué, à la seule différence qu'à chaque concentration en peroxyde d'hydrogène utilisée précédemment sera ajouté un volume de 100 µl de FeSO₄ à une concentration de 1 mM.

○ **La cinétique de la formation du MDA par le système pro-oxydant choisi**

Le système oxydant H₂O₂(900mM)/FeSO₄(1mM), ayant induit la formation d'une quantité importante de MDA, a été choisi pour tester l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique.

La quantité de MDA formé en fonction du temps a été déterminée après 5min, 10min, 30min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4 h et 5 h d'incubation.

○ **L'inhibition de la peroxydation lipidique**

L'action des CPO, des CP individuels (AC, AT, AG) et de la vit C sur la peroxydation lipidique induite par le système générateur de stress oxydant est étudiée dans les conditions suivantes : H₂O₂ (900mM)/FeSO₄ (1mM).

Le protocole est appliqué comme précédemment et sont ajoutés 150µl de chaque substance à tester à différentes concentrations (20 ; 80 ; 150 ; 200 ; 250µg/ml). L'incubation est réalisée pendant 4 h.

Le pourcentage de l'inhibition de la peroxydation lipidique s'exprime comme suit :

Le % de l'inhibition de la peroxydation lipidique = $[(A_0 - A) / A_0] \times 100$

A₀: l'absorbance du contrôle en absence de la substance à tester.

A: l'absorbance de l'échantillon en présence de la substance à tester.

La capacité de l'inhibition de la peroxydation lipidique par les CPO en présence de la vit C a été également déterminée. Ainsi l'activité est déterminée pour une concentration en CPO de 40µg/ml en présence de concentrations croissantes en vit C (5 ; 10 ; 20 ; 30 et 40µg/ml).

1.2.3.3 Evaluation du stress oxydatif des protéines de la membrane érythrocytaire

• **Méthodes électrophorétiques**

Le but de cette étude est l'évaluation de l'oxydation des protéines membranaires des globules rouges par électrophorèse en présence et en absence de substances antioxydantes.

- Principe

L'électrophorèse est une technique qui permet la séparation de molécules chargées, sous l'effet d'un champ électrique.

La séparation des protéines par électrophorèse utilise leur caractère amphotère du à la présence au niveau de leur structure de fonctions amines et carboxyliques.

La charge des protéines à séparer va dépendre du pH du milieu et de leur pHi. Les protéines sont généralement séparées en milieu basique où elles prennent une charge négative et migrent donc vers l'anode. La vitesse de migration ou mobilité électrophorétique dépend de la charge globale et du PM.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est considérée comme l'une des méthodes de séparation les plus fines. Elle est de plus rapide, précise, reproductible et sensible (VAN HEKKEN et THOMPSON, 1991).

Le gel de polyacrylamide est le produit de polymérisation de monomères d'acrylamide et d'un agent de pontage le N, N' méthylène-bis-acrylamide et ce, en présence de persulfate

d'ammonium et de N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène diamine (TEMED) comme catalyseurs de la réaction (figure 30).

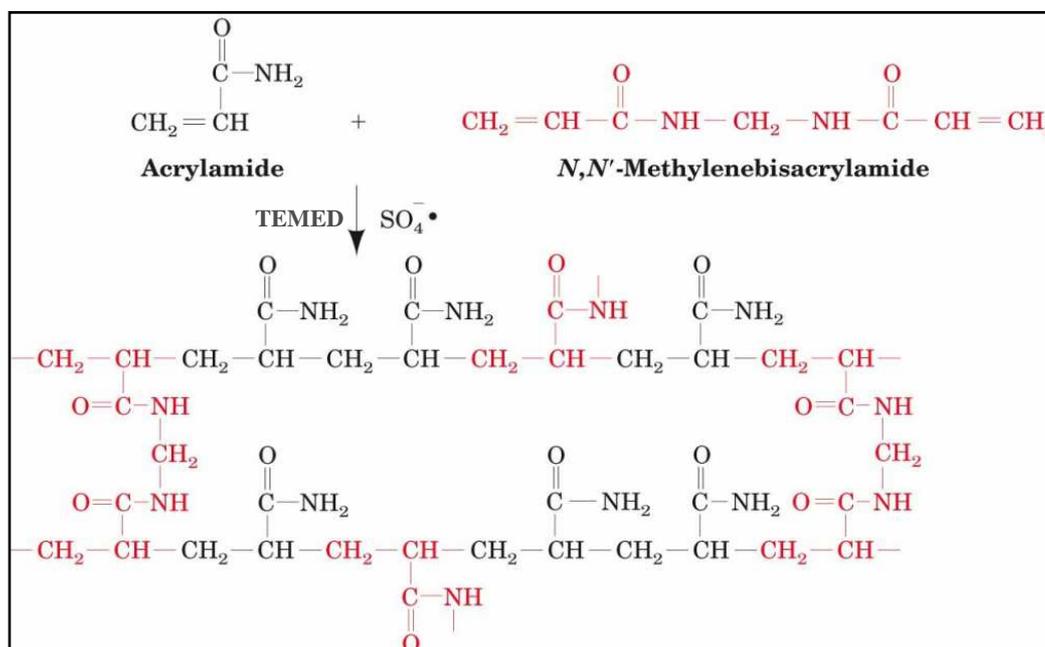


Figure 30 : Mécanisme de polymérisation entre l'acrylamide et le bisacrylamide.

Les propriétés du gel sont déterminées selon la concentration en acrylamide ainsi que le degré de polymérisation et de pontage définis par des indices T et C calculés comme suit :

$$T (\%) = (a + b / v) \times 100$$

$$C (\%) = (b / a + b) \times 100$$

Avec :

a : acrylamide (g) ;

b : méthylène-bis-acrylamide (g) ;

v : volume de la solution (ml).

- Conditions expérimentales

Les séparations électrophorétiques ont été réalisées sur des mini-cuves HOEFFER SE 280, qui présentent l'avantage d'utiliser très peu de produits et ne nécessitent pas de système de refroidissement. Le gel est coulé entre une plaque de verre et une plaque d'alumine. Une concentration de 3,5 mg/ml de chaque échantillon est déposée dans chaque puit.

Le bleu de bromophénol est additionné au tampon d'échantillon. Ceci va permettre de suivre le niveau de migration électrophorétique. Les paramètres de voltage et d'ampérage sont maintenus constants (250 V; 20 mA) pendant une durée moyenne allant de 60 à 120 min.

Deux types de PAGE ont été réalisées :

▪ **Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native) permet la séparation des protéines selon leur charge nette et leur PM.

La méthode de HILLIER (1976) a été suivie. Un gel de polyacrylamide à T= 12% et C= 2,7% a été utilisé. Le tampon de gel est composé de (TRIS, 0,75 M, pH 8,9). Le tampon d'électrode est constitué de (TRIS, 5mM ; glycine, 77 mM ; pH 8,3). Les échantillons protéiques sont préparés à une concentration de 3,5mg/ml dans une solution contenant le tampon de gel (1/10, v/v), de l'eau distillée (7/10, v/v) et du glycérol 10% (v/v) (annexe 2).

▪ **Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-SDS)**

Le SDS de formule $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_3^- \text{Na}^+$, est un détergeant anionique capable de dissocier les complexes protéiques. Associé à un agent réducteur, le 2 mercaptoéthanol, ayant comme rôle la réduction des ponts disulfures, le SDS solubilise les protéines en se fixant en excès sur ses dernières, leur conférant ainsi une forte charge négative. La séparation des différents échantillons protéiques est donc fonction du PM.

L'électrophorèse PAGE-SDS est réalisée selon le protocole décrit par LAEMMLI et FAVRE (1973) qui se base sur un système biphasique, comprenant deux types de gels superposés, un gel de séparation et un gel de concentration.

Le gel de concentration (T= 4,8 % et C= 2,7 %) préparé en tampon TRIS-HCl, pH 6.8, est faiblement réticulé et n'exerce aucun effet de tamisage moléculaire mais il sert à concentrer les échantillons.

Le gel de séparation (T= 12 % et C= 2,7 %) préparé en tampon TRIS-HCl, pH 8.8, correspond au support à travers lequel se fait la migration des protéines selon leur PM (annexe 3).

La détermination du PM des entités séparées s'effectue en faisant migrer dans les mêmes conditions des protéines étalons de PM connus .

Le kit de protéines standards, préparé au laboratoire LABAB, comprend : la BSA (66000 Da), l'ovalbumine (45000 Da), la β -lactoglobuline (18000 Da) et l' α -lactalbumine (14000 Da). Une courbe $\text{Log PM} = f(\text{distance parcourue})$ est utilisée pour la détermination du PM des entités protéiques.

A la fin de la migration, le gel est démoulé pour subir les opérations successives suivantes :

Fixation : La fixation est réalisée par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique 12 % (P/V) pendant 45 min ;

Coloration : le gel est immergé 2 à 4 h dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie 0,2 % (P/V) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1 volume), méthanol (1 volume) et l'acide trichloracétique 2 % (P/V) ;

Décoloration : elle est réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau/méthanol/acide acétique) dans les proportions respectives 3,12/1,5/0,37 (v/v/v).

- **PAGE-native des protéines membranaires érythrocytaires**

Un volume de 1 ml de la solution de membranes érythrocytaires à une concentration de 3,5mg/ml a été séparé par PAGE-native.

- **PAGE-SDS des protéines membranaires érythrocytaires**

Le protocole est réalisé selon la méthode de CARINI et *al.* (2000) avec certaines modifications.

Une solution de membranes érythrocytaires à une concentration de 3,5mg/ml (préparation de l'échantillon annexe 3) a été séparé selon le protocole de la PAGE-SDS décrit ci-dessus, avec des protéines marqueurs, en plus de l'hémoglobine.

Les protéines sont séparées sur un gel de concentration (4,8%) et sur un gel de séparation de 12%.

L'électrophorèse est réalisée en 90 min et les bandes protéiques sont par la suite visualisées.

- **Le suivi par électrophorèse PAGE-SDS de l'oxydation et de la protection des protéines de la membrane érythrocytaire**

- **L'oxydation des protéines membranaires**

Un système d'oxydation efficace, visualisable sur gel électrophorétique, des protéines membranaires du globule rouge a été recherché. Deux types de systèmes d'oxydation ont été étudiés. Un système oxydant en présence de peroxyde d'hydrogène et un autre système plus complexe utilisant le système $H_2O_2/FeSO_4$ ont été étudiés. Les échantillons soumis aux conditions de stress oxydatif sont par la suite séparés par PAGE-SDS.

- **Oxydation par H_2O_2 :**

- **1^{ère} condition ou système a**

Un volume de 1 ml de membrane érythrocytaires contenant 3,5mg/ml de protéines est incubé avec 250 μ l d' H_2O_2 à différentes concentrations (0 ; 250 μ M ; 500 μ M ; 1mM ; 5mM ; 10mM ; 30mM et 50mM) préparées dans le PBS. Les échantillons sont incubés pendant 3h.

- **2^{ème} condition ou système b**

Le même protocole a été repris mais en utilisant des concentrations plus fortes en H_2O_2 (50 ; 100 ; 200 ; 400 ; 600 et 900 mM) et en augmentant le temps d'incubation passant de 3 h à 24 h.

- Oxydation par le système H₂O₂/FeSO₄

Un volume de 500µl de membranes érythrocytaires, contenant 3,5mg/ml de protéines, est mélangé avec 250µl de FeSO₄, 250µl d'H₂O₂ et 250 µl de PBS.. Les échantillons sont incubés pendant 6h. Les différentes concentrations utilisées pour les deux agents oxydants sont précisées dans le tableau II.

Tableau II : Le système d'oxydation H₂O₂/FeSO₄ des protéines membranaires érythrocytaires.

Système oxydant	H ₂ O ₂	FeSO ₄
1	250 µM	25µM
2	500 µM	30µM
3	1mM	50µM
4	5mM	250µM
5	5mM	1mM
6	10mM	10mM
7	50mM	30mm
8	50mM	50mm

➤ **La cinétique de l'oxydation des protéines membranaires**

L'effet oxydatif du système oxydant H₂O₂(50mM)/FeSO₄(30mM) choisi, sur les protéines membranaires au cours du temps a été étudié.

A 500µl de protéines (3,5 mg/ml) sont additionnés 250µl de FeSO₄ (30mM) et 250µl H₂O₂ (50mM). La réaction est arrêtée par addition de 250µl EDTA (30mM) après 1min, 2min, 3 min, 4min, 5min, 30min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h de la réaction. Une séparation par électrophorèse en PAGE-SDS est réalisée pour l'ensemble des échantillons.

➤ **Effet des substances antioxydantes sur les dommages oxydatifs des protéines**

Le système d'oxydation à utiliser, est le système H₂O₂ (50mM)/FeSO₄ (30mM). Le même protocole a été appliqué mais en présence de la substance à tester.

Un volume de 500µl de protéines (3,5mg/ml) est mélangé avec 250µl de FeSO₄ (30mM), 250µl H₂O₂ (50mM) et 250µl de la substance à tester (CPO, AG et vit C) à différentes concentrations (1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 ; 12 ; 14 ; 16 ; 18 et 20 mg/ml). Les divers échantillons sont incubés pendant 3 h sous agitation à 37°C.

Une séparation par électrophorèse en PAGE-SDS est réalisée pour l'ensemble des échantillons.

1.2.4 Analyse statistique

Les valeurs sont données comme la moyenne \pm l'écart type de trois mesures. Les données, sont traitées au moyen du test de l'analyse de variance (ANOVA) avec le logiciel statistica 6. D'autres données sont traitées par le test de student en utilisant le même logiciel.

II- Résultats et Discussion

2.1 Dosage de l'extrait phénolique total

La concentration des CPO est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu à partir d'une courbe étalon utilisant l'AG comme standard (Figure 31). Elle est de $1633 \pm 0,16$ mg en équivalent d'AG / 100 g de pulpe.

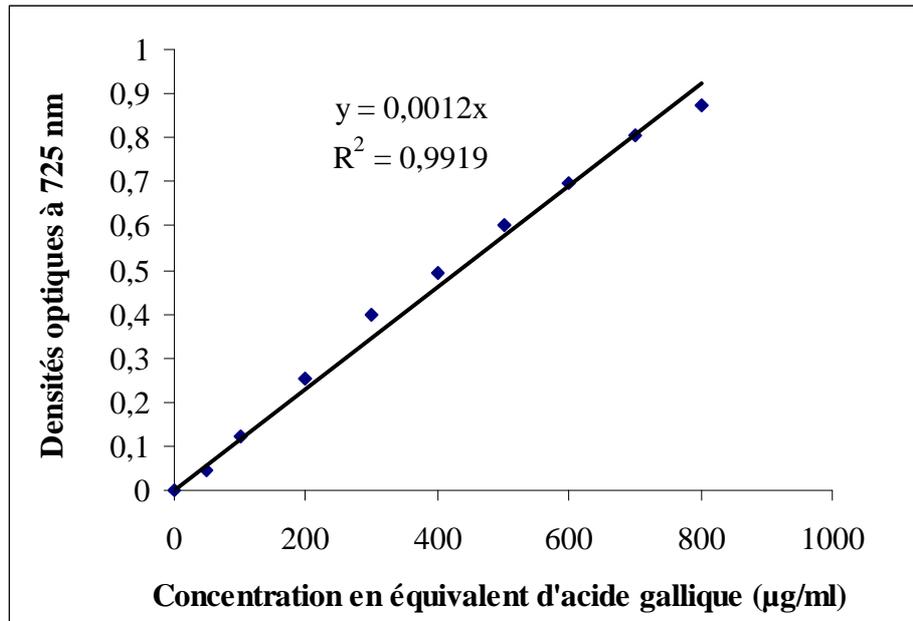


Figure 31 : Courbe étalon du dosage des composés phénoliques totaux par la méthode de GUTFINGER (1981). R= coefficient de corrélation.

La détermination quantitative des CP est habituellement réalisée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Cependant, cette méthode n'est pas très spécifique car elle ne donne pas d'indication sur la nature des CP présents dans l'extrait (TASIOULA-MARGARI et OKOGERI, 2001). En outre, certaines substances, telles que la vit C, les caroténoïdes, les sucres réducteurs et les acides aminés phénoliques, peuvent en réduisant le complexe phosphotungstique-phosmolybdénique interférer et conduire à une surestimation de la teneur en CP (OBIED et *al.*, 2005). En fait cette méthode donne un aperçu sur la qualité réductrice d'un ensemble de composés en plus des CP.

La quantité de PP trouvée peut varier selon un certain nombre de facteurs. Les facteurs contribuant à la variabilité dans la teneur en PP pourraient être liée au cultivar, au stade de maturation, des conditions climatiques (température, précipitations), de la période de récolte (CRIADO et *al.*, 2004 ; MORELLO et *al.*, 2004 ; VINHA et *al.*, 2005 ; YOUSFI et *al.*, 2006 ; BEN AHMED et *al.*, 2007 ; GOMEZ-RICO et *al.*, 2008). Les processus technologiques auxquels les olives sont exposées peuvent également affecter de manière significative le contenu phénolique (RYAN et ROBARD, 1998 ; BUTINAR, 2006).

Ainsi HAJIMAHMOODI et al. (2008), trouvent que la quantité en PP totale varie selon le cultivar à titre d'exemple le cultivar *Conservalina* contient 888mg d'équivalent d'AG /100 g de matière sèche alors que le cultivar *Mishen* contient 2997mg d'équivalent d'AG /100g de matière sèche.

D'autre part, selon SOUSA et al. (2008), le taux en phénols totaux de la pulpe d'olive varie selon les conditions et les solvants d'extraction utilisés. Il est de 3,48, 4,86, 5,90 et 15,48mg/g d'équivalents d'AG en utilisant les solvants suivant respectivement : eau à température ambiante, le méthanol à ébullition, le méthanol à température ambiante et l'eau à ébullition. Par ailleurs, MCDONALD et al. (2001) ont rapporté que la teneur totale en PP de la poudre d'olive varie entre 200 à 590 mg d'équivalent d'AG/100g dans les différentes fractions chromatographiques.

Alors que BOUAZIZ et al. (2004) parlent de 600 à 1000mg d'équivalent d'AG /100g pendant le stade vert. Le CP majeur qui montre des taux variés au cours du développement de l'olive correspond à l'oleuropéine, atteignant des concentrations jusqu' à 14% du poids sec des jeunes olives variété *Picholine* (AMIOT et al., 1986). AMIOT et al. (1986) ont établi un rapport inverse entre le contenu en oleuropéine dans l'olive et d'autres phénols, comme certains flavonoïdes et le verbascoside. Des recherches conduites par VLAHOV (1992) soutiennent ces résultats. Une augmentation dans la teneur en flavonoïdes dans trois variétés d'olive avec le début de la maturation a été observée.

Cependant le profil phénolique varie également selon l'origine. Le profil phénolique des olives de Chine (*Canarium album* L) est totalement différent de celui des olives méditerranéennes (*Olea europaea* L). Dans les olives de chine l'acide gallique et ellagique sont les PP les plus abondants (HE et XIA, 2007).

2.2 Etude de l'activité anti-oxydante

2.2.1 Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium

La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel d'activité anti-oxydante (MEIR et al., 1995).

La réduction du Fe^{3+} est souvent employée pour étudier la capacité d'une substance à donner des électrons. Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action anti-oxydante (EBRAHIMZADEH et al., 2008).

La quantité du Fe^{2+} formée est estimée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à l'augmentation du pouvoir réducteur.

Les résultats obtenus par ce test sont donnés par la figure 32. A une faible concentration de 10 μ g/ml, l'AG présente le pouvoir réducteur le plus élevé avec une DO de 0,57, tandis que l'extrait phénolique total et la vit C présente une DO de 0,1 et de 0,206 respectivement.

A la plus forte concentration utilisée (80 μ g/ml), les DO obtenues sont par ordre décroissant pour l'AC, AG , AT, CPO et la vit C respectivement les suivantes : 1,88, 1,26, 0,71, 0,67 et 0,58.

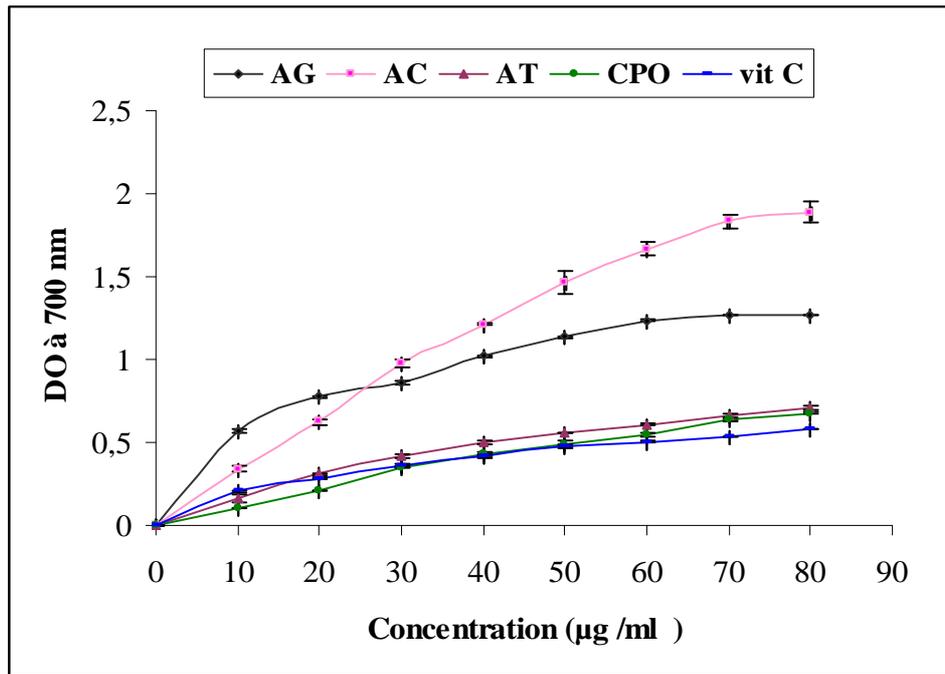


Figure 32 : Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium des différentes substances testées (CPO, AG, AC, AT et la vit C).

Pour comparer l'activité des différentes substances, on détermine le pouvoir réducteur $PR_{0,5AU}$ défini comme la quantité d'une substance en μg par ml du volume réactionnel qui donne une unité d'absorbance de 0,5 à 700 nm (ARDESTANI et YAZDANPARAST, 2007).

A partir du graphe, les $PR_{0,5AU}$ des différentes substances testées sont déduits et sont significativement différents ($p < 0,001$). L'AG étant le CP qui présente le pouvoir réducteur le plus élevé avec un $PR_{0,5AU}$ de $7,65 \pm 0,43 \mu\text{g/ml}$, suivi par l'AC ($PR_{0,5AU} = 15,72 \pm 0,40 \mu\text{g/ml}$) et l'AT ($PR_{0,5AU} = 41,71 \pm 2,61 \mu\text{g/ml}$). Les CPO ont un $PR_{0,5AU}$ de $50,55 \pm 3,33 \mu\text{g/ml}$ plus élevé que celui de la vit C qui est de $57,94 \pm 4,44 \mu\text{g/ml}$.

Les résultats indiquent que les CP (acides phénoliques testés individuellement) et les CPO présentent un pouvoir réducteur plus élevé que celui de la vit C.

A partir de ces résultats, les CPO peuvent être qualifiés de donneurs d'électrons capables de neutraliser les RL. Cela pourrait avoir un effet dans la conversion des RL en produits plus stables et terminant ainsi les réactions en chaîne initiées par les RL.

- **Association vitamine C et composés phénoliques totaux de la pulpe d'olive**

Les résultats obtenus sur la capacité de la vit C à réduire le ferrocyanure de potassium à différentes concentrations (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 et $10 \mu\text{g/ml}$) auxquelles est ajoutée une concentration constante en extrait phénolique total de $20 \mu\text{g/ml}$, sont donnés par la figure 33. Les DO obtenues en associant à chacune des concentrations en vit C, $20 \mu\text{g/ml}$ de l'extrait phénolique sont plus importantes montrant ainsi un pouvoir réducteur plus important dans ces conditions.

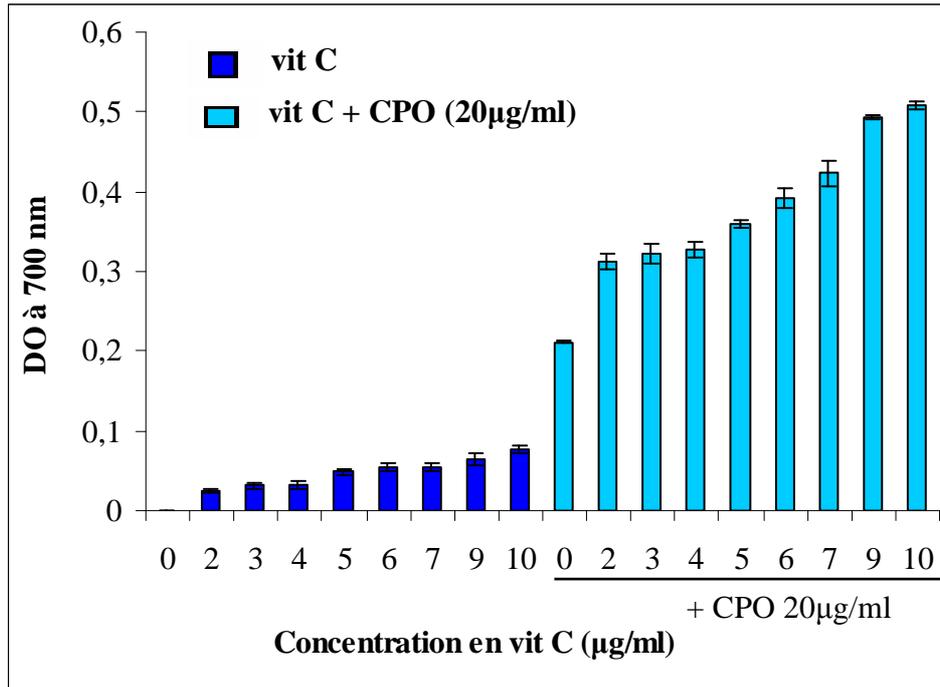


Figure 33 : Pouvoir réducteur de l'association CPO et vit C sur le ferrocyanure de potassium.

Les résultats obtenus à différentes concentrations en vit C sont pratiquement les mêmes et ne sont pas significativement différents. L'addition de 20µg/ml de CPO a conduit à l'augmentation de la quantité du fer réduit obtenue.

Les résultats consignés dans la figure 34 permettent de savoir si l'effet observé après association de la vit C avec les CPO, est un effet additif ou synergique. L'effet additif correspond à la somme entre l'effet donné par les CPO à 20µg/ml et celui donné par les différentes concentrations en vit C. En effet il y'a une différence significative ($p < 0,001$) entre l'effet additif et l'effet de l'association obtenue et ce à différentes concentrations ce qui permet de conclure qu'il y'a effectivement un effet synergique entre la vit C et les CPO dans ces conditions.

2.2.2 Pouvoir réducteur par le test phosphomolybdénique

Le test phosphomolybdénique est basé sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) par un composé antioxydant et la formation du complexe phosphate/Mo (V) de couleur verte avec l'absorption maximale à 695 nm.

Les résultats sont donnés en DO à 695 nm en fonction de la concentration (figure 35) et ils sont significativement différents ($p < 0,001$).

On constate à partir de ces résultats qu'il y a une proportionnalité entre la capacité des substances testées à réduire le molybdène et leur concentration.

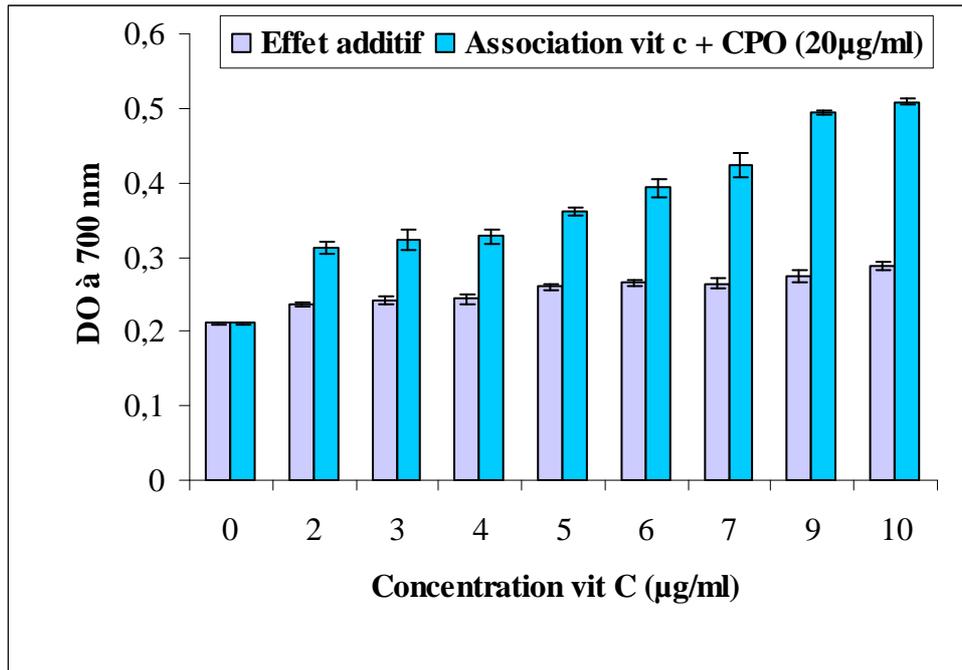


Figure 34 : Comparaison du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium de l'effet additif et de l'effet de l'association CPO et vit C.

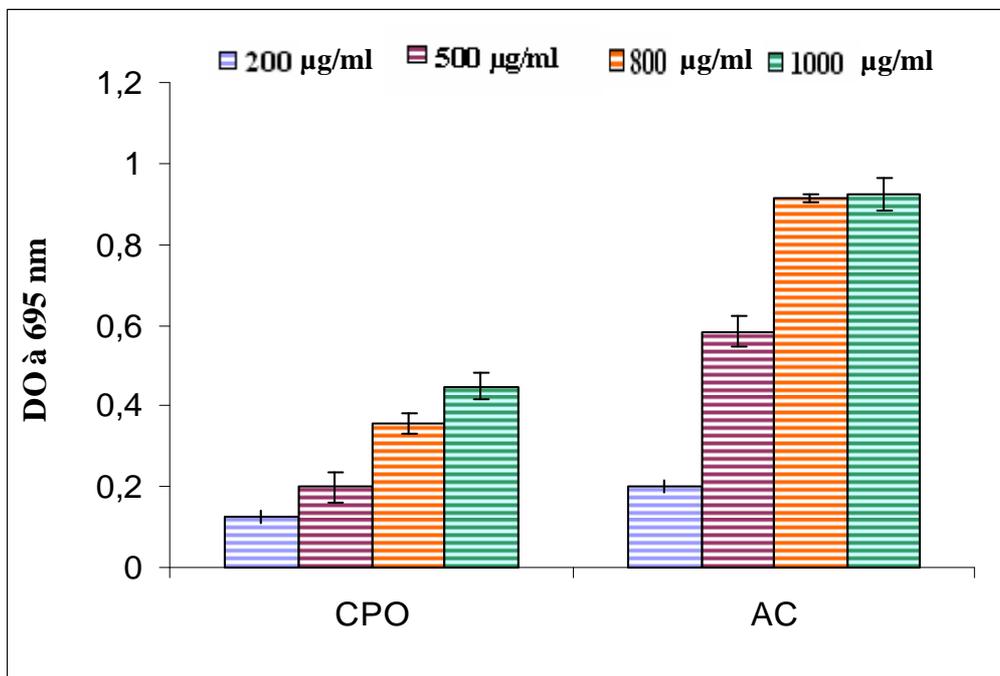


Figure 35 : Pouvoir réducteur du molybdène des CPO et de l'AC à différentes concentrations.

L'AC a montré une capacité plus élevée à réduire le molybdène, avec une DO de $0,200 \pm 0,01$ à 200 $\mu\text{g/ml}$ et $0,924 \pm 0,03$ à 1000 $\mu\text{g/ml}$. L'extrait phénolique présente un effet réducteur modéré de l'ion molybdène avec une DO de $0,125 \pm 0,01$ à 200 $\mu\text{g/ml}$ et de $0,447 \pm 0,03$ à 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Par comparaison à la vit C, en utilisant la courbe d'étalonnage (figure 36), les résultats sont de $566,38 \pm 59,26$ (comme équivalents en μg en vit C /g d'échantillon) pour l'AC et de $251,68 \pm 21,09$ (comme équivalents en μg en vit C /g d'échantillon) pour les CPO.

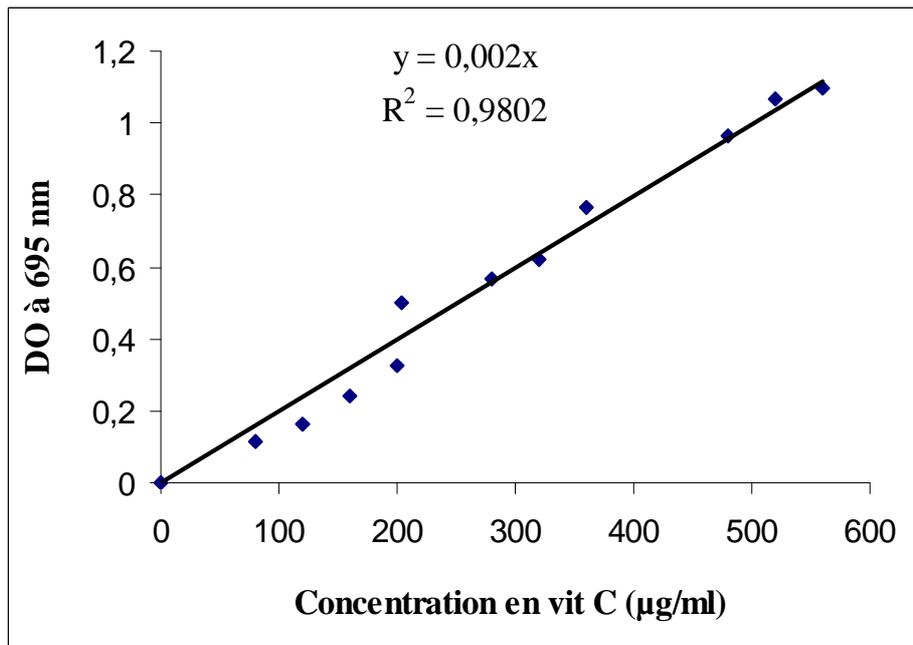


Figure 36 : Courbe d'étalonnage de la vit C réalisée avec le test phosphomolybdénique.

- **Association vitamine C et composés phénoliques totaux de la pulpe d'olive**

Les résultats obtenus par le test phosphomolybdénique à différentes concentrations en vit C (0 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200 ; 250 $\mu\text{g/ml}$), additionnées d'une concentration constante en extrait phénolique total de 500 $\mu\text{g/ml}$, sont donnés par la figure 37.

Les DO obtenues en présence de l'extrait phénolique à 500 $\mu\text{g/ml}$ sont plus importantes que les DO obtenues en présence de vit C seule.

L'addition de 500 $\mu\text{g/ml}$ de CPO a conduit à l'augmentation de la quantité du molybdène réduit.

La figure 38 compare entre l'effet additif et l'effet obtenu dans le cas de l'association vit C et CPO. Dans ce cas il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre l'effet additif et l'effet observé sauf à une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$ en vit C ($p = 0,03$). Ce qui permet de dire qu'il y a un effet additif entre le pouvoir réducteur du molybdène de la vit C et le pouvoir réducteur des CPO pour la majorité des concentrations utilisées.

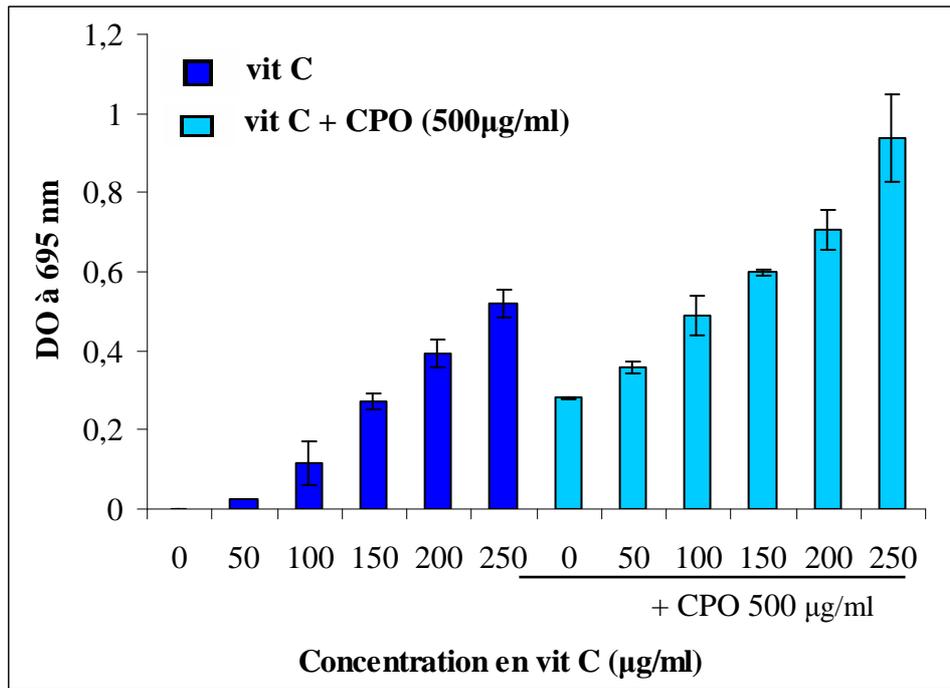


Figure 37 : L'effet de l'association CPO et vit C sur l'activité antioxydante mesurée par le test phosphomolybdénique.

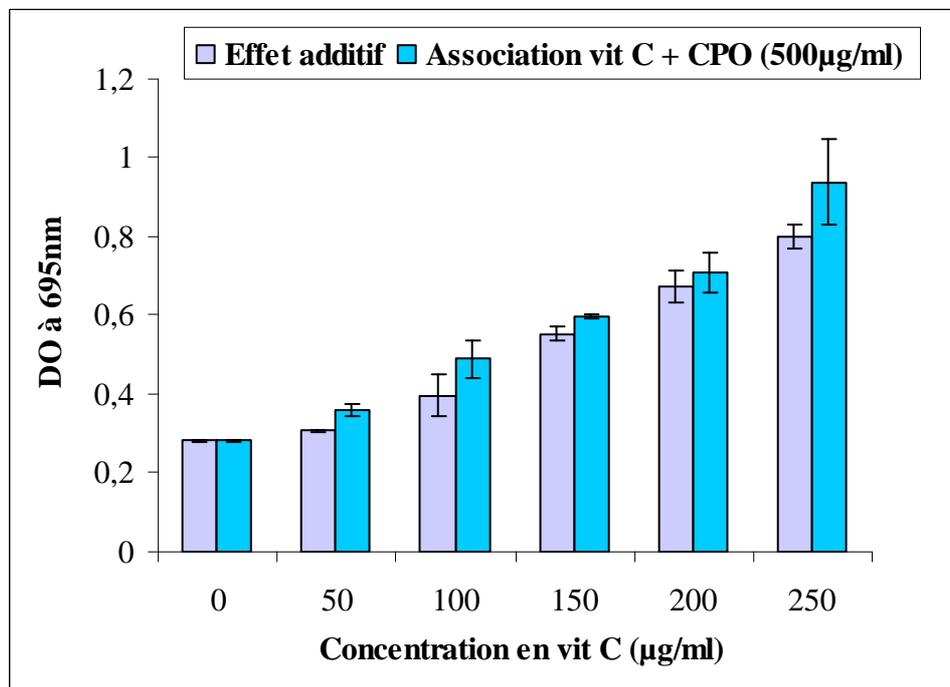


Figure 38 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association CPO et vit C sur l'activité antioxydante mesurée par le test phosphomolybdénique.

A partir des résultats de la mesure du pouvoir réducteur par les deux méthodes utilisées, les CPO ont montré une activité réductrice intéressante.

L'activité anti-oxydante est la capacité d'un composé à empêcher la dégradation oxydante des biomolécules (lipides, protéines, acides nucléiques).

Selon ANTOLOVICH et *al.* (2002), un certain nombre de facteurs déterminent l'activité anti-oxydante dont la réactivité comme donneur d'hydrogène ou d'électron.

Le pouvoir réducteur est défini comme étant la capacité à donner un hydrogène et/ ou un électron. Le capacité réductrice d'un composé dépend généralement de la présence de groupements réducteurs au niveau de sa structure (PIN-DER-DUH, 1998; SENEVIRATHNE et *al.*, 2006).

Des travaux ont été réalisés concernant l'activité réductrice des CP de l'olive et qui sont en accord avec nos résultats et démontrent le potentiel réducteur des CPO.

SOUSA et *al.* (2008) ont étudié le pouvoir réducteur du fer des olives de table de la variété *alcaparras* récoltées dans 10 localités différentes. Les résultats ont montré que les olives de tables de la région de Carrazeda de ansiães, présentent le pouvoir réducteur le plus important avec une EC₅₀ de 0,36mg/ml. Cela est expliqué par son contenu élevé en CP.

L'activité anti-oxydante dépend principalement du profil phénolique qui varie en fonction de la variété de l'olive (VINHA et *al.*, 2005). D'autre part, HAJIMAHMOODI et *al.* (2008) ont étudié le pouvoir réducteur du fer de six cultivars d'olives iraniennes. Différents pouvoirs réducteurs ont été obtenus, ainsi le cultivar *Mishen* a un pouvoir de 8,602g d'équivalent en vitamine E/100g alors que le cultivar *Conservalina* a un pouvoir de 2,369g d'équivalent en vitamine E/100g. La différence dans l'activité est expliquée par la différence dans le contenu en PP.

Le degré de maturation des olives est un facteur qui pourrait influencer le potentiel antioxydant. Durant la maturation quelques changements sont produits dans la composition du fruit en PP. La quantité en oleuropeine diminue alors que celle du tyrosol et de l'hydroxytyrosol augmentent (SALVADOR et *al.*, 2001).

FERREIRA et *al.* (2007) ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles d'olive riche en oleuropeine présente un pouvoir réducteur plus élevé que celui de buthylhydroxyanisol (BHA) et du α -tocophéol.

Les olives sont une source riche en antioxydants phénoliques (RAYAN et ROBARD, 1998), incluant l'oleuropeine, ligstroside et le verbascoside (RYAN, ROBARDS et LAVÉE, 1999). Le pouvoir réducteur de l'extrait phénolique total obtenu par les deux méthodes utilisées pourrait être expliqué par la richesse de l'extrait de la pulpe d'olive en ces CP.

Le pouvoir relativement faible des CPO obtenu par le test phosphomolybdénique pourrait s'expliquer par les conditions acides de la réaction. Dans ces conditions, selon APAK et *al.* (2007), la capacité réductrice peut être inhibée à cause de la protonation des CP, tandis que dans des conditions plus basiques, la dissociation des protons des CP (convertis en phénolates) augmenterait la capacité réductrice d'un échantillon.

2.2.3 Test de piégeage du radical DPPH•

La méthode pour le piégeage du radical stable DPPH• est une méthode largement utilisée pour évaluer l'activité anti-oxydante. Le DPPH• est un radical libre stable et accepte un électron ou un hydrogène pour devenir une molécule stable (SOARES *et al.*, 1997).

Les résultats du piégeage du DPPH• sont donnés par le tableau III, exprimés en pourcentage de piégeage, à différentes concentrations.

Tableau III : Comparaison de l'activité antioxydante exprimée en pourcentage de piégeage du radical DPPH•.

Concentration (µg/ml)	AG	AC	AT	CPO	vit C
80	35,74 ± 2,34	05,53 ± 0,43	14,47 ± 3,19	08,30 ± 0,00	02,55 ± 0,21
150	69,15 ± 0,64	50,11 ± 7,55	34,68 ± 4,04	42,02 ± 0,11	31,28 ± 0,21
250	93,94 ± 2,45	90,32 ± 2,23	89,47 ± 1,81	63,62 ± 2,55	63,19 ± 0,43

A partir des résultats donnés par le tableau III, on constate que les différents composés présentent des activités plus au moins fortes en fonction de la concentration. On constate que l'on ne peut pas établir facilement un ordre d'activité puisque celui-ci varie à chaque concentration testée. Cependant, à toutes les concentrations utilisées, l'AG présente le pourcentage de piégeage le plus important.

- **Cinétique de la réaction**

La cinétique de la réaction est suivie et les concentrations efficaces donnant l'effet à 50% (EC₅₀) de chaque substance sont déduites. Ceci permettra leur classement suivant leur activité.

Le piégeage du DPPH• en fonction du temps par les différents composés testés à trois concentrations différentes (80, 150, 250 µg/ml) a été déterminé.

Une courbe étalon de DPPH• (figure 39) est utilisée pour déterminer la quantité de DPPH correspondant à l'absorbance mesurée à 517 nm.

Seront présentés les pourcentage du radical DPPH• résiduel en fonction du temps en présence des différentes substances testées à différentes concentrations par les figures qui vont suivre. En présence de l'AG (figure 40), à une concentration de 80µg/ml, le pourcentage de DPPH• résiduel est de 64,17 ± 1,72% alors qu'il est de 31,4 ± 0,3 % à une concentration de 150µg/ml. Après 600s de réaction la quantité de DPPH• résiduelle chute à 6 ± 2,31% à une concentration de 250µg/ml.

Pour l'AC (figure 41), le pourcentage de DPPH• non piégé à 80 µg/ml est de 90,16 ± 0,96 %, et il passe à 49,77 ± 7,79 % à une concentration de 150µg/ml. Un pourcentage de 9,62 ± 2,01 % est atteint au bout de 900s de réaction à une concentration de 250 µg/ml.

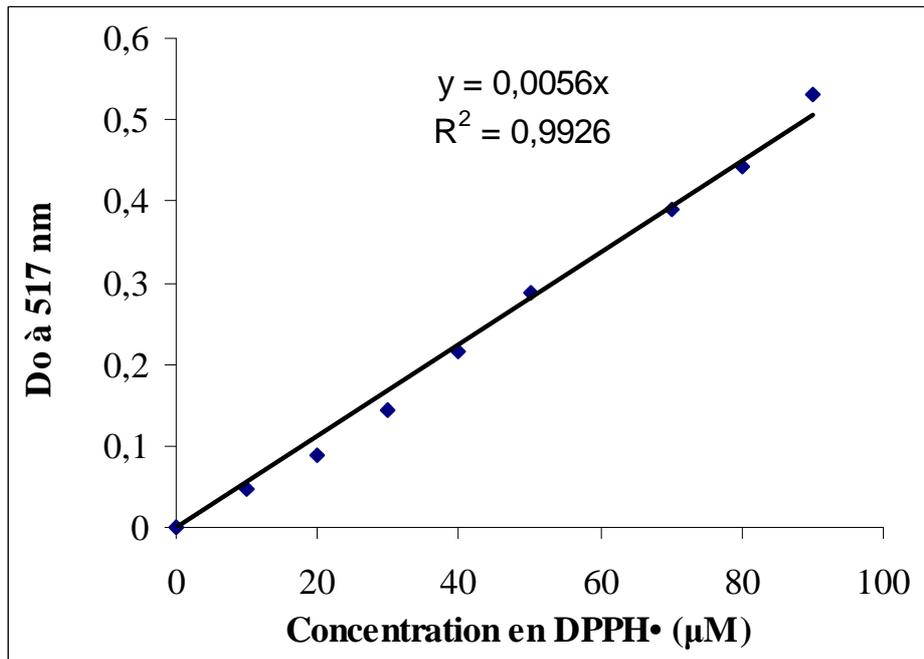


Figure 39 : Courbe d'étalonnage du DPPH•.

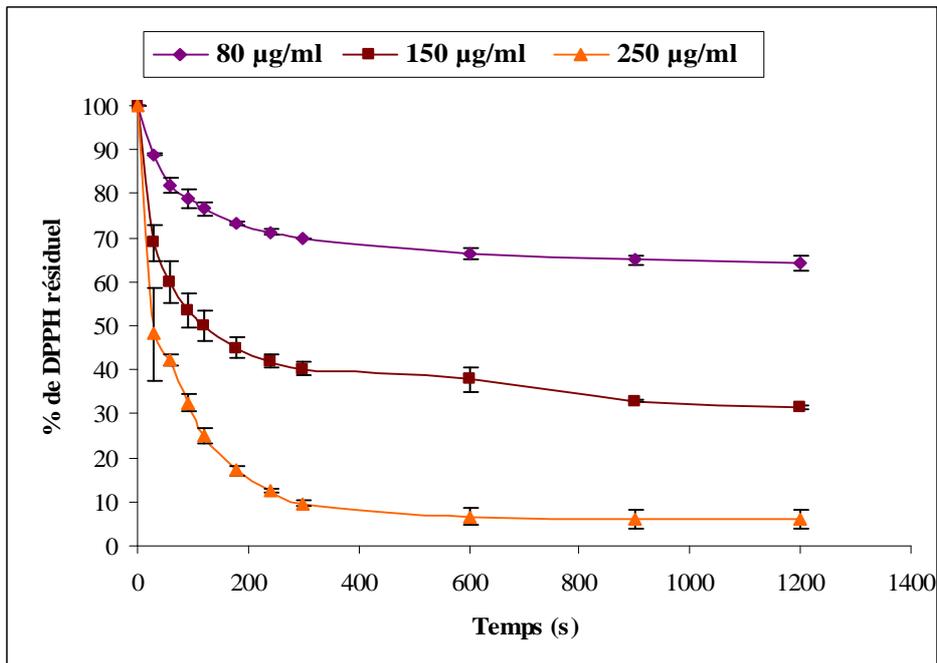


Figure 40 : Le pourcentage de DPPH• résiduel à différentes concentrations d'AG en fonction du temps. $[DPPH•]_{\text{Initiale}} = 0,1\text{mM}$.

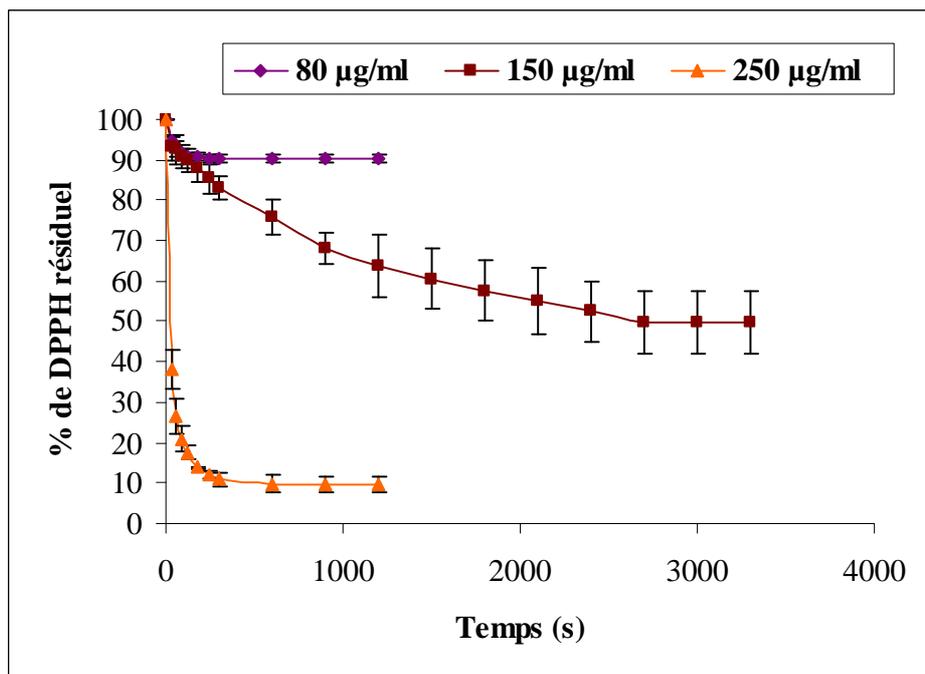


Figure 41 : Le pourcentage de DPPH• résiduel à différentes concentrations d'AC en fonction du temps. $[DPPH\cdot]_{\text{Initiale}} = 0,1\text{mM}$.

Concernant les résultats obtenus avec l'AT (figure 42) à la concentration de 80µg/ml le pourcentage de DPPH• résiduel est de $83,02 \pm 1,38 \%$, de $42,67 \pm 4,03 \%$ à 150µg/ml, et de $2,36 \pm 1,67 \%$ à 250µg/ml au bout de 1800s de la réaction.

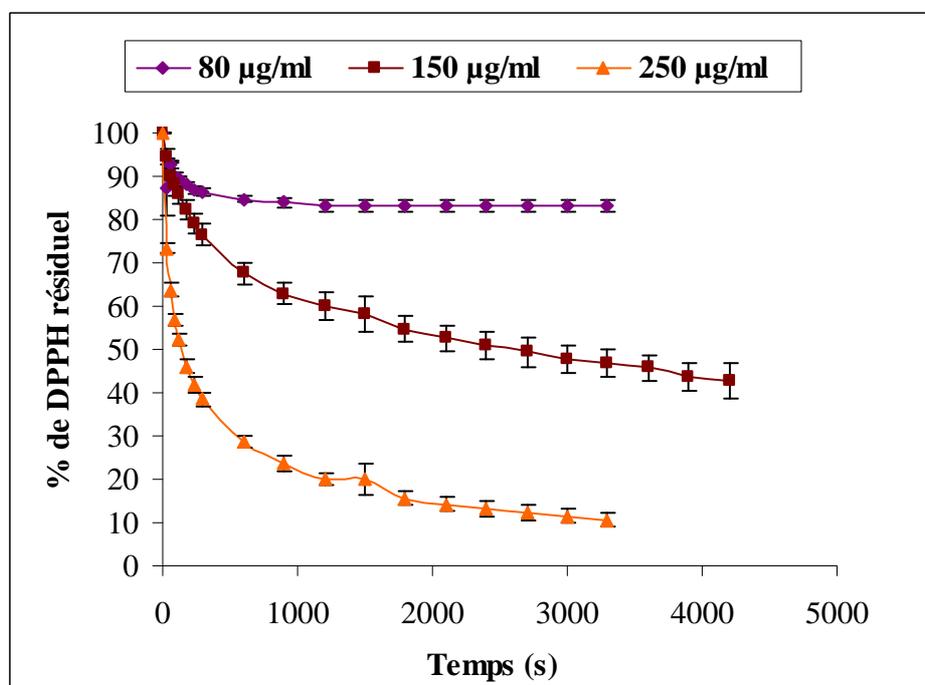


Figure 42 : Le pourcentage de DPPH• résiduel à différentes concentrations de l'AT en fonction du temps. $[DPPH\cdot]_{\text{Initiale}} = 0,1\text{mM}$.

Quant aux pourcentages de DPPH• résiduels obtenus en présence de l'extrait phénolique aux concentrations de 80, 150 et 250µg/ml, ils sont de $85,53 \pm 4,16 \%$, de $62,25 \pm 1,87 \%$ et de $36,23 \pm 3,03 \%$ respectivement (figure 43).

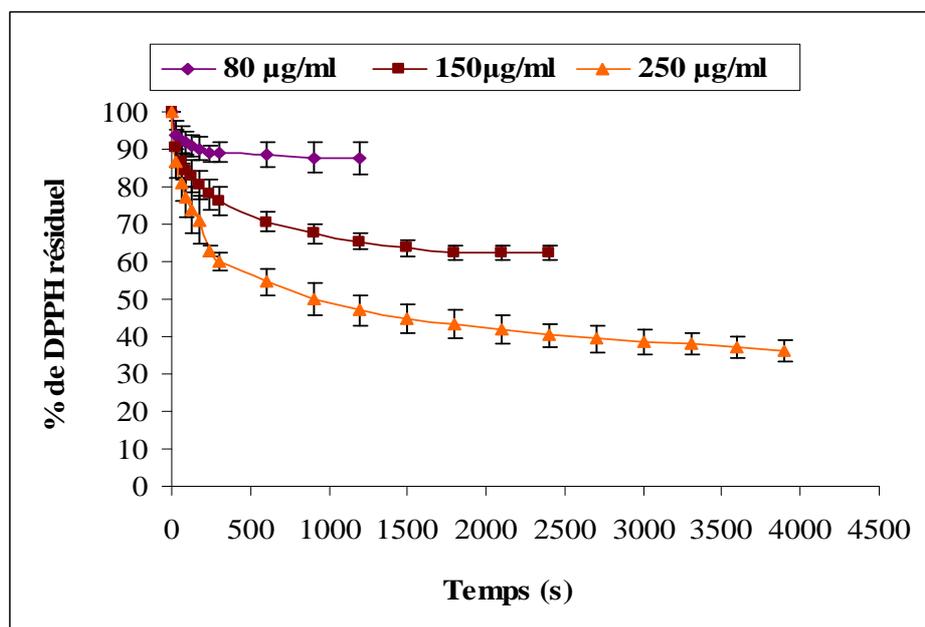


Figure 43 : Le pourcentage de DPPH• résiduel à différentes concentrations des CPO en fonction du temps. [DPPH•]_{Initiale} = 0,1mM.

La figure 44 donne les résultats de la cinétique de piégeage du radical DPPH• par la vit C. Un pourcentage de DPPH• résiduel de $97,97 \pm 0,51 \%$ est obtenu à la concentration de 80µg/ml, $68,36 \pm 0,42 \%$ à 150µg/ml et en fin $36,70 \pm 0,84 \%$ à 250µg/ml.

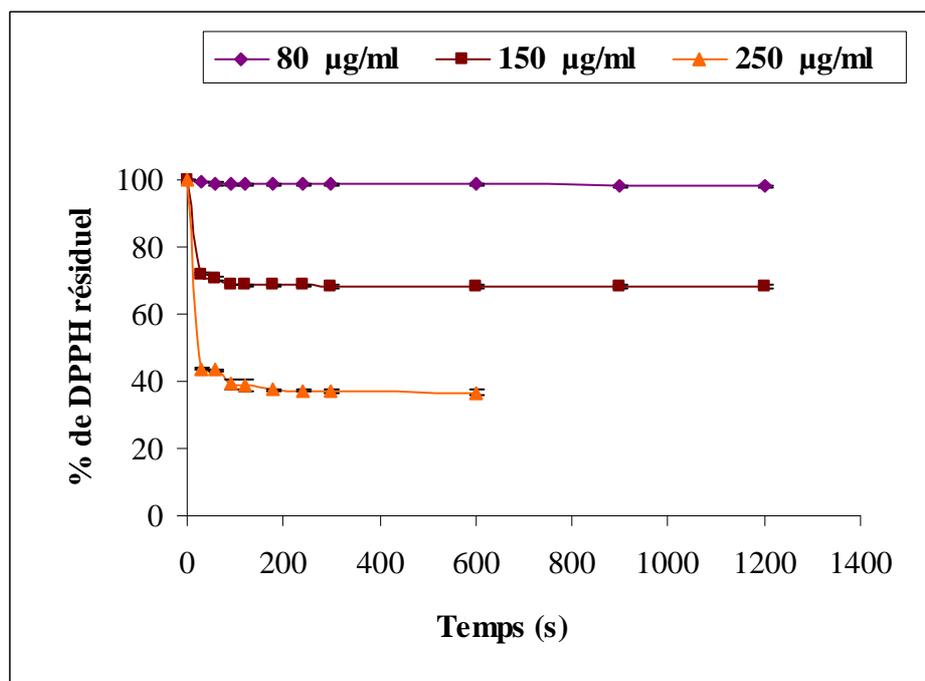


Figure 44 : Le pourcentage de DPPH• résiduel à différentes concentrations de la vit C en fonction du temps. [DPPH•]_{Initiale} = 0,1mM.

A partir des graphes on constate que le pourcentage de DPPH• résiduel décroît avec le temps. Cette diminution est d'autant plus importante que la concentration de la substance testée est élevée.

On remarque que la quantité de DPPH• non piégée diminue jusqu'à atteindre un état stationnaire ou plateau correspondant à l'activité de piégeage maximale de la substance testée à chacune des concentrations utilisées. On constate également que le piégeage de ce radical se fait graduellement en fonction du temps jusqu'à atteindre l'état stationnaire.

A partir de ces graphes on constate que les différents composés testés piègent de façon plus au moins forte le radical DPPH•, ce qui s'est manifesté par la diminution du pourcentage de DPPH• résiduel et donc de l'augmentation de la quantité piégée de ce radical.

La diminution de l'absorbance à 517 nm est fonction de la concentration. Plus la concentration du composé testé est élevée plus est importante la diminution de l'absorbance du radical DPPH• est donc plus élevé le pouvoir de piégeage de ce radical.

En utilisant les données obtenues dans les figures 40, 41, 42, 43 et 44 précédentes, de nouvelles courbes sont obtenues représentant la fraction de DPPH• résiduelle en solution à l'état stationnaire en fonction du rapport : g d'antioxydant/g de DPPH•, comme cela est montré par la figure 45.

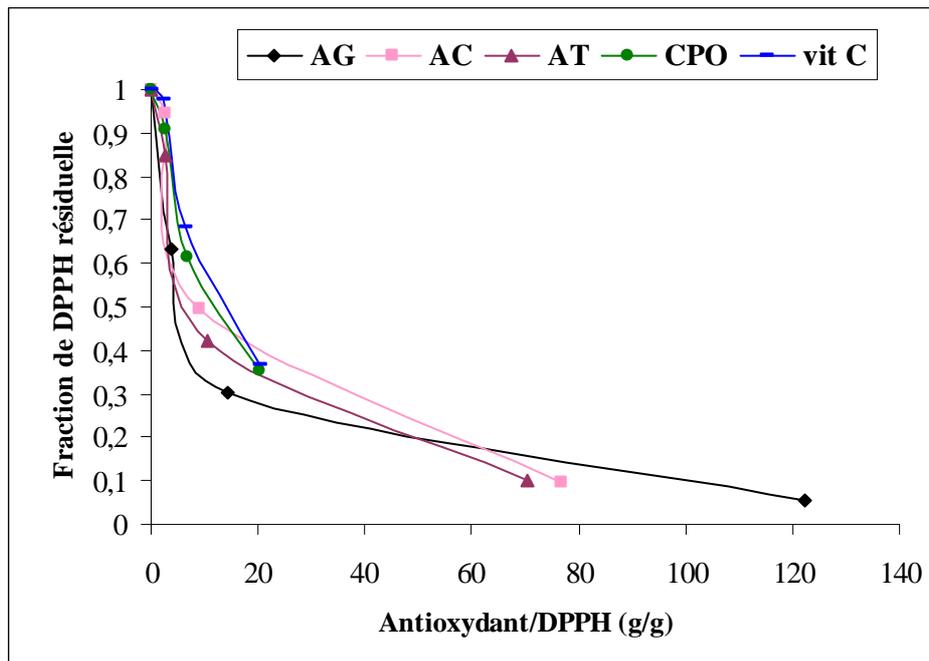


Figure 45 : Fraction de DPPH• résiduelle à l'état stationnaire en fonction du rapport quantité en antioxydant (g) / g de DPPH•. [DPPH•]_{Initiale} = 0,1mM.

On va introduire à présent la notion de concentration efficiente (ou efficace) EC_{50} , définit comme la concentration en antioxydant nécessaire pour réduire la concentration initiale de DPPH•, d'un facteur de deux, à l'état stationnaire.

Ce paramètre EC_{50} est une mesure quantitative directe de l'activité anti-oxydante, un antioxydant est plus efficace lorsqu'il présente une faible valeur de EC_{50} .

Le paramètre EC_{50} qui reflète 50% de l'activité de piégeage de ce radical, est calculé pour chaque substance à partir de la figure 47.

D'après les valeurs de EC_{50} obtenues, l'AG est le composé qui présente un pouvoir de piégeage du radical DPPH• le plus important ($EC_{50} = 6,20 \pm 0,68$ g/g de DPPH•), suivi par l'AT avec une $EC_{50} = 7,27 \pm 1,81$ g/g de DPPH•, puis par l'AC ($EC_{50} = 10,88 \pm 5,58$ g/g de DPPH•). L'extrait phénolique total quant à lui présente une EC_{50} de $12,60 \pm 0,20$ g/g de DPPH• avec une activité de piégeage plus élevée que celle de la vit C ($EC_{50} = 14,37 \pm 0,31$ g/g de DPPH•).

D'après ces résultats, tous les CP testés présentent une capacité de piégeage du radical DPPH• plus élevée que celle de la de vit C. Il existe une bonne corrélation entre la quantité des PP totaux et les tests antioxydants précédemment rapportés.

- **Association vitamine C et composés phénoliques totaux de la pulpe d'olive**

Une concentration de 150µg/ml en CPO est ajoutée à des concentrations croissantes en vit C (0 ; 10 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 µg/ml). Les résultats sont donnés par la figure 46.

Par comparaison aux pourcentages de piégeage obtenus avec la vit C à différentes concentrations, ceux obtenus en associant à chacune des concentrations en vit C, 150µg/ml de l'extrait phénolique sont plus importants.

L'addition de 150µg/ml de CPO a conduit à l'augmentation de la quantité du radical DPPH• piégée.

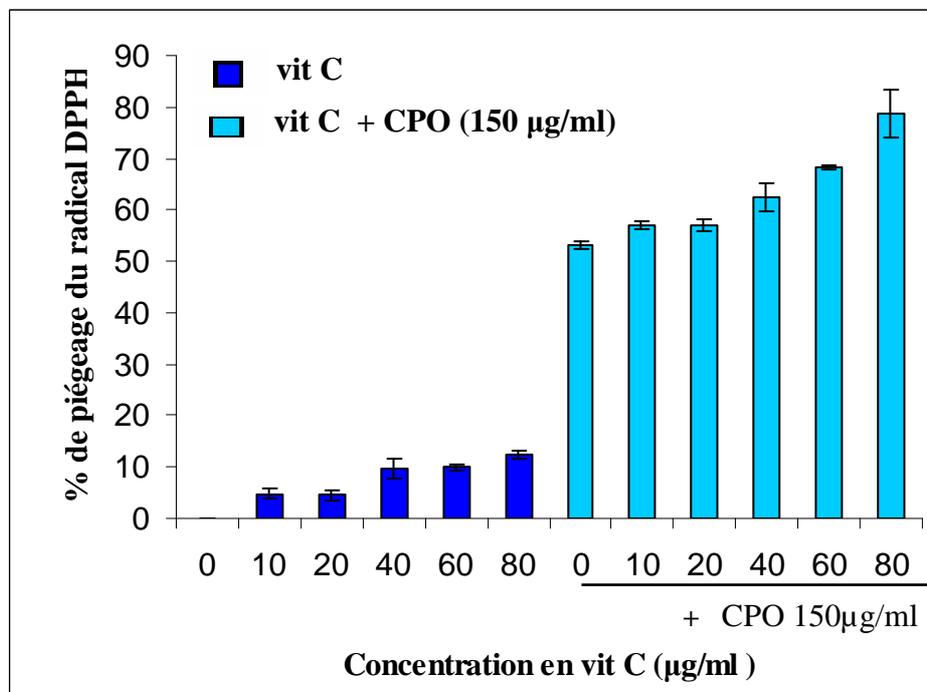


Figure 46 : L'effet de l'association CPO et vit C sur l'activité de piégeage du radical DPPH•. $[DPPH•]_{Initiale} = 0,1mM$.

La figure 47 compare l'effet obtenu dans le cas de l'association vit C et CPO et dans le cas d'un effet additif.

Dans ce cas il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre l'effet de piégeage obtenu dans le cas de l'association et dans le cas additif pour les concentrations 10, 20 et 40 $\mu\text{g/ml}$. Un effet synergique est par contre observé aux concentrations de 60 et 80 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,01$). Donc l'effet synergique entre la vit C et l'extrait phénolique total concernant la capacité de piégeage de ce radical dépend des concentrations utilisées.

Bien que l'activité anti-oxydante des PP est associée à divers mécanismes, le pouvoir réducteur et la réactivité élevée des CP vis-à-vis des RL actifs sont considérés comme les mécanismes les plus importants (ROGINSKY et LISSI, 2005).

Le DPPH \cdot est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité anti-oxydante (OLALEYE et al., 2006). La capacité à piéger le radical DPPH \cdot par les antioxydants pourrait être due à leur capacité à donner l'atome d'hydrogène (EBRAHIMZADEH et al., 2008).

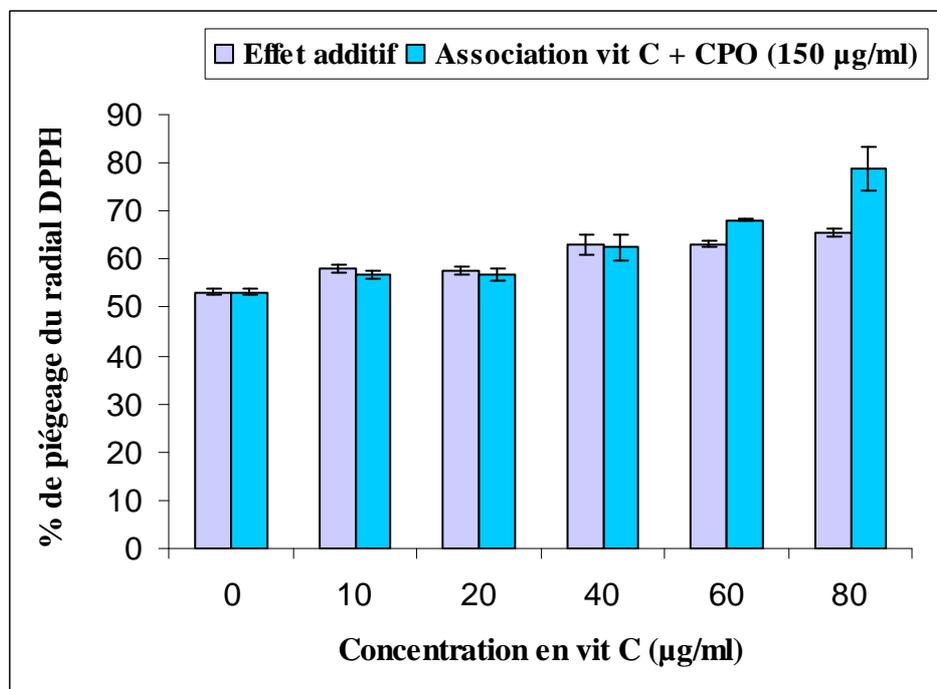


Figure 47 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association entre les CPO et la vit C sur l'activité de piégeage du radical DPPH \cdot . [DPPH \cdot]_{Initiale} = 0,1mM.

Selon GULCIN, (2006), la diminution de l'absorbance du DPPH \cdot s'explique par son piégeage par un antioxydant qui présenterait la capacité à donner l'atome d'hydrogène pour former une molécule de DPPH stable.

Le test DPPH est suggéré dans deux versions, dynamique et statique. Dans la première version, le taux de diminution de DPPH \cdot est mesuré après l'addition des échantillons contenant des phénols. Dans la version statique, on détermine la quantité de DPPH \cdot piégée par un échantillon (ROGINSKY et LISSI, 2005).

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que les CPO présentent une capacité de piégeage du radical DPPH• importante. D'autres travaux ont montrés également l'activité des PP de l'olive ou de ses dérivés dans le piégeage de plusieurs espèces radicalaires.

BOSKOU et *al.* (2006), ont examiné l'activité de piégeage de 5 extraits d'olives de tables, et ont constaté que l'activité de piégeage dépend non seulement du contenu phénolique total des différentes variétés mais aussi du type de CP. Ils ont constaté que la variété *Thrubes Crete* présente l'activité de piégeage la plus faible ($EC_{50}=587\mu\text{g}$), en dépit de son contenu élevé en PP totaux. Ceci est expliqué par le fait que cette variété contient un faible pourcentage de l'hydroxytyrosol et de tyrosol.

La capacité des PP de l'huile d'olive à neutraliser le radical DPPH•, a été également étudiée par SAIJA et *al.* (1998). Ces auteurs ont rapporté que l'oleuropeine, et particulièrement l'hydroxytyrosol ont montré une bonne capacité de piégeage dose dépendante.

Ces données sont en concordance avec plusieurs études qui ont montré la corrélation qui existe entre les PP totaux et l'activité de piégeage de DPPH• (SOUSA et *al.*, 2008 ; SAMANIEGO SANCHEZ et *al.*, 2007 ; FERREIRA et *al.*, 2007 ; BOUAZIZ et *al.*, 2004). Cependant quelques auteurs indiquent qu'il n'y a aucune corrélation entre le contenu phénolique total et la capacité de balayage des RL (YU et *al.*, 2002).

SOUSA et *al.* (2008), ont montré que l'activité anti-oxydante (pouvoir réducteur et piégeage des RL), dépend de la méthode d'extraction utilisée et donc du rendement en CP extraits. Les polarités des composants antioxydants de chaque extrait sont susceptibles d'être différentes. Le type de solvant et leur polarité peuvent affecter le transfert d'électron et de l'atome d'hydrogène. Par conséquent, le choix des solvants d'extraction est un point critique (JAYAPRAKASHA et *al.*, 2008).

Plusieurs autres travaux concordent avec les résultats obtenus concernant l'activité de piégeage du radical DPPH• par les CPO.

FERREIRA et *al.* (2007), ont montré que la capacité de piégeage du radical DPPH• par l'extrait phénolique des feuilles d'olive, riche en oleuropeine, était comparable aux activités données par l'antioxydant synthétique BHA et par l' α -tocophérol. La même constatation est faite par SOUSA et *al.* (2008), concernant les PP des olives de table variété *alcaparras*.

2.2.4 Test de piégeage du peroxyde d'hydrogène

La capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène (43mM) est évaluée. Les résultats obtenus sont donnés par la figure 48 qui donne le pourcentage de piégeage de cette espèce réactive de l'oxygène en fonction de la concentration des différents composés testés.

Les résultats indiquent qu'il y'a une proportionnalité plus au moins importante entre la concentration et l'activité de piégeage de H_2O_2 par les différentes substances testées. Les résultats sont significativement différents ($p<0,001$).

L'AC est le composé le plus actif avec un pourcentage de piégeage de $93,00 \pm 1,24$ % à une concentration de $100 \mu\text{g/ml}$. A la même concentration, l'AT montre une capacité de neutralisation de H_2O_2 de $25,31 \pm 6,96$ % suivie de l'AG ($12,50 \pm 3,06$ %).

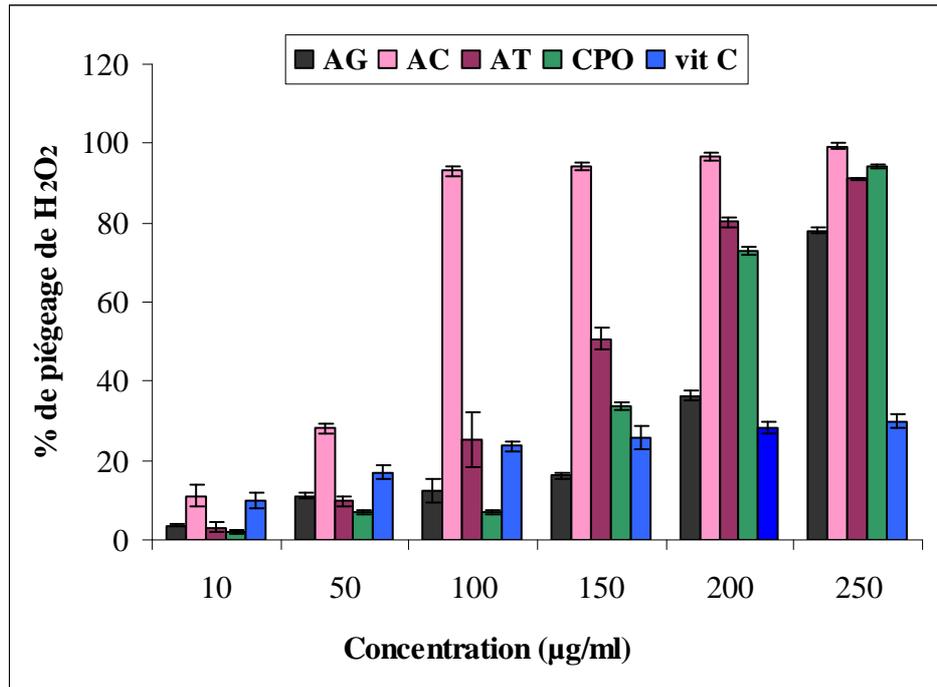


Figure 48 : Le pourcentage de piégeage de H₂O₂ (43mM) par les substances testées (CPO, AG, AC, AT et la vit C).

L'extrait phénolique ($7,07 \pm 0,50$ %) piège moins fortement H₂O₂ que la vit C ($23,64 \pm 1,24$ %) à la même concentration. Mais en augmentant les concentrations, l'activité n'augmente pas de la même manière pour l'ensemble des composés.

A la concentration la plus élevée qui est testée, à savoir 250 µg/ml, l'AC reste le composé ayant le plus grand pouvoir de piégeage de H₂O₂ ($99,27 \pm 0,73\%$), suivi par l'extrait phénolique total ($94,29 \pm 0,45$ %). La vit C est la substance qui présente un pouvoir de piégeage de cette espèce radicalaire le moins élevé soit $29,91 \pm 1,83$ % à cette concentration.

De ces résultats, il ressort que les CPO présentent un pouvoir de neutralisation du H₂O₂ plus important que la vit C, constatation faite aux concentrations de 150, 200 et 250 µg/ml.

- **Association vitamine C et composés phénoliques totaux de la pulpe d'olive**

Une concentration de 100µg/ml de CPO a été ajoutée à des concentrations croissantes en vit C (5 ; 15 ; 30 et 45µg/ml).

Les résultats obtenus sont donnés par la figure 49.

Par comparaison aux pourcentages de piégeage obtenus avec la vit C seule à différentes concentrations, ceux obtenus en associant à chacune des concentrations en vit C, 100µg/ml de l'extrait phénolique, sont plus importants.

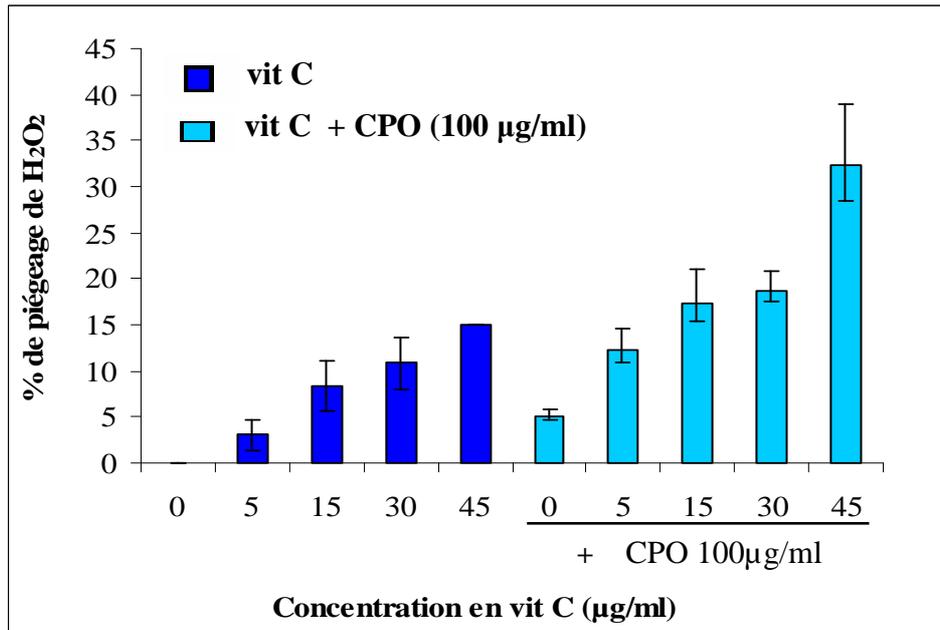


Figure 49 : L'effet de l'association CPO et vit C sur le pourcentage de piégeage de H₂O₂ (43mM).

Pour une éventuelle confirmation ou infirmation d'une existence de l'effet synergique entre les CPO et la vit C, une comparaison entre l'effet additif et l'effet trouvé après association a été faite. Les résultats indiquent (figure 50) qu'il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$) entre l'effet additif et l'effet d'association retrouvé, en utilisant les concentrations de 5, 15 et 30 µg/ml.

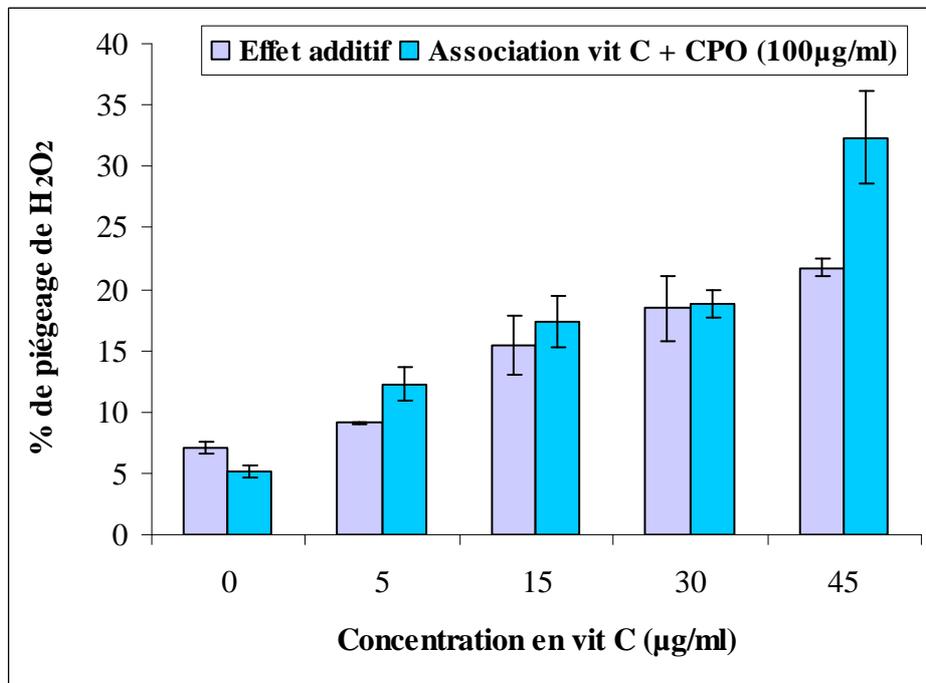


Figure 50 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association CPO et vit C sur le pourcentage de piégeage de H₂O₂ (43mM).

Un effet synergique est retrouvé dans le cas où à 45µg/ml en vit C est ajoutée une concentration de 100 µg/ml en CPO, il y'a une différence significative ($0,05 > p > 0,01$) entre $32,34 \pm 3,80$ % (effet de l'association) et $21,76 \pm 0,69$ % (effet additif).

Plusieurs études ont rapporté que l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène augmente avec la concentration en PP (BALASUNDRAM et *al.*, 2005 ; GOKTURK BAYDAR et *al.*, 2007 ; WANG et *al.*, 2008).

La mesure de l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène peut être l'une des méthodes utiles pour la détermination de la capacité des antioxydants à diminuer le niveau des pro-oxydants tels que H₂O₂ (PAZDZIOCH-CZUCHRA et WIDENSKA, 2002).

Le piégeage du peroxyde d'hydrogène par les CP est attribué à leur capacité à donner un électron (WETTASINGHE et SHAHIDI, 2000).

L'AG et la vit C ont montré des capacités de piégeage de H₂O₂ (BALASUNDRAM et *al.*, 2005). L'AG présente un pourcentage de piégeage de $93,2 \pm 0,6$ % plus élevé que celui de la vit C ($70,4 \pm 2,5$ %) selon BALASUNDRAM et *al.* (2005). Ceci concorde parfaitement avec nos résultats.

Le pouvoir réducteur et la capacité de piégeage de RL, deux mécanismes principaux qui sont à la base de l'activité anti-oxydante des CP.

Plusieurs travaux ont décrit la capacité des CPO ou de ses dérivés à piéger plusieurs RL dont le radical DPPH• et le radical ABTS⁺ (SAMANIEGO SANCHEZ et *al.*, 2007).

Généralement, les mécanismes mis en jeu pour le piégeage des RL sont les mêmes à savoir la capacité à donner des protons et des électrons (BENAVENTE-GARCIA et *al.*, 2000 ; ALDINI et *al.*, 2006).

Selon certains travaux, la capacité réductrice est augmentée par les orientations ortho et para des groupements hydroxyles du phénol (CHIMI et *al.*, 1991 ; CHEN et *al.*, 1996 ; MCDONALD et *al.*, 2001). Le nombre de substituant hydroxyle dans le noyau aromatique et la nature des substituants en position para ou ortho, sont des caractéristiques structurales importantes déterminant l'activité (CHIMI et *al.*, 1991). Ces composés réagissent avec les RL et génèrent un nouveau radical stabilisé par l'effet de résonance du noyau aromatique (CUVELIER et *al.*, 1992).

Des études semblables sur les flavonoïdes ont montré que le degré de l'activité anti-oxydante est corrélé avec le nombre de groupes hydroxyles. Le nombre de groupes OH et leurs positions sur le noyau aromatique sont des paramètres importants pour les flavonoïdes et les phénols en général (RICE-EVANS et *al.*, 1996 ; CAO et *al.*, 1997).

En particulier, la substitution ortho di-phénolique donne une activité anti-oxydante élevée, alors qu'un seul substituant hydroxyle, comme dans la structure du tyrosol, ne confère qu'une faible activité, puisque le tyrosol ne protège pas les LDL contre l'oxydation induite chimiquement (TRIPOLI et *al.*, 2005).

Selon BOUAZIZ et *al.*, (2004), les extraits au méthanol de la pulpe d'olive variété *chamlal* exercent une activité anti-oxydante, en piégeant le DPPH•, à tous les stades de maturation. La plus faible IC₅₀ (1,4 µg/ml) est observée pour l'échantillon récolté fin février. Cela est du probablement à la concentration élevée des o-diphénols tels que l'hydroxytyrosol et la lutéoline.

Selon BENAVENTE-GARCIA *et al.* (2000), l'activité anti-oxydante de l'oleuropéine est principalement due à la partie hydroxytyrosol dans sa structure.

L'autre facteur qui détermine le potentiel antioxydant des CP est la stabilité du radical aroxyl formé (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 2000). Les propriétés anti-oxydantes des o-diphénols sont associées à leur capacité à former des liaisons hydrogènes intermoléculaires entre le groupe hydroxyle et les radicaux phenoxyliques (VISIOLI *et GALLI*, 1998).

Les résultats que nous avons obtenus, concordent avec ces conclusions tirées par la littérature. D'après les résultats obtenus jusqu'à présent, l'AG a montré globalement la plus haute activité qui peut s'expliquer par le fait que son cycle aromatique porte trois groupes hydroxyles, l'activité anti-oxydante augmentant avec le degré d'hydroxylation.

L'AC présente également une activité importante de part sa structure o-diphénolique. L'AT constitué de plusieurs molécules d'AG, montre une capacité réductrice et de piégeage de RL importantes mais le plus souvent légèrement plus faibles que celle de l'AG. Ces résultats ne s'appuient pas toujours que sur le fait de l'augmentation du degré d'hydroxylation.

Quant à l'activité anti-oxydante des CPO, elle peut être expliquée en grande partie par la richesse de cet extrait en CP ayant une structure o-diphénolique.

2.2.5 Résultats de l'étude sur les érythrocytes humains

2.2.5.1 Test de l'hémolyse

- **L'action hémolytique du peroxyde d'hydrogène**

L'action du H₂O₂ sur l'induction de l'hémolyse est étudiée. Les résultats obtenus sont donnés par la figure 51 qui donne le pourcentage de l'hémolyse obtenu en présence de différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène.

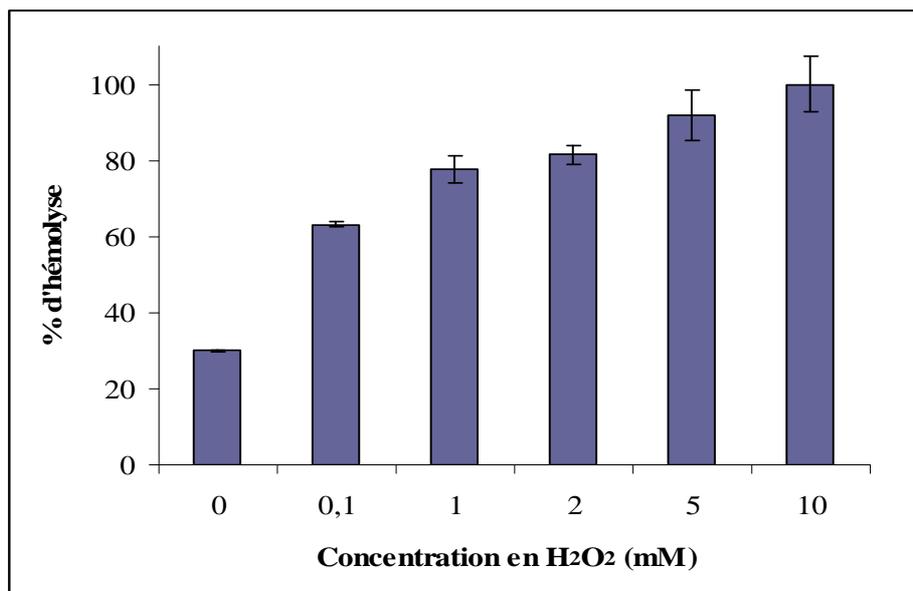


Figure 51 : L'effet à différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène sur l'induction de l'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v).

Les résultats montrent que plus la concentration en H₂O₂ mise en présence des érythrocytes augmente, plus est élevé le pourcentage de l'hémolyse retrouvé. Une différence significative entre les résultats obtenus est trouvée (p<0,001).

En absence du H₂O₂, un pourcentage d'hémolyse de 30 ± 0,21% a été obtenu. Ce taux d'hémolyse retrouvé sur des érythrocytes normaux pourrait être expliqué par l'hémolyse physiologique qui dépend de l'âge des cellules, en plus des effets dus à leur manipulation, notamment lors des lavages par centrifugation.

A une concentration de 0,1 mM de H₂O₂, le taux d'hémolyse est de 63,17 ± 0,52 %, celui-ci passe à 77,65 ± 3,67% en utilisant une concentration de 1mM.

Le pourcentage d'hémolyse continue à augmenter jusqu'à atteindre un taux d'hémolyse maximum de 100 % en présence du peroxyde d'hydrogène à une concentration de 10mM.

- **La cinétique de l'hémolyse peroxyque**

D'après les résultats de l'action de H₂O₂ sur l'induction de l'hémolyse, la concentration de 5mM qui a conduit à un taux d'hémolyse important de 91,87 ± 6,81 % est retenue comme système de stress oxydant. Ce système pro-oxydant est utilisé par la suite pour l'évaluation de la protection des différents CP et de la vit C contre l'hémolyse.

La cinétique de l'hémolyse induite sous l'action de H₂O₂ (5mM) est suivie. Ceci aura comme but l'appréciation de la vitesse de l'action hémolytique de H₂O₂ ainsi que la détermination du temps à partir duquel le taux maximum de l'hémolyse serait observé.

Les résultats sont donnés par la figure 52 qui présente le pourcentage d'hémolyse enregistré en présence de H₂O₂ (5mM), après différents temps d'incubation.

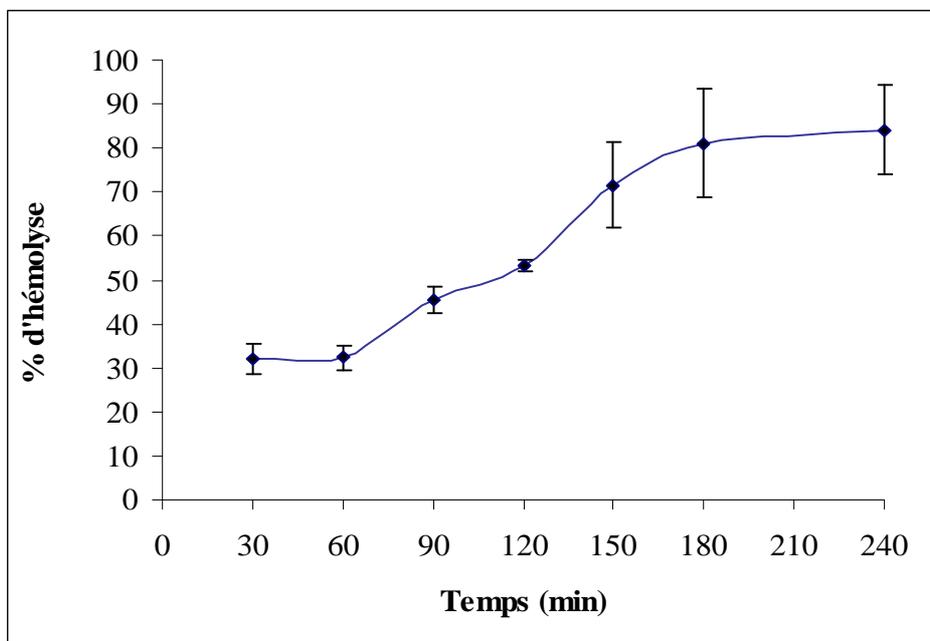


Figure 52 : Le pourcentage d'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v) induit par H₂O₂ (5mM) en fonction du temps.

Après un temps de 30 minutes, un pourcentage d'hémolyse de $31,99 \pm 3,46$ % est enregistré, et reste pratiquement le même ($32,34 \pm 2,77$ %) après 60 min d'incubation. Ce n'est qu'au bout de 120 min d'incubation que le taux d'hémolyse passe à $53,42 \pm 1,26$ %.

A partir de ces résultats, on constate que le taux d'hémolyse maximal est atteint au bout de 180 min. Le temps d'incubation retenu est de 3 heures permettant ainsi d'avoir un taux d'hémolyse important, pour le test concernant la détermination du pouvoir anti-hémolytique des différents composés à tester.

De multiples articles ont décrit que de hautes concentrations de H_2O_2 ($>50\mu M$) sont cytotoxiques pour les animaux, plantes et cellules bactériennes en culture (HAMPTON et ORRENIUS, 1997 ; GONZALEZ-FLECHA et DEMPLE, 1997). Le peroxyde d'hydrogène est connu pour pouvoir traverser facilement la membrane cellulaire (HALLIWELL, 2006).

HAMPTON et ORRENIUS, (1997) ont indiqué que les doses létales et le mode de la mort cellulaire induit dépend du type de cellule utilisé, son état physiologique, le temps d'exposition à H_2O_2 , sa concentration et le milieu de culture cellulaire utilisé.

En terme chimique, H_2O_2 est faiblement réactif. Il peut agir en tant qu'agent d'oxydation douce, mais n'oxyde pas la plupart des molécules biologiques aisément (HALLIWELL et al., 2000).

Les globules rouges humains peuvent être oxydés *in vitro* par divers agents tels que les peroxydes à l'exemple de H_2O_2 et les radicaux peroxydes. A cause de son rôle oxydant dans les globules rouges, H_2O_2 est fréquemment utilisé pour déclencher la formation de RL dans des cellules intactes (TEDESCO et al., 2001 ; SHIVA SHANKAR REDDY et al., 2007).

Plusieurs travaux concordent avec les résultats que nous avons obtenu concernant l'effet hémolytique de H_2O_2 *in vitro* (AGAR et BAKER, 1996 ; TEDESCO et al., 2001 ; KAVIARASAN et al., 2004 ; BISWAS et al., 2005 ; RODRIGUEZ et al., 2006 ; SHIVA SHANKAR REDDY et al., 2007).

L'augmentation du taux d'hémolyse en fonction du temps est décrite également par MANNA et al. (1999) sur des hématies dont le stress oxydant est induit de la même manière au moyen de H_2O_2 .

- **L'action du peroxyde d'hydrogène sur la fragilité osmotique**

L'effet du peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations (0 ; 1 ; 5 et 10mM) sur la fragilité osmotique des érythrocytes est déterminé.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV, on constate que la fragilité osmotique augmente avec l'augmentation de la concentration en H_2O_2 .

Le pourcentage d'hémolyse en absence de H_2O_2 à la concentration physiologique de NaCl (0,9%), est de $49,00 \pm 0,21$ %. A cette concentration en NaCl, le taux d'hémolyse augmente avec l'augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène, il est passé de $49,00 \pm 0,21$ à $78,28 \pm 17,02$ % pour une concentration de 10mM de H_2O_2 .

En diminuant la concentration en NaCl, le taux d'hémolyse augmente avec la concentration en H_2O_2 . Par exemple le pourcentage d'hémolyse est passé de $83,89 \pm 0,52$ % à $99,80 \pm 1,35$ % en présence d'une concentration de 10 mM en peroxyde d'hydrogène à une concentration en NaCl de 0,1 %.

Tableau IV : Pourcentages d'hémolyse obtenus en présence de différentes concentrations en H₂O₂ et en NaCl.

H ₂ O ₂ (mM)	Concentration en NaCl (%)		
	0,1	0,4	0,9
0	83,89 ± 0,52	72,00 ± 0,75	49,00 ± 0,21
1	89,80 ± 3,62	79,47 ± 10,25	50,90 ± 0,42
5	95,00 ± 0,45	79,61 ± 3,09	51,14 ± 1,45
10	99,80 ± 1,35	88,42 ± 7,11	78,28 ± 17,02

Ces résultats indiquent que la fragilité osmotique augmente avec l'augmentation du stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène.

Ces résultats sont appuyés par d'autres travaux comme ceux réalisés par SHIVA SHANKAR REDDY *et al.* (2007), qui ont montré que des concentrations croissantes en H₂O₂ (0,5 ; 2 et 8mM) ont augmenté la fragilité osmotique des globules rouges. Cela est expliqué par la réduction de la fluidité membranaire et donc des capacités des érythrocytes à résister aux changements osmotiques. C'est effectivement la membrane qui est affectée sous l'effet du stress oxydant induit par H₂O₂, ce qui explique le phénomène d'hémolyse observé en présence de cette espèce radicalaire.

Les effets d'autres agents oxydants sur l'augmentation de la fragilité osmotique des globules rouges ont été également décrits à l'exemple du radical AAPH (BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, 2003).

- **L'inhibition de l'hémolyse**

Dans ce test, les conditions préalablement optimisées sont utilisées. Ainsi H₂O₂ à 5mM induisant le stress oxydant sur les érythrocytes pendant 3 heures d'incubation est appliqué. L'activité anti-hémolytique des substances à tester, est déterminée dans ces conditions fixées.

Les résultats obtenus sur l'effet anti-hémolytique des composés testés sont présentés par la figure 53. Cette figure donne le pourcentage de l'inhibition de l'hémolyse en fonction de la concentration.

Trois concentrations de chaque composé sont testées (50 ; 100 et 150µg/ml). On constate que le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse augmente avec la concentration des composés.

L'extrait en CPO a montré une activité anti-hémolytique à différentes concentrations, soit un pourcentage d'inhibition de l'hémolyse de 29,42 ± 7,96 %, de 56,27 ± 6,37% et de 62,58 ± 3,07 % aux concentrations de 50, 100 et 150 µg/ml respectivement.

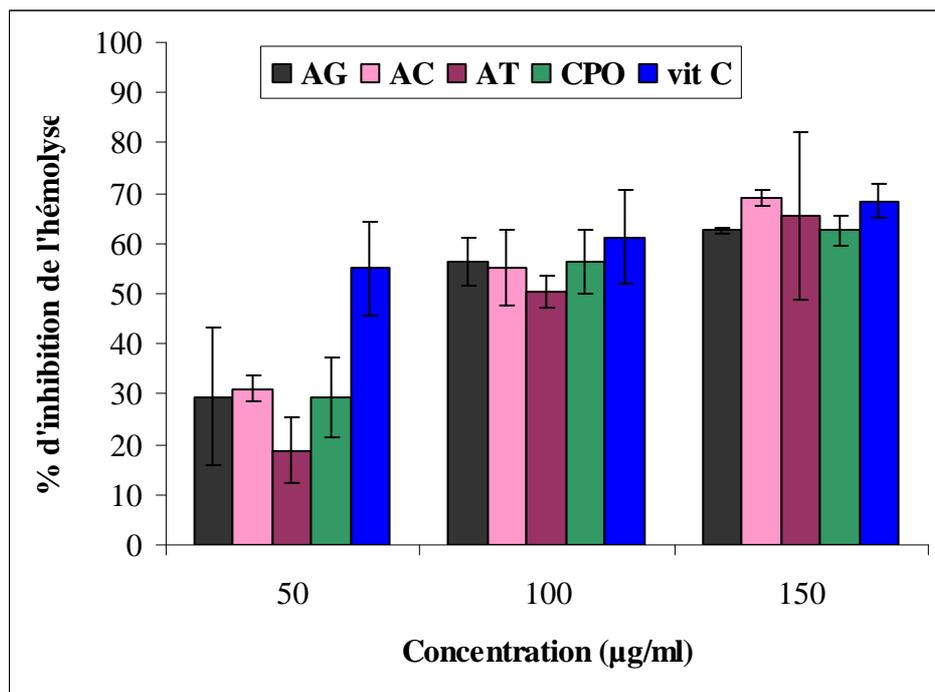


Figure 53 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v) par les différentes substances testées (AG, AC, AT, CPO et vit C).

A partir des valeurs de IC_{50} (la concentration inhibant l'hémolyse de 50%), la vit C montre une activité anti-hémolytique la plus importante avec une IC_{50} de $40,3 \pm 6,97 \mu\text{g/ml}$, suivie par l'AG (IC_{50} de $75 \pm 25 \mu\text{g/ml}$) et l'AC (IC_{50} de $78,94 \pm 5,26 \mu\text{g/ml}$). Quant au CPO, ils présentent également une activité anti-hémolytique assez importante avec une IC_{50} de $86,83 \pm 5,26 \mu\text{g/ml}$. Enfin l'AT présente une activité légèrement inférieure aux autres CP avec une IC_{50} de $90,53 \pm 6,75 \mu\text{g/ml}$.

- **Association vitamine C et composés phénoliques totaux de la pulpe d'olive**

Une concentration de $50\mu\text{g/ml}$ de l'extrait phénolique total est testée en présence de concentrations croissantes en vit C (5 ; 10 ; 15 et $20\mu\text{g/ml}$). Les résultats obtenus sont donnés par la figure 54.

Par comparaison aux pourcentages d'inhibition de l'hémolyse obtenus avec la vit C seule à différentes concentrations, ceux obtenus en associant à chacune des concentrations en vit C, $50\mu\text{g/ml}$ de l'extrait phénolique sont plus importants.

Pour savoir est-ce qu'il s'agit d'un effet synergique, une comparaison entre l'effet additif et l'effet obtenu après association est réalisée. Les résultats (figure 55) indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre l'effet additif et l'effet d'association retrouvé, aux différentes concentrations en vit C utilisées. Donc il s'agit bien d'un effet additif.

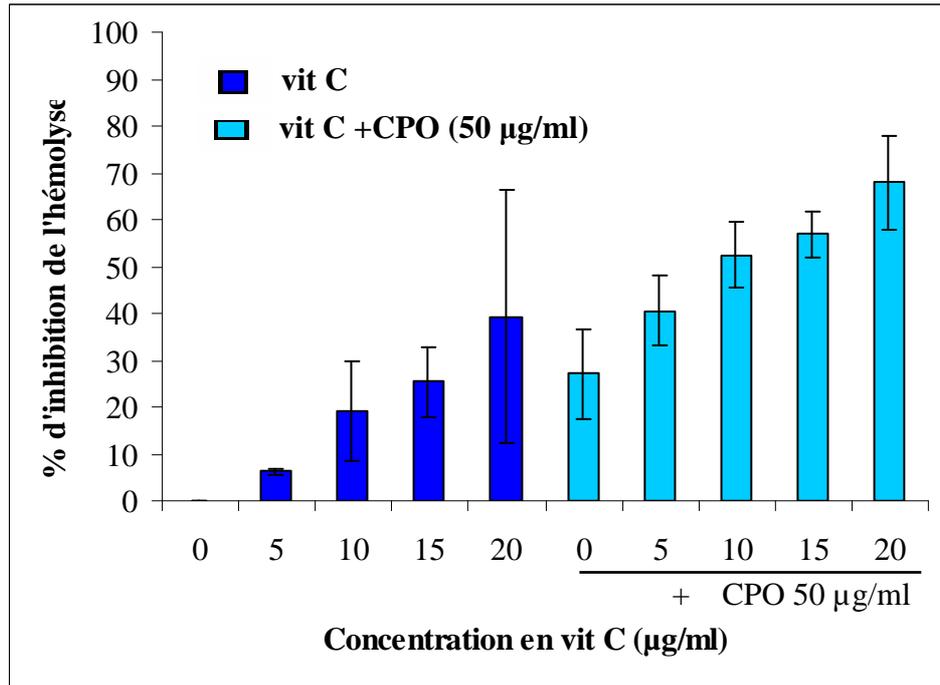


Figure 54 : L'effet de l'association CPO et vit C sur l'inhibition de l'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v).

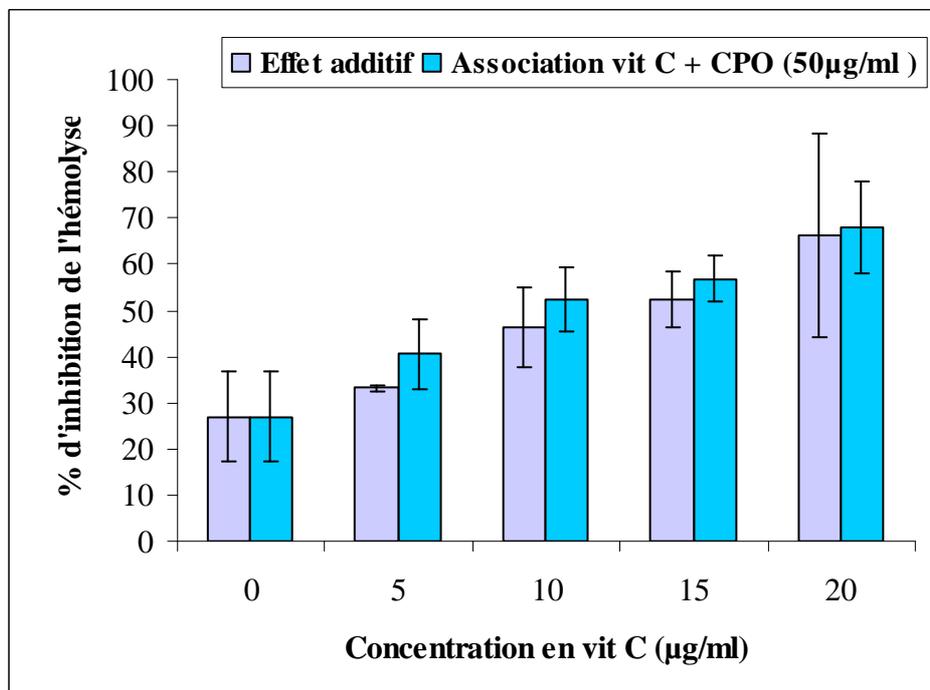


Figure 55 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association CPO et vit C sur l'inhibition de l'hémolyse d'une solution d'érythrocytes (5%, v/v).

Plusieurs travaux ont rapporté l'effet protecteur des PP contre l'hémolyse (KAVIARASAN et al., 2004 ; SAFFARI et SADRZADEH, 2004 ; SANGEETHA et al., 2005 ; CHEN et al., 2007).

L'effet anti-hémolytique des PP de l'olive est également étudié. Les résultats de plusieurs auteurs s'accordent avec les résultats obtenus dans cette étude.

PAIVA-MARTINS et al. (2009), ont étudié la capacité de certains CP de l'huile d'olive à protéger les globules rouges humains des dommages oxydatifs induits par les radicaux peroxydes (AAPH). Les résultats ont montré que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol protègent les érythrocytes contre l'hémolyse à de faibles concentrations (20-40 μ M). L'effet protecteur de l'hydroxytyrosol contre l'hémolyse a été déjà mis en évidence par MANNA et al., (1999).

Par ailleurs, ALDINI et al. (2006), ont examiné le rôle protecteur de l'extrait alcoolique des résidus de l'olive variété *Coratina* et l'extrait purifié *Oleoselect*, sur l'hémolyse de globules rouges de rat induite par l'hydroperoxyde de cuivre. L'extrait hydroalcoolique a présenté une IC_{50} de $1,7 \pm 0,20$ μ g/ml et *Oleoselect* une IC_{50} de $0,38 \pm 0,03$ μ g/ml.

FERREIRA et al. (2007) ont montré que même l'extrait phénolique des feuilles d'*Olea europaea* L, riche en oleuropeine a protégé les érythrocytes contre l'hémolyse induite par les radicaux AAPH.

Nos résultats concordent avec ceux décrits par la littérature quant à l'activité protectrice des CPO contre l'hémolyse induite dans des conditions de stress oxydant. Les PP impliqués seraient très probablement l'oleuropeine ainsi que les autres composés o-diphénoliques tels que le verbascoside et le ligstroside. Les acides phénoliques tels que l'AG et l'AC testés ont montré des capacités protectrices, font partie des CPO. Ils contribuent certainement à cette activité générale des CPO en plus, de celles des flavonoïdes.

Les érythrocytes constituent un modèle général utile pour évaluer les effets des ERO et des antioxydants sur un système cellulaire. Le choix porté le plus souvent sur les globules rouges comme modèle d'étude s'explique par sa simplicité structurale et fonctionnelle (BUKOWSKA et al., 2007).

De plus, l'érythrocyte constitue notamment un bon modèle cellulaire pour l'étude du stress oxydant de part sa richesse en hémoglobine en fer ainsi que la richesse de sa membrane en acides gras polyinsaturés vulnérables à l'oxydation. En outre ce type cellulaire compte parmi les cellules qui sont le plus exposées à l' O_2 et donc au risque du stress oxydant.

Les mécanismes conduisant, dans des conditions de stress oxydant, à l'hémolyse sont largement étudiés. Des modifications de la morphologie cellulaire, de l'hémoglobine et donc de la fonction ont été décrits.

SINGH et RAJINI (2008), ont analysé par micrographie électronique l'aspect d'érythrocytes traités par H_2O_2 . La cellule non traitée apparaît sous forme normale de discocytes (annexe 4) alors que l'exposition à H_2O_2 , a conduit à un changement de la forme cellulaire et la formation d'échinocytes (annexe 4). La même constatation est faite par AJILA et PRASADA RAO (2008). Selon ces auteurs, les altérations morphologiques n'ont pas été observées en incubant les érythrocytes en présence de PP.

Le stress oxydant mène à la formation de l'échinocyte en raison des dommages membranaires, qui donc mènent aux changements de la conformation structurale entière du globule rouge et de son fonctionnement (LINDERKAMP *et al.*, 1997).

Le H₂O₂ qui traverse la membrane, agit à l'intérieur de la cellule en formant des radicaux ferryles et hydroxyles par interaction avec l'hémoglobine et déclenche une série de réactions qui conduisent enfin à l'hémolyse (VAN DEN BERG *et al.*, 1992).

Des investigations étendues ont démontré le rôle principal du stress oxydant dans la libération du fer de l'hémoglobine sous une forme réactive. Ceci conduit à des dommages des protéines et des lipides membranaires par l'intermédiaire de la réaction de Fenton qui produit le radical hydroxyle conduisant à l'hémolyse des globules rouges (BOCCI *et al.*, 1980 ; RODRIGUEZ *et al.*, 2006 ; CICCOLI *et al.*, 2008).

DAS *et al.* (1992) ont rapporté que H₂O₂ convertit l'oxyhémoglobine en ferrimyoglobine, et puis O₂^{·-} et/ou H₂O₂ agissent sur la ferrihémoglobine pour libérer Fe³⁺ du noyau hème. Fe³⁺ peut alors être réduit en Fe²⁺ par O₂^{·-}, qui peut catalyser la formation de OH[·] par l'intermédiaire de la réaction de Fenton. Cependant, selon GUITTON *et al.* (1998), le radical OH[·] peut être formé par réaction de la porphyrine de l'hémoglobine avec H₂O₂ directement.

D'après CICCOLI *et al.* (2008), la structure de la méthémoglobine perd sa symétrie plane et le fer est éloigné du centre du plan. Par conséquent la liaison du fer à l'azote est moins stable. Une telle diminution dans la stabilité de liaison a pu expliquer la libération du fer en concomitance avec la formation de méthémoglobine.

TEDESCO *et al.* (2001) ont détecté une augmentation remarquable du contenu en méthémoglobine des érythrocytes stressés par H₂O₂ (100µM) et ont montré le rôle des anthocyanines dans la protection contre cette modification oxydative de l'hémoglobine. Ils ont mesuré également la formation des ERO dans les hématies après traitement avec H₂O₂ en présence de l'azide de sodium.

Le dommage oxydatif peut toucher les composants protéiques et lipidiques de la membrane. Selon SICINSKA *et al.* (2006), l'oxydation de l'hémoglobine peut être induite par les produits de l'oxydation des lipides et/ou être le résultat de l'inhibition des enzymes anti-oxydantes.

Plusieurs études ont montré l'existence d'une bonne corrélation entre le degré de l'hémolyse et la génération de radicaux hydroxyles HO[·] (SADRZSDEH *et al.*, 1984 ; DAS *et al.*, 1992).

Le OH[·] est un oxydant efficace qui réagit non spécifiquement avec le matériel organique. En soustrayant un atome d'hydrogène des acides gras polyinsaturés, il peut lancer le processus de la peroxydation lipidique, endommageant ainsi la membrane et conduire à la mort cellulaire (SADRZSDEH *et al.*, 1984).

A partir des travaux scientifiques entrepris concernant les mécanismes conduisant à l'hémolyse, on peut suggérer que l'effet anti-hémolytique des CP testés dont les CPO, pourrait être du à la prévention de la formation de la méthémoglobine, suite au piégeage du peroxyde d'hydrogène. Ceci pourrait empêcher ou diminuer la formation du radical hydroxyle et donc prévenir les dommages oxydatifs des constituants membranaires empêchant ainsi

l'induction de l'hémolyse. Un autre mécanisme de protection possible serait le piégeage des radicaux hydroxyles s'ils sont formés, en plus d'un possible pouvoir chélateur de métaux (le fer) de ces molécules.

VERSTRAETEN *et al.* (2003) ont rapporté que les flavanols et les procyanidines interagissent avec les phospholipides de la membrane par des liaisons hydrogènes sur les groupes principaux polaires des phospholipides. Par conséquent, ces composés peuvent s'accumuler à la surface de la membrane réduisant ainsi l'accès des molécules radicalaires délétères à la région hydrophobe de la bicouche. Ce qui empêcherait ou réduirait les dommages oxydants aux composants de la membrane.

On peut suggérer que les CPO pourraient s'accumuler de cette manière au niveau de la surface membranaire et réduire ainsi l'accès du peroxyde d'hydrogène à la cellule prévenant ainsi l'hémolyse.

En outre, il a été suggéré que les PP s'ils sont localisés à l'intérieur de la membrane, pourraient altérer sa rigidité. Un autre mécanisme possible de leur activité pourrait être de stabiliser la membrane en diminuant sa fluidité (ARORA *et al.*, 2000). La restriction de sa fluidité pourrait empêcher la diffusion de H₂O₂ et par conséquent ses dommages.

Quant à l'activité anti-hémolytique importante présentée par la vit C, elle pourrait s'expliquer notamment sur un système cellulaire, par sa capacité à régénérer α -tocophérol en réduisant les radicaux α -tocopheryles sur la surface membranaire (CAZZOLA *et al.*, 2003). En plus de sa capacité à piéger les RL comme il a été démontré dans la première partie expérimentale.

2.2.5.2 Test de la peroxydation lipidique

- **Définition d'un système d'oxydation efficace**

Un système pro-oxydant efficace induisant l'oxydation des lipides membranaires érythrocytaires est déterminé. Deux systèmes oxydants sont testés : un système utilisant H₂O₂ et un autre système H₂O₂-FeSO₄ générateur de radicaux hydroxyles.

Le contenu en protéines des membranes érythrocytaires est déduit à partir d'une courbe étalon (figure 56) préparée en utilisant la BSA comme standard.

Les résultats obtenus concernant la quantité en MDA, le produit d'oxydation des lipides, générée par les deux systèmes sont illustrés par la figure 57.

D'après les résultats obtenus, on constate que les deux systèmes pro-oxydants testés induisent, de manière plus au moins forte, l'oxydation des lipides membranaires érythrocytaires qui s'est manifestée par la formation du MDA.

Le système oxydant H₂O₂-FeSO₄ induit plus fortement la peroxydation lipidique comparativement au système utilisant le peroxyde d'hydrogène uniquement. Une différence significative est trouvée ($p < 0,001$), entre les différents résultats obtenus.

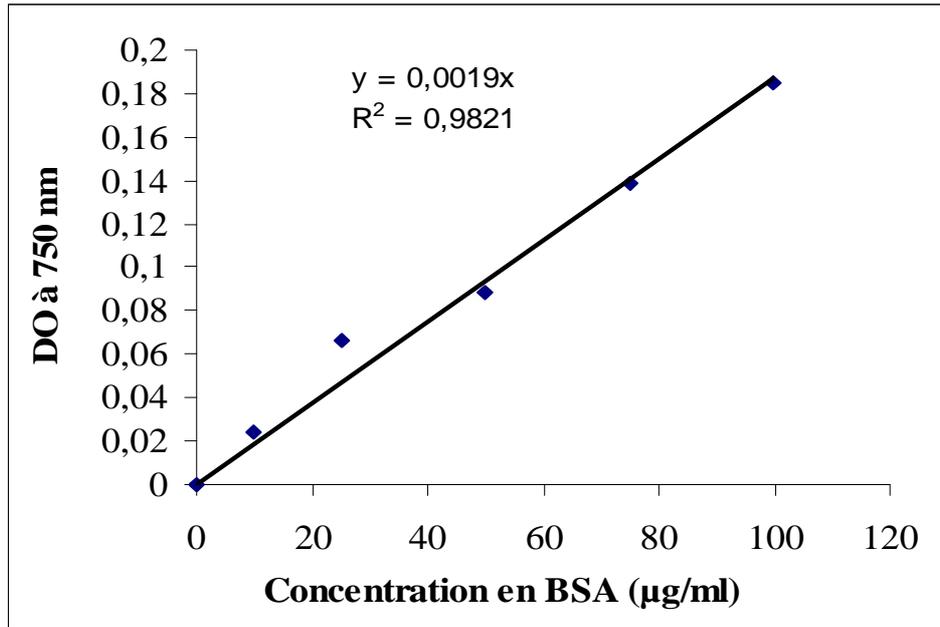


Figure 56 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de protéines.

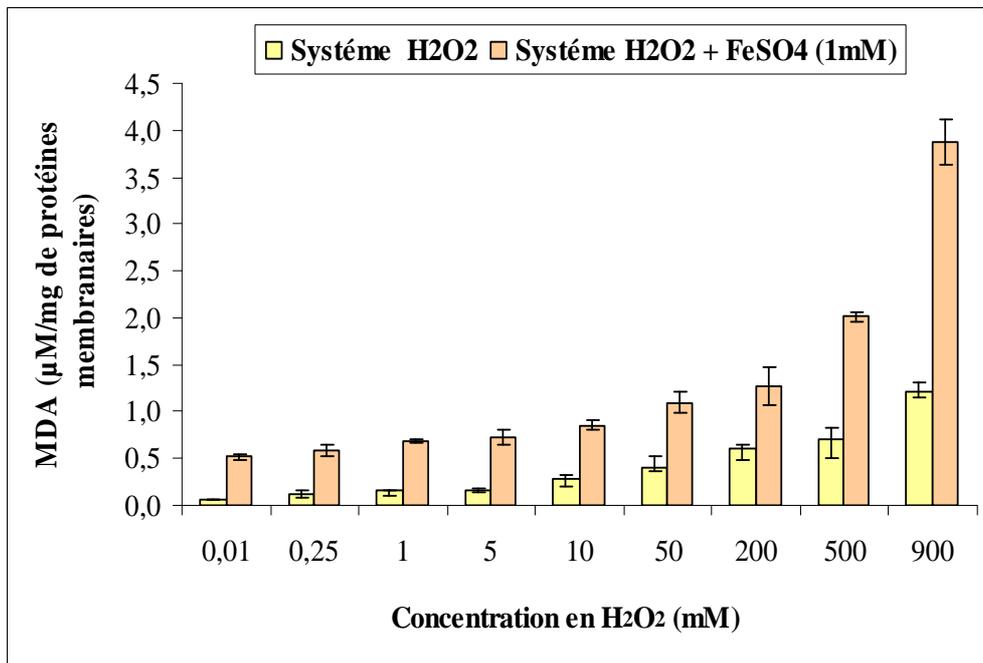


Figure 57 : La formation du MDA sous l'effet des différents systèmes d'oxydation, H₂O₂ et H₂O₂/FeSO₄, sur les membranes érythrocytaires (1mg/ml).

Par exemple, une concentration de 0,01mM de H₂O₂ en présence du fer, a induit la formation de 0,52 ± 0,02 µM/mg de protéines membranaires du MDA contre uniquement 0,05 ± 0,005µM/mg de protéines membranaires en absence du fer soit 10 fois moins. On constate qu'il y'a une augmentation très importante de la quantité du MDA formée en présence du fer.

Une quantité de 3,88 ± 0,24 µM/mg de protéines membranaires en MDA est formée en utilisant 900mM de H₂O₂ en présence du fer. Alors qu'à la même concentration en H₂O₂ mais en absence du fer seulement une quantité de 1,21 ± 0,10 µM/mg de protéine membranaires de MDA est formée.

De là on constate que le système H₂O₂ /FeSO₄ est plus efficace comme système pro-oxydant pour l'induction de la peroxydation lipidique.

Le système H₂O₂/FeSO₄ est plus oxydant, puisque il génère des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton. Ces radicaux sont connus pour leur effet oxydatif sur les lipides (RAZZABONI et BOLSAITIS, 1990). Selon HALLIWELL, (1991), le radical OH[·] est capable de stimuler la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique. Ceci se produit notamment quand OH[·] est produit à proximité des membranes où les chaînes latérales d'acides gras des phospholipides membranaires sont attaquées.

Le système H₂O₂ (900mM) /FeSO₄ (1mM) étant le système qui induit le plus fortement la peroxydation lipidique. De ce fait, cette condition est utilisée pour l'induction du stress oxydant des lipides et pour évaluer le degré de protection des différentes substances à tester contre l'oxydation des lipides de la membrane du globule rouge.

Des études menées par SATO et *al.* (1995) ont montré que l'action hémolytique d'AAPH a pu être associée à l'oxydation des composants lipidiques présents dans la membrane d'érythrocyte. Dans le même sens, SHIVA SHANKAR REDDY et *al.* (2007), ont montré que l'incubation du H₂O₂ à différentes concentrations (0 ; 5 ; 2 et 8mM) en présence de membranes érythrocytaires a conduit à la génération du MDA.

BENEDETTI et *al.* (2004) ont rapporté qu'après traitement des érythrocytes avec 50mM d'AAPH, une hémolyse temps-dépendent a été observée avec une accumulation significative de TBARS comme conséquence aux attaques causées par les RL sur les composants surtout lipidiques de la membrane cellulaire causant des changements dans sa structure et sa fonction.

Les membranes cellulaires, qui contiennent beaucoup de phospholipides, tels que la phosphatidylcholine (lécithine), sont les cibles principales des RL qui induisent la peroxydation des lipides et de ce fait causent des dysfonctionnements de la membrane en altérant sa fluidité ainsi que la fonction des récepteurs et des enzymes membranaires (JANA et *al.*, 1990).

Il existe une relation entre la peroxydation lipidique et l'hémolyse. D'après RICE-EVANS et BURDON (1994), la formation de RL peut alternativement induire une réduction dans la fluidité de la membrane et augmenter sa fragilité. Cela suggère que le processus de peroxydation lipidique pourrait au moins partiellement contribuer à l'effet hémolytique des RL.

La génération des MDA par décomposition des peroxydes lipidiques touche aux propriétés mécaniques intrinsèques de la membrane et peut conduire à la diminution de la

fluidité membranaire (RODRIGUEZ et al., 2006). Ceci compromet la déformabilité des érythrocytes ce qui rend difficile la livraison de l'oxygène aux tissus et augmente l'hémolyse (PFAFFEROTT et al., 1982 ; RODRIGUEZ et al., 2006). Le MDA peut également causer un attachement de l'hémoglobine aux protéines membranaires squelettiques (SHARMA et PREMACHANDRA, 1991) ce qui augmente par la suite la rigidité de la membrane et donc la perte de la déformabilité.

- **La cinétique de la formation du MDA sous l'effet du système pro-oxydant choisi**

La quantité de MDA formée au cours du temps suite à l'oxydation des lipides membranaires érythrocytaires (1mg/ml), sous l'action du système oxydant préalablement choisi, à savoir le système H₂O₂ (900mM) /FeSO₄(1mM) est déterminée.

La quantité en MDA formée est mesurée après 5min, 10min, 30min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4 h et 5 h d'incubation. Les résultats sont donnés par la figure 58.

On constate que la peroxydation lipidique se produit rapidement. Après 5min la quantité de MDA est de $1 \pm 0,05 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines membranaires. Cette quantité augmente jusqu'à atteindre $3,44 \pm 0,11 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines membranaires après 30min d'incubation.

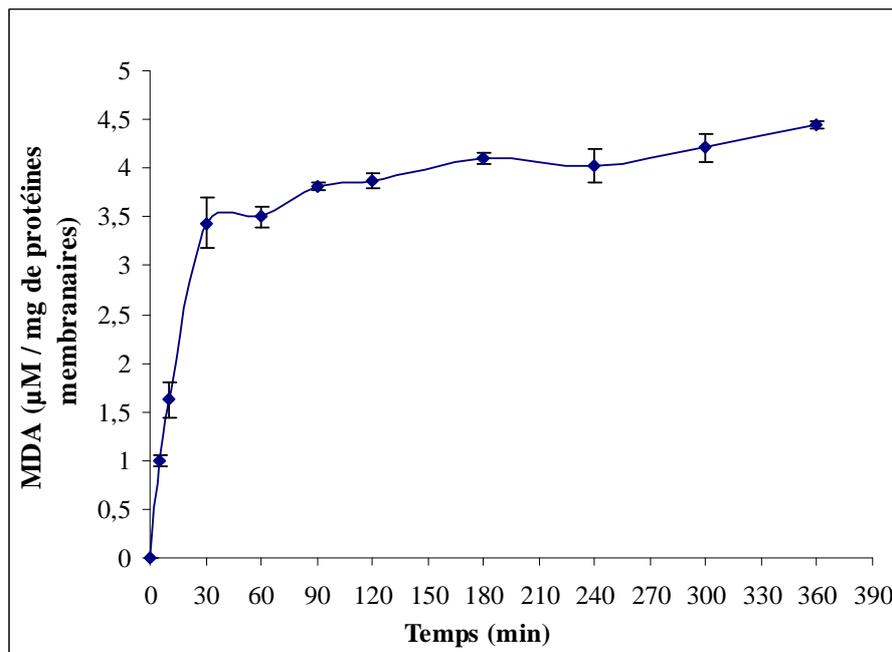


Figure 58 : La quantité du MDA formée en fonction du temps sous l'effet du système pro-oxydant H₂O₂ (900mM) /FeSO₄ (1mM) sur les membranes érythrocytaires (1mg/ml).

Après 6 h d'incubation, le taux du MDA atteint $4,44 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines membranaires. En fait une quantité importante du MDA formée est apparue rapidement au bout des premières 30 minutes d'incubation.

Le temps d'incubation choisi pour ce test est de 4 heures. Cependant on constate d'après la figure 58, que la quantité de MDA formé au cours de ce temps est égal à $4,20 \pm$

0,01 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines membranaires, il n y a donc pas de différence significative avec celle obtenue après 6h d'incubation.

- **L'inhibition de la peroxydation lipidique.**

L'effet des différentes substances à tester sur la peroxydation lipidique est déterminé après incubation des protéines membranaires érythrocytaires (1mg/ml) dans les conditions de stress oxydant déjà définies (H_2O_2 (900mM) / FeSO_4 (1mM), incubation pendant 4h).

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 59 qui donne le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique en fonction de la concentration.

On constate qu'il y'a une relation de proportionnalité entre le pourcentage de l'inhibition de la peroxydation lipidique et la concentration des CP testés.

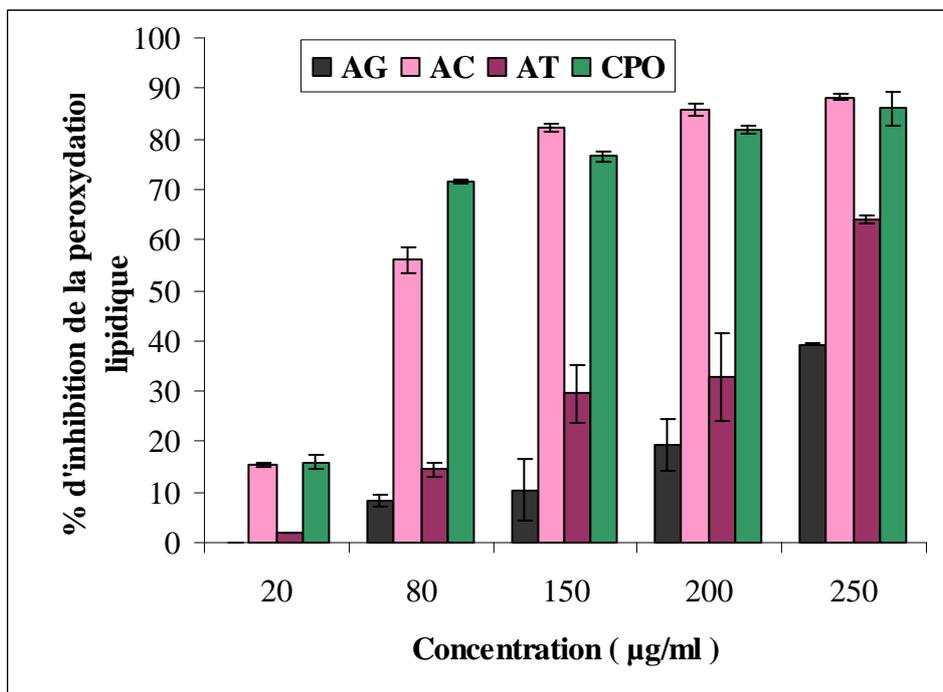


Figure 59 : Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1mg/ml) par les différents composés phénoliques testés (AG, AC, AT et CPO).

L'extrait phénolique total présente l'activité la plus importante concernant la protection des lipides membranaires des globules rouges contre la peroxydation lipidique avec une IC_{50} de $49,27 \pm 1,91 \mu\text{g}/\text{ml}$, suivie par l'AC (IC_{50} de $69,22 \pm 4,0 \mu\text{g}/\text{ml}$) puis par l'AT ($217,64 \pm 15,68 \mu\text{g}/\text{ml}$). L'AG présente, dans ce cas, l'effet protecteur le moins élevé avec une IC_{50} supérieure à $250 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Plusieurs travaux ont rapporté le rôle des PP de l'olive dans la prévention de la peroxydation lipidique. Les secoiridoïdes (oleuropéine et ses dérivés) représentent une des classes principales de CP responsables de l'activité antioxydante des olives et de l'huile d'olive (MONTEDORO et al., 1992 ; SAIJA et al., 1998 ; FRANCONI et al., 2006).

Comme il a été déjà indiqué, l'oleuropeine et l'hydroxytyrosol sont caractérisés par une partie catéchol qui est nécessaire à leur activité antioxydante et activité de piégeage (BIANCO et RAMUNNO, 2006). L'activité antioxydante et la protection des membranes érythrocytaires contre la peroxydation lipidique peuvent être attribuées en grande partie aux o-diphénols.

FRANCONI *et al.* (2006) ont testé l'activité antioxydante de deux huiles d'olive vierges (*Seggianese* et *Taggiasca*) sur les LDL humaines et ont montré que la réduction de la génération du MDA et de diènes conjugués sont dépendentes du contenu en phénols totaux, ce qui concorde parfaitement avec nos résultats.

PAIVA-MARTINS *et al.* (2003) ont rapporté l'activité anti-oxydante des CP de l'huile d'olive comparée avec celle du Trolox dans les liposomes phospholipides de soja, individuellement et en combinaison avec l' α -tocophérol et l'acide ascorbique (PAIVA-MARTINS *et al.*, 2003). Les résultats ont montré que les PP testés (oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol) étaient plus efficaces que l' α -tocophérol et le Trolox.

Les effets antioxydants de l'oleuropeine et de l'hydroxytyrosol contre l'attaque par les radicaux oxygénés à partir de la phase aqueuse ont été montrés par SAIJA *et al.* (1998) dans les biomembranes qui consistent en l'acide linoléique dispersé dans le dipalmitoylphosphatidylcholine.

D'autres résultats ont prouvé l'activité de la fraction phénolique de l'olive *in vivo* en protégeant les particules des LDL de l'oxydation (VISIOLI et GALLI, 1994 ; VISIOLI et GALLI, 1995) et inhibe la production des isoprostanes et autres marqueurs de la peroxydation lipidique produits pendant l'oxydation des LDL (SALAMI *et al.*, 1995 ; VISIOLI et CAROSO *et al.*, 2000).

Tous ces résultats décrits par la littérature concordent avec ceux retrouvés et indiquent que les CPO présentent des effets protecteurs contre la peroxydation lipidique.

Le site de production des RL ainsi que la localisation et l'orientation des antioxydants dans la bicouche phospholipidique, sont des facteurs devant être pris en considération pour la compréhension de l'efficacité d'un antioxydant au niveau membranaire (TERAO *et al.*, 1994 ; SAIJA *et al.*, 1995 ; PAIVA-MARTINS *et al.*, 2003).

Selon PAIVA-MARTINS *et al.* (2003), l'attaque oxydante à partir de la phase aqueuse semble être une réaction importante pour le déclenchement de la peroxydation lipidique dans les membranes.

En fait le degré d'incorporation et la distribution uniforme dans la bicouche lipidique des PP ainsi que le taux de leur transport dans les cellules sont des facteurs influençant l'efficacité des composés antioxydants (THOMAS *et al.*, 1992).

Le piégeage des radicaux peroxydes aqueux à la surface de la membrane, ainsi que le piégeage de radicaux peroxydes lipidiques à l'intérieur de la membrane, jouent un rôle considérable dans la protection contre l'oxydation des lipides (SAIJA *et al.*, 1998).

Les CP sont considérés comme les antioxydants briseurs de chaîne, leur effet protecteur contre les dommages lipoperoxydatifs dépend de leur capacité à céder un atome d'hydrogène d'un groupe hydroxyle (KAHL, 1991).

Selon SAIJA *et al.* (1995), les effets antioxydants des PP de l'olive dépendent de leurs interactions avec la membrane. L'oleuropeine contient une partie glucidique qui empêche l'accès de la molécule à la membrane lipidique (RATTY et DAS, 1988 ; SAIJA *et al.*, 1998). Cependant, SAIJA *et al.* (1998) ont rapporté que l'hydroxytyrosol peut neutraliser les radicaux peroxydes aqueux à côté de la surface membranaire alors que l'oleuropeine agit à l'intérieur de la membrane.

Néanmoins, les études par fluorescence réalisées par PAIVA-MARTINS *et al.* (2003) ont montré que certains PP de l'huile d'olive dont l'oleuropeine et l'hydroxytyrosol n'ont pas pénétré dans la bicouche phospholipidique du liposome. Cela pourrait être expliqué par leurs propriétés hydrophiles. Le positionnement des CP à la surface de la bicouche phospholipidique permettrait un retardement efficace de la peroxydation lipidique lancée par les RL de la phase aqueuse.

L'activité anti-oxydante des CPO peut être attribuée également aux flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes de l'olive tels que la lutéoline et son aglycone protègent significativement les particules de LDL contre l'oxydation de manière dépendante de la dose (VISIOLI et GALLI, 1995 ; VISIOLI *et al.*, 1995).

Les CP testés dont les CPO peuvent agir en tant qu'antioxydants briseurs de chaîne, et réagissent avec des radicaux lipidiques pour former des radicaux non réactifs, interrompant ainsi la chaîne de propagation. En fait, ces composés peuvent donner un électron ou un atome d'hydrogène au radical lipidique formé pendant la phase de propagation de l'oxydation des lipides et stabiliser le radical phénoxy résultant par délocalisation de l'électron désapparié (SHAHIDI et WANASUNDRA, 1992 ; PRIOR *et al.*, 2005 ; ROGINSKY et LISSI, 2005).

D'autres résultats suggèrent que les CP de l'huile d'olive peuvent servir de piègeurs de radicaux peroxydes aqueux à la surface de la membrane et régénérer l' α -tocophérol qui agit en deuxième ligne de défense contre les radicaux peroxydes aqueux et comme piègeur de radicaux peroxydes responsables de la peroxydation lipidique en chaîne dans les membranes (PAIVA-MARTINS *et al.*, 2003).

Les CP exercent leurs capacités anti-oxydantes dans l'huile d'olive par le piégeage des radicaux peroxydes et alkoxydes, et par chélation des métaux de transition (VISIOLI , BELLOMO *et al.*, 1998 ; ROGINSKY et LISSI, 2005).

On peut suggérer donc que dans le système pro-oxydant utilisé, les CP entre autres les CPO préviennent l'oxydation des lipides membranaires en piégeant H_2O_2 , en chélatant le fer, empêchant de cette manière la production du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

On peut suggérer également que les CPO peuvent agir comme antioxydants primaires en inhibant l'étape d'initiation et de propagation de la peroxydation lipidique (piégeage de radicaux alkyles $L\cdot$ et peroxydes $LOO\cdot$) et/ou en tant qu'antioxydants secondaires en retardant ou en diminuant le taux d'oxydation via la chélation des ions métalliques de transition (AMES *et al.*, 1993).

Les résultats obtenus indiquent que la vit C, contrairement aux CP, montre un pouvoir pro-oxydant et accroît la peroxydation lipidique.

En présence d'une concentration de 20 µg/ml de vit C, la quantité de MDA formée a diminué ; en effet elle passe de 5,69 (pour le contrôle) à 5,20 µM/mg de protéines membranaires. Mais à des concentrations de 80, 150, 200 et 250 µg/ml le taux en MDA formé augmente (figure 60).

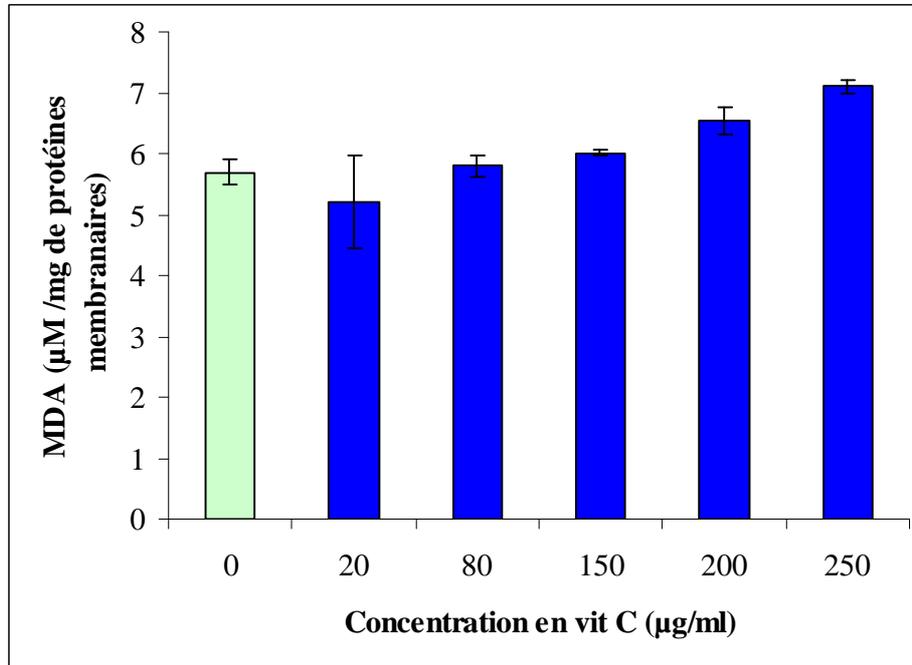


Figure 60 : L'effet pro-oxydant de la vit C sur la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1mg/ml) induite par le système H₂O₂/ FeSO₄ (900mM/1mM).

Le rôle pro-oxydant de la vit C a été rapporté par DEUTSCH (1998). Ainsi YEN et *al.* (2002) ont rapporté que la quantité de TBARS mesurée par le test de désoxyribose en présence du fer augmente avec l'augmentation de la concentration en vit C, un maximum est obtenu à une concentration supérieure à 1,65mM et ensuite diminue en augmentant les concentrations.

Selon les mêmes auteurs, l'effet pro-oxydant observé à faibles concentrations est dû au pouvoir réducteur de la vit C qui réduit le Fe³⁺ en Fe²⁺ et stimule ainsi la formation de HO· par la réaction de Fenton. L'effet pro-oxydant peut s'expliquer également par le fait que la vit C est incapable de chélater les ions métalliques de transition.

En outre, des concentrations élevées en RL pourraient être à l'origine de l'effet pro-oxydant de l'acide ascorbique (YEN et *al.*, 2002).

A côté de cet effet pro-oxydant à faibles concentrations, certains auteurs suggèrent que l'ascorbate pourrait avoir aussi un effet pro-oxydant à forte concentration (CHEPDA et *al.*, 1999 ; PARK et LEE, 2008).

Selon CHEPDA et *al.* (1999), l'effet pro-oxydant de la vit C est favorisé par la présence d'ions métalliques de transition tels que le fer. Le fer ferrique généré de la réaction de Fenton en présence de H₂O₂, peut être réduit par la vit C, amplifiant ainsi la réaction de Fenton.

Cependant, BISWAS *et al.* (2005), ont rapporté que la vit C prévient la peroxydation lipidique sur des érythrocytes stressés par le phenylhydrazine *in vitro*. L'acide ascorbique est un piègeur bien connu de radicaux hydrophiles et empêche également la peroxydation des lipides par le balayage de radicaux aqueux de l'oxygène (TERAO *et al.*, 1994)

Il a été rapporté que la vit C protège également les biomembranes contre des dommages peroxidatifs *in vitro* (FREI, 1991).

Donc à partir de ces résultats on peut conclure que ce sont les conditions expérimentales utilisées, notamment la richesse du milieu réactionnel en fer qui a été en faveur de l'apparition de l'effet pro-oxydant de la vit C.

- **Association vitamine C et composés phénoliques totaux de la pulpe d'olive**

Une concentration de 40µg/ml de l'extrait phénolique total est testée en présence de concentrations croissantes en vit C (5 ; 10 ; 20 ; 30 et 40µg/ml). Les résultats obtenus sont donnés par la figure 61.

On constate que la vit C présente un effet antioxydant à faibles concentrations (5 ; 10 ; 20 ; 30 et 40 µg/ml). Une augmentation, même si elle est non significative, de la peroxydation lipidique est produite en passant d'une concentration de 10 à 40µg/ml.

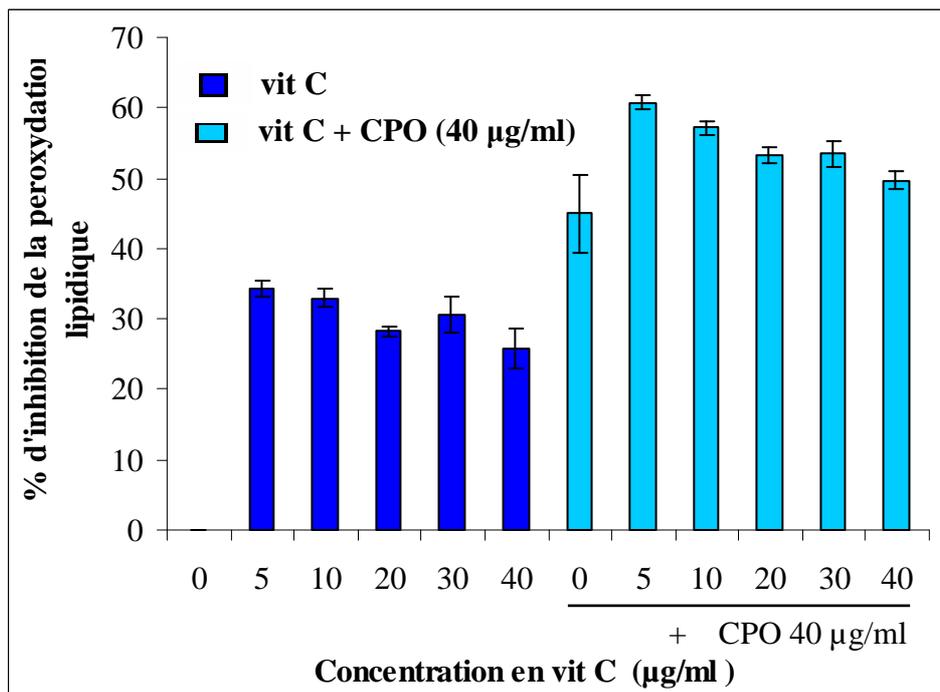


Figure 61 : L'effet de l'association CPO et vit C sur l'inhibition de la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1mg/ml) induite par le système H₂O₂ /FeSO₄ (900mM/1mM).

En présence des CPO, le pourcentage de l'inhibition de la peroxydation lipidique est plus important par rapport à la vit C seule.

La comparaison de l'effet additif avec l'effet retrouvé suite à l'association est donnée par la figure 62. On constate que l'effet de l'inhibition de la peroxydation lipidique dans le

cas de l'association est moins important que dans le cas d'un effet additif, cela peut être expliqué par l'effet pro-oxydant de la vit C.

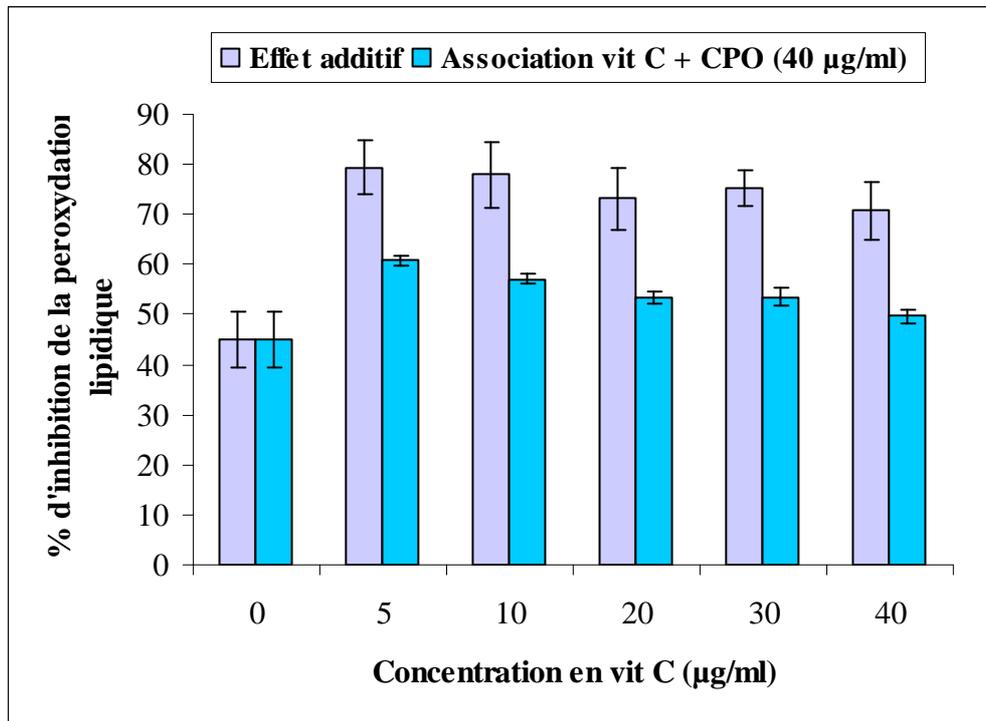


Figure 62 : Comparaison entre l'effet additif et l'effet de l'association CPO et vit C sur l'inhibition de la peroxydation lipidique des membranes érythrocytaires (1mg/ml).

Concernant les résultats obtenus relatifs à l'association vit C et CPO pour l'ensemble des tests utilisés, c'est l'effet additif qui est trouvé dans la plupart des cas (test phosphomolybdénique, DPPH, H₂O₂ et test de l'hémolyse). Le même résultat est obtenu par PAIVA-MARTINS et *al.* (2003), qui ont rapporté que les combinaisons d'acide ascorbique et de CP de l'huile d'olive ont eu des effets additifs.

Les interactions des CP des olives avec d'autres antioxydants sont importantes pour les effets bénéfiques de ces composés pour réduire le stress oxydant *in vivo*.

Cependant, tous les phénols d'huile d'olive ont montré des effets synergiques avec l' α -tocophérol. Les PP ont fortement retardé l'oxydation de l' α -tocophérol avec une phase de latence plus importante (PAIVA-MARTINS et *al.*, 2003).

Il a été rapporté que la vit C montre un effet synergique avec α -tocophérol en le régénérant (HARATS et *al.*, 1998).

PAIVA-MARTINS et *al.* (2003), ont montré que la combinaison de l'acide ascorbique, phénols d'huile d'olive et α -tocophérol est plus efficace pour la stabilisation des liposomes contre l'oxydation.

2.2.5.3 Evaluation de l'oxydation des protéines membranaires érythrocytaires

- **Analyse électrophorétique des protéines des membranes érythrocytaires**

Les protéines des membranes des globules rouges sont séparées par électrophorèse PAGE-SDS, la PAGE-native ne permet pas leur séparation. Le résultat de la séparation en PAGE-native est donné par la figure 63, on constate l'apparition d'une seule bande protéique diffuse.

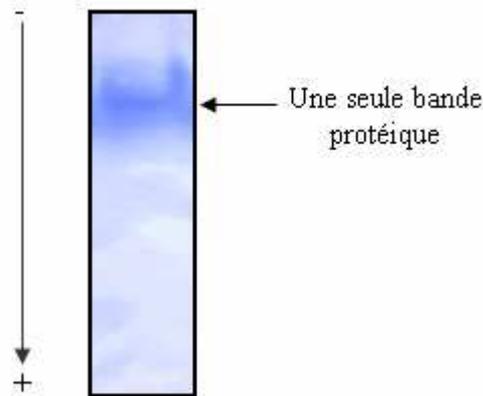


Figure 63 : Electrophorégramme de protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-native (T = 12% ; C = 2,7%) .

Les protéines membranaires sont séparées par PAGE-SDS. Le PM des différentes protéines est déterminé à partir de la courbe de calibration donnant le Log PM en fonction de la distance (figure 64).

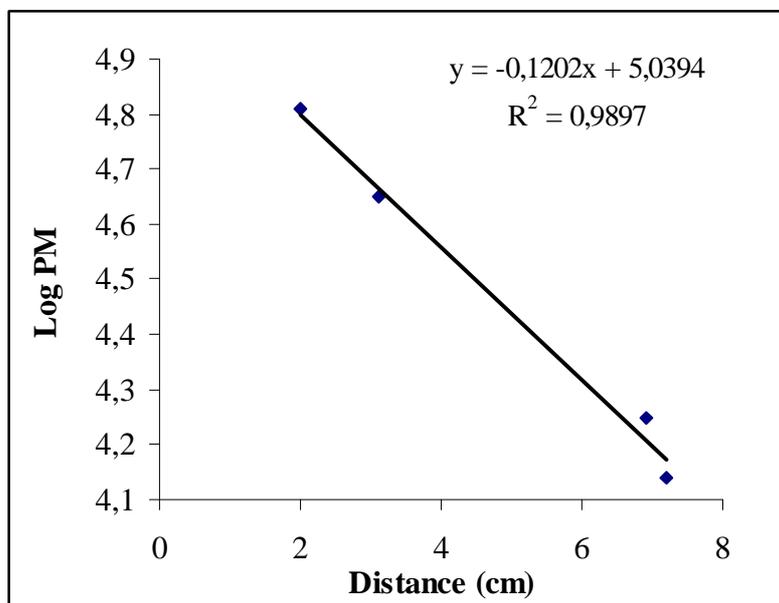


Figure 64 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE SDS.

Les étalons utilisés : BSA (66000 Da), ovalbumine (45000 Da), β -lactoglobuline (18000 Da) et α -lactalbumine (14000 Da).

Le profil obtenu concernant la séparation des protéines membranaires érythrocytaires par PAGE-SDS est donné par la figure 65

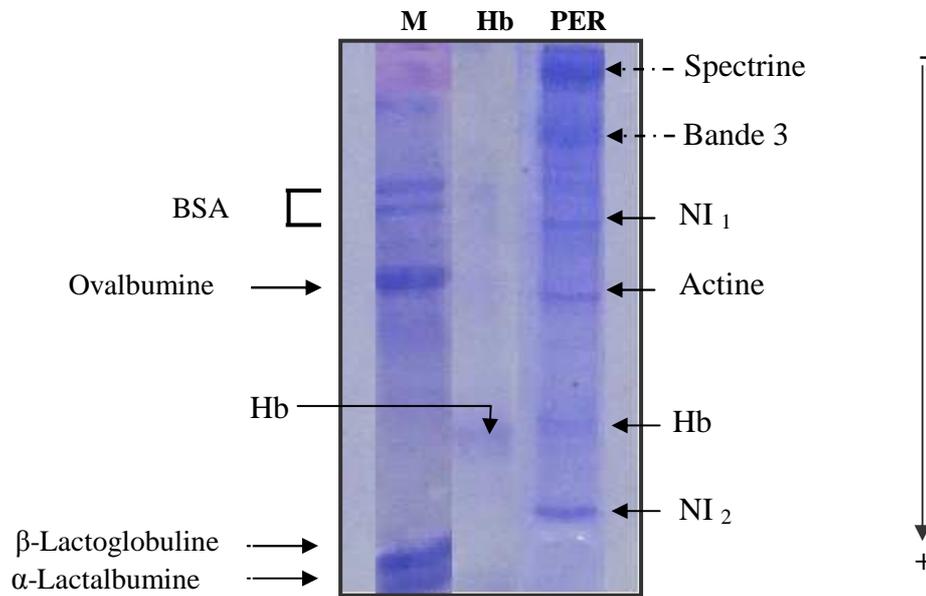


Figure 65 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS.

Gel de séparation (T=12% ; C=2,7%) et gel de concentration (T=4,8% ; C=2,7%). M: protéines marqueurs; Hb: hémoglobine; PER: protéines des membranes érythrocytaires ; NI₁, NI₂: protéines non identifiées 1 et 2 respectivement.

Le profil des protéines de la membrane du globule rouge obtenu est comparable à celui décrit par la littérature (TANNER et BOXER, 1972 ; GARBARZ et *al.*, 1984).

La séparation des protéines membranaires érythrocytaires montre trois bandes majeures. Si on les présente par ordre décroissant de leurs PM, la bande de plus haut PM peut correspondre à la spectrine, la deuxième bande importante, peut être la protéine bande 3, de part leur emplacement dans le gel et leur intensité.

Le poids exact de ces premières bandes n'a pas été déterminé de part le manque en protéines marqueurs de haut PM. La protéine de plus haut PM qui est utilisée, est la BSA avec un PM de 66 kDa, inférieur à celui de la spectrine (240-220 kDa) et à celui de la bande 3 (95kDa).

La troisième bande n'est pas identifiée (NI₁), d'un PM de l'ordre de 53641,38 Da. Par contre la quatrième bande correspond à l'actine avec un PM de 41813,83 Da (42 kDa).

Une bande d'hémoglobine est détectée, c'est l'hémoglobine résiduelle dans les membranes après leur extraction.

La dernière bande (NI₂) n'a pas été identifiée, elle a un PM de 19148,73 Da.

- **L'oxydation des protéines membranaires par H₂O₂ et H₂O₂/FeSO₄**

L'effet du peroxyde d'hydrogène et du système H₂O₂ /FeSO₄ générateur de radicaux hydroxyles sont étudiés. Les échantillons préparés sont par la suite séparés par PAGE-SDS.

Les résultats obtenus concernant l'oxydation au moyen du peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations sont donnés par la figure 66.

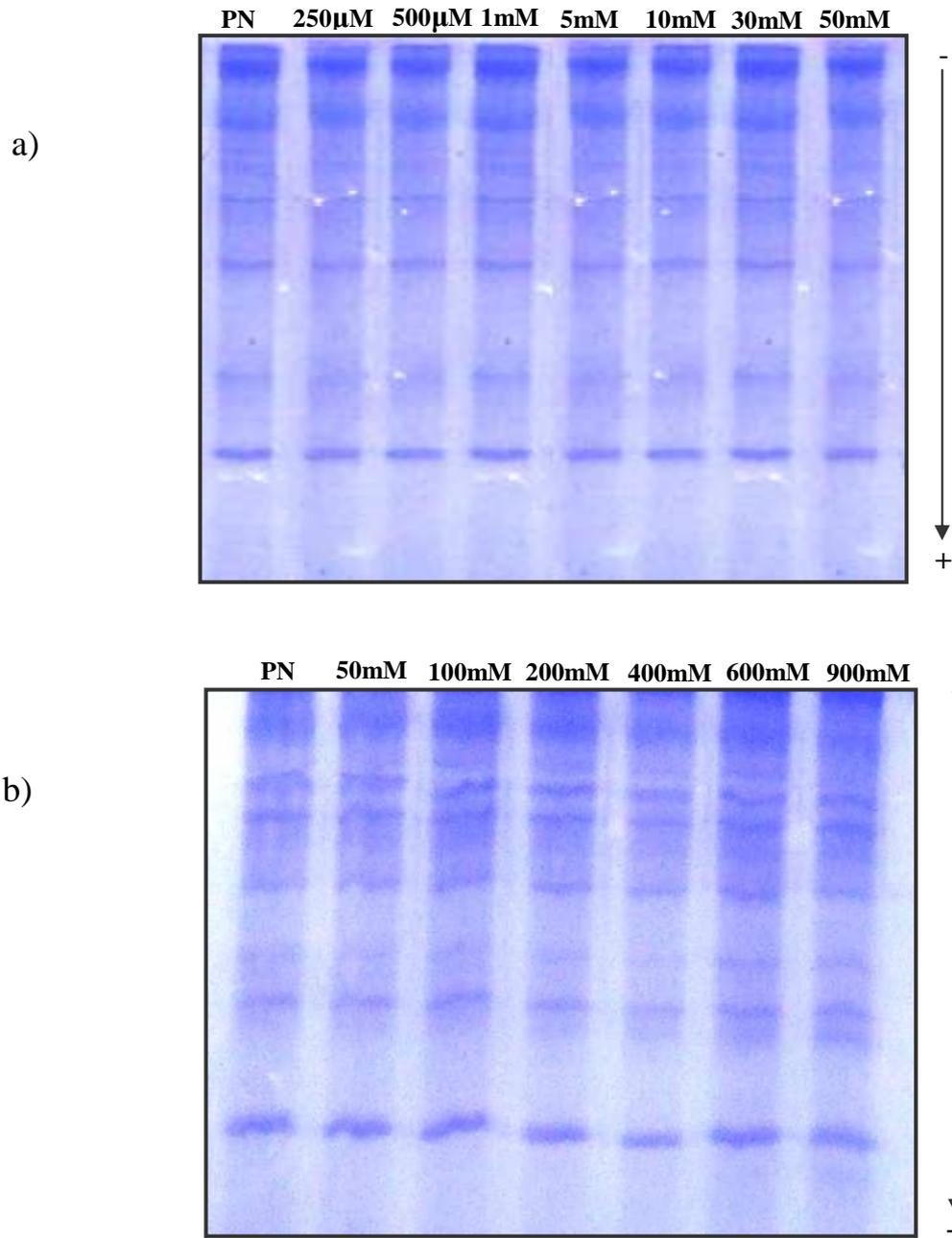


Figure 66 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par H₂O₂.

Après 3h (a) et 24 heures (b) d'incubation à différentes concentrations en H₂O₂ ; PN: protéines non oxydées.

On constate à partir de la figure 66a, que comparativement au profil des protéines érythrocytaires normales non stressées par H₂O₂, les protéines incubées en présence des différentes concentrations en H₂O₂ (0 ; 250µM ; 500µM ; 1mM ; 5mM ; 10mM ; 30mM ; 50mM), pendant 3 h, ont donné le même profil.

D'autres concentrations plus fortes en H₂O₂ (50 ; 100 ; 200 ; 400 ; 600 et 900 mM) ont été testées, tout en augmentant également le temps d'incubation qui passe de 3h à 24h. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 66b.

Les profils obtenus montrent que l'oxydation des protéines n'est toujours pas visualisable sur le gel.

Ce résultat n'exclut pas le fait que les protéines sont oxydées par le peroxyde d'hydrogène, mais les oxydations causées ne sont pas fortes au point d'être visualisées sur le gel électrophorétique.

Dans ce sens, SHIVA SHANKAR REDDY *et al.* (2007), a montré que l'incubation de H₂O₂ à différentes concentrations (0 ; 5 ; 2 et 8mM) en présence de membranes érythrocytaires a conduit à la génération du MDA et des carbonyles protéiques. Plus la concentration en H₂O₂ augmente plus le taux en ces produits d'oxydation augmente.

La même étude a également montré que le taux en groupements sulfhydryles diminue avec l'augmentation de la concentration en H₂O₂.

Les résultats du stress oxydant par H₂O₂ /FeSO₄ sur les protéines de la membrane érythrocytaire par le système générateur de radicaux hydroxyyles sont donnés par la figure 67.

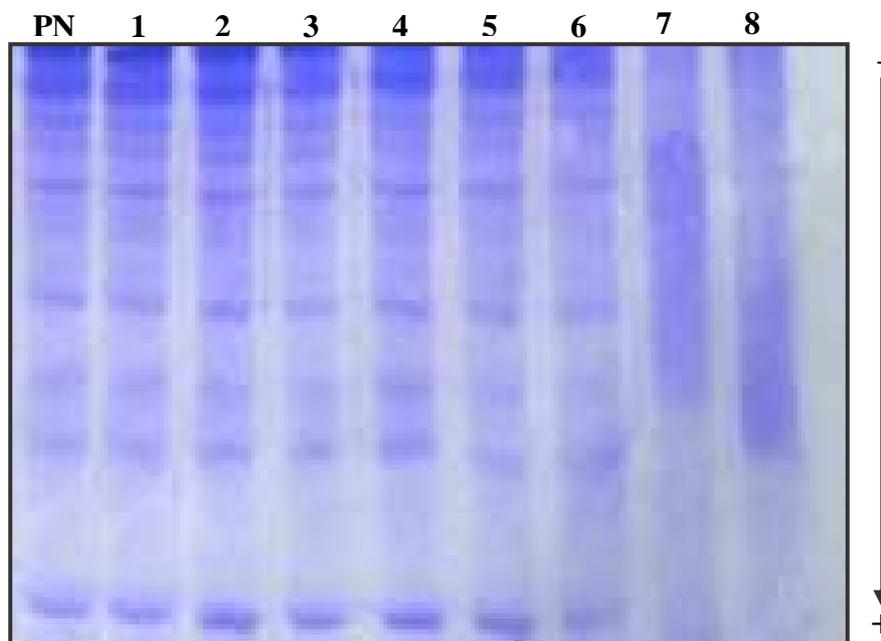


Figure 67 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système H₂O₂ /FeSO₄ à différentes concentrations respectivement : 1 : 250µM/25µM; 2: 500µM/30 µM; 3 : 1mM/50 µM; 4: 5mM/250 µM; 5: 5mM/1mM ; 6: 10mM/10mM; 7: 50mM/30mM; 8: 50mM/50mM ; PN: protéines non oxydées

On constate dans ce cas que pour les cinq premières combinaisons de H₂O₂ /FeSO₄ testées, le profil protéique obtenu est comparable à celui des protéines normales.

La combinaison H₂O₂ (10mM) /FeSO₄ (10mM) (système 6) a conduit à la diminution de l'intensité de la plupart des bandes protéiques, ce qui indiquerait qu'il y'aurait eu oxydation.

Sur les deux profils donnés par les deux dernières combinaisons testées en fer et en peroxyde d'hydrogène (systèmes 7 et 8), on constate que toutes les bandes protéiques ont disparu. Cela pourrait s'expliquer par leur dégradation oxydative en fragments peptidiques de faibles PM non détectés sur le gel.

L'utilisation du fer et du peroxyde d'hydrogène comme substrats oxydants a conduit à la génération de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton. Plusieurs auteurs ont souligné la capacité de ce radical à causer des dommages oxydatifs aux molécules biologiques dont les protéines (JOZWIK *et al.*, 1997, BISWAS *et al.*, 2005).

SIGNORINI *et al.* (1995), ont rapporté que la libération du fer dans les érythrocytes est accompagnée par des altérations oxydatives des protéines membranaires qui ont été détectées par PAGE-SDS et par la spectroscopie infrarouge.

Les résultats obtenus concernant la dégradation des protéines membranaires sous l'effet du stress oxydant concorde avec plusieurs travaux cités par la littérature.

Il a été rapporté qu'une attaque oxydative par le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton pourrait conduire à une réticulation ou à une dégradation des protéines de la membrane érythrocytaire (BERLETT et STADTMAN, 1997). Ces auteurs parlent d'un mécanisme nommé la fragmentation oxydative des protéines, qui semble jouer le rôle majeur.

Le peroxyde d'hydrogène peut également être responsable des dommages oxydants touchant les protéines. Selon SHIVA SHANKAR REDDY *et al.* (2007), l'exposition des membranes érythrocytaires à H₂O₂ conduit à une grande oxydation de groupes sulfhydryles (SH) en ponts disulfures. Selon les mêmes auteurs la réduction du nombre des groupements SH dans les membranes était concomitante avec la réduction de l'intensité de la bande 3 sur le profil protéique obtenu. La génération des carbonyles protéiques a été également notée.

AJILA et PRASADA RAO (2008), ont rapporté que suite au traitement avec H₂O₂, l'intensité de la plupart des bandes protéiques de la membrane érythrocytaire séparées par PAGE-SDS dont le PM est supérieur à celui de l'actine (ou bande 5) est diminuée. Ceci est expliqué par leur dégradation qui a conduit en effet à l'apparition de nouvelles bandes dans la région de faible PM.

Il est probable que le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton pourrait être responsable de l'attaque oxydative des chaînes polypeptidiques et de leur fragmentation subséquente (BERLETT et STADTMAN, 1997).

Il est connu que l'oxydation des protéines mène à la modification des aminoacides et le clivage de chaînes polypeptidiques ce qui conduit à sa fragmentation et donc à sa dégradation (SICINSKA *et al.*, 2006).

CICCOLI *et al.* (2008) ont rapporté que la dégradation oxydative des protéines est un indice de vieillissement de l'érythrocyte. Selon ces auteurs, l'électrophorèse a montré, l'apparition de nouvelles bandes, dans la gamme de 66 –45 kDa, qui n'ont pas été obtenues

après incubation dans des conditions anaérobies. Ces nouvelles bandes pourraient prévenir de la dégradation oxydative de la bande 3 (KAY et *al.*, 1983 ; KAY, 1984).

Selon BERLETT et STADTMAN (1997), les protéines peuvent également être oxydées par les produits de peroxydation lipidique et conduire à l'oxydation des résidus d'acides aminés de chaînes latérales et à des coupures de liaisons peptidiques ce qui pourrait expliquer en partie la fragmentation des protéines.

Cependant d'autres auteurs notent qu'après exposition des protéines membranaires du globule rouge aux agents oxydants, il y'a une polymérisation des protéines.

SINGH et RAJINI (2008), ont constaté que l'exposition des membranes érythrocytaires au système pro-oxydant fer-ascorbate a conduit à l'apparition, en plus des bandes de faible PM, d'autres bandes correspondant à des agrégats de haut PM. MORZEL et *al.*, (2006) ont indiqué également que le radical hydroxyle peut induire la polymérisation.

Dans cette étude, les protéines de haut PM ne sont pas obtenues, ceci pourrait être expliqué par la formation de ces agrégats protéiques et leur dégradation suite à la formation importante de groupement carbonyles protéiques sous l'effet du peroxyde d'hydrogène et des groupements hydroxyles formés par la réactions de Fenton, en plus des radicaux issus de la peroxydation lipidique.

En outre, selon MORZEL et *al.* (2006), l'électrophorèse dans les conditions dénaturantes réduisent les ponts disulfures et les agrégats formés par ce mécanisme ne peuvent pas être visualisés.

- **La cinétique de l'oxydation des protéines membranaires**

Le système H₂O₂ (50mM) /FeSO₄ (30mM) ayant induit la dégradation des protéines membranaires érythrocytaires a été choisi comme système pro-oxydant. La cinétique de la dégradation a été déterminée en fonction du temps. Les résultats sont donnés par la figure 68.

Après 1 min d'incubation, on constate que la majorité des bandes restent intactes avec l'apparition de nouvelles bandes (figure 68a).

La bande correspondant à la spectrine diminue d'intensité. Parallèlement à cela, on note également l'apparition d'une bande (bande I) de PM inférieur à l'actine (39562,16 Da). En outre, on constate l'apparition d'une bande (II) de faible PM (18030,17-15452,54 Da) et une autre (III) de plus faible PM (12971,79 Da).

Après 2 min, on constate que toutes les bandes ont disparu et après 3, 4, 5, et 30 min, on constate l'apparition d'une bande d'un PM de 14859,35 Da (IV).

Après 1h30, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h aucune bande n'apparaît. Toutes les bandes protéiques ont disparu (figure 68b).

Les nouvelles bandes de faible ou moyen PM peuvent être le résultat de la dégradation des protéines de la membrane érythrocytaire sous l'effet du stress oxydant. Les bandes protéiques de moyen PM pourraient également être obtenues par la polymérisation de protéines de faible PM pouvant être issues de l'oxydation.

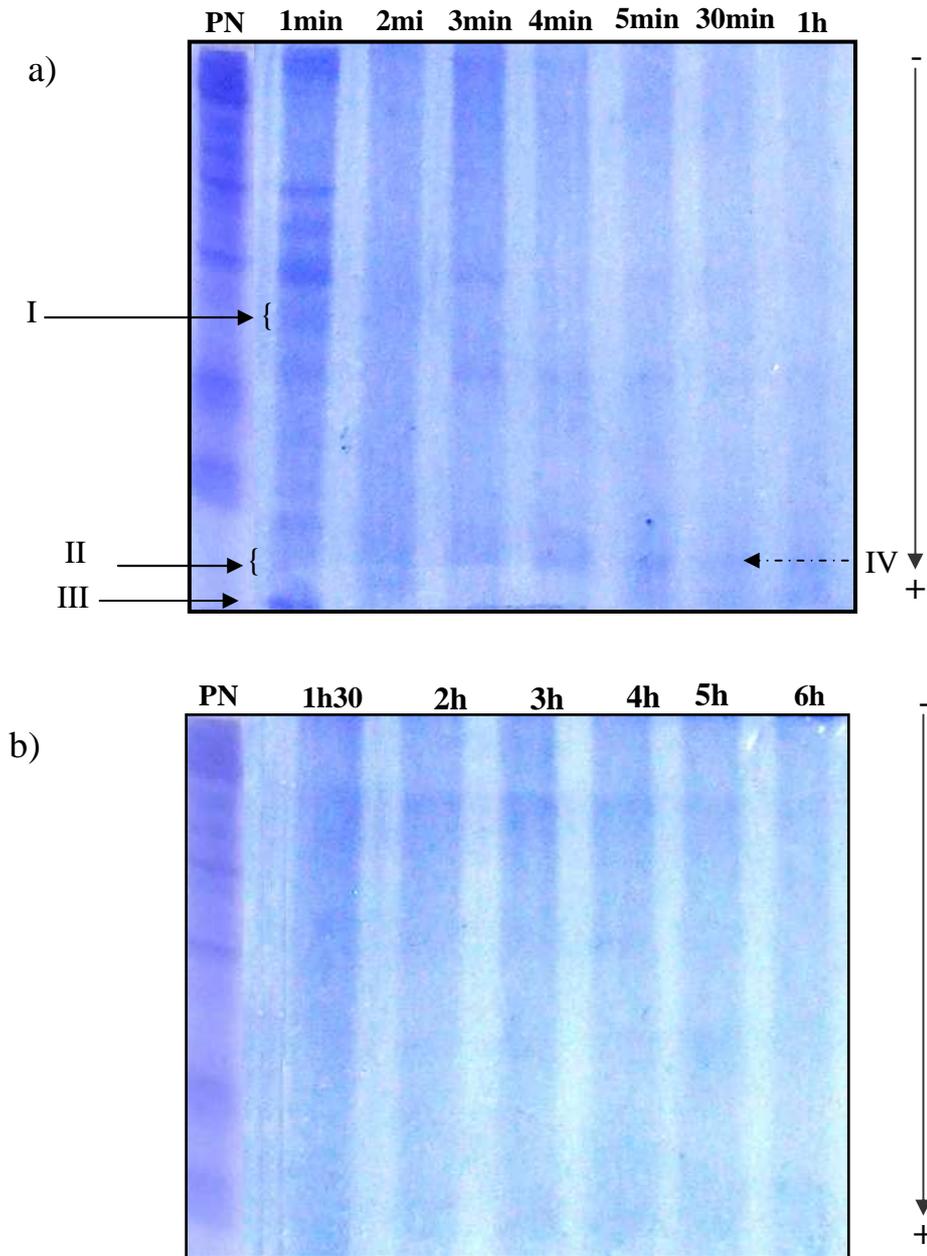


Figure 68 : Electrophorègramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système $H_2O_2/FeSO_4$ (50mM/30mM) après différents temps d'incubation. PN: Protéine non oxydées.

Après 1h30 d'incubation aucune bande protéique n'apparaît sur le l'électrophorégramme, cela pourrait s'expliquer par la dégradation totale des protéines, probablement en fragments polypeptidiques non détectables de part leur petite taille.

A partir de ces résultats, on constate qu'au bout d'une heure et 30 min, toutes les protéines sont dégradées. Le choix du temps d'incubation à prendre pour les tests restants est de 3h, de manière à s'assurer de la dégradation totale des protéines.

- **Effet des substances antioxydantes sur les dommages oxydatifs des protéines**

L'effet des différentes substances à tester sur la protection des protéines des membranes érythrocytaires contre le stress oxydant induit par le système H₂O₂ (50mM) /FeSO₄ (30mM) a été étudié.

Les résultats obtenus par les CPO sont donnés par la figure 69.

Sur la figure (69a), à une concentration de 1 mg/ml toutes les bandes restent intactes, alors qu'à une concentration de 2 mg/ml, il y'a disparition de certaines bandes comme l'actine, et l'apparition d'une bande (I) de PM moyen (49545,01- 44055,48 Da) et une autre (II) de faible PM (12105, 98 Da).

Aux concentrations de 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 12 mg/ml ; il y'a intensification de la bande (I) et (II) et apparition nette d'une autre bande (III) dont le PM va de 32885,16 à 28183,82 Da. Aux concentrations de 14 mg/ml, 16 mg/ml, 18 mg/ml, 20 mg/ml, aucune bande n'apparaît.

L'effet protecteur des CPO contre l'oxydation des protéines membranaires est donc observé notamment à une concentration de 1 mg/ml. Toutes les bandes ont été protégées de l'oxydation.

Cette protection conférée par les CPO pourrait être expliquée par la capacité de ces molécules à piéger le peroxyde d'hydrogène, capacité déjà prouvée par le test de piégeage de H₂O₂, de leur capacité très probable à piéger le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton ainsi que les RL qui auraient été obtenus de la peroxydation lipidique. En outre, cet effet protecteur pourrait être du à la diminution indirecte de la production du radical hydroxyle, via la chélation du fer.

Des travaux sur la protection des protéines de la membrane érythrocytaire contre l'hémolyse ont été réalisés. Ainsi SINGH et RAJINI (2008), ont examiné la protection des protéines du cytosquelette de la membrane des globules rouges contre le stress oxydant induit par le système fer-ascorbate. Ils ont constaté que la plupart des bandes sont visibles après traitement avec les PP de la pomme de terre riche en acide phénolique (AG et AC), alors qu'en absence des PP, la spectrine et la bande 3 étaient pratiquement invisibles sur le gel électrophorétique.

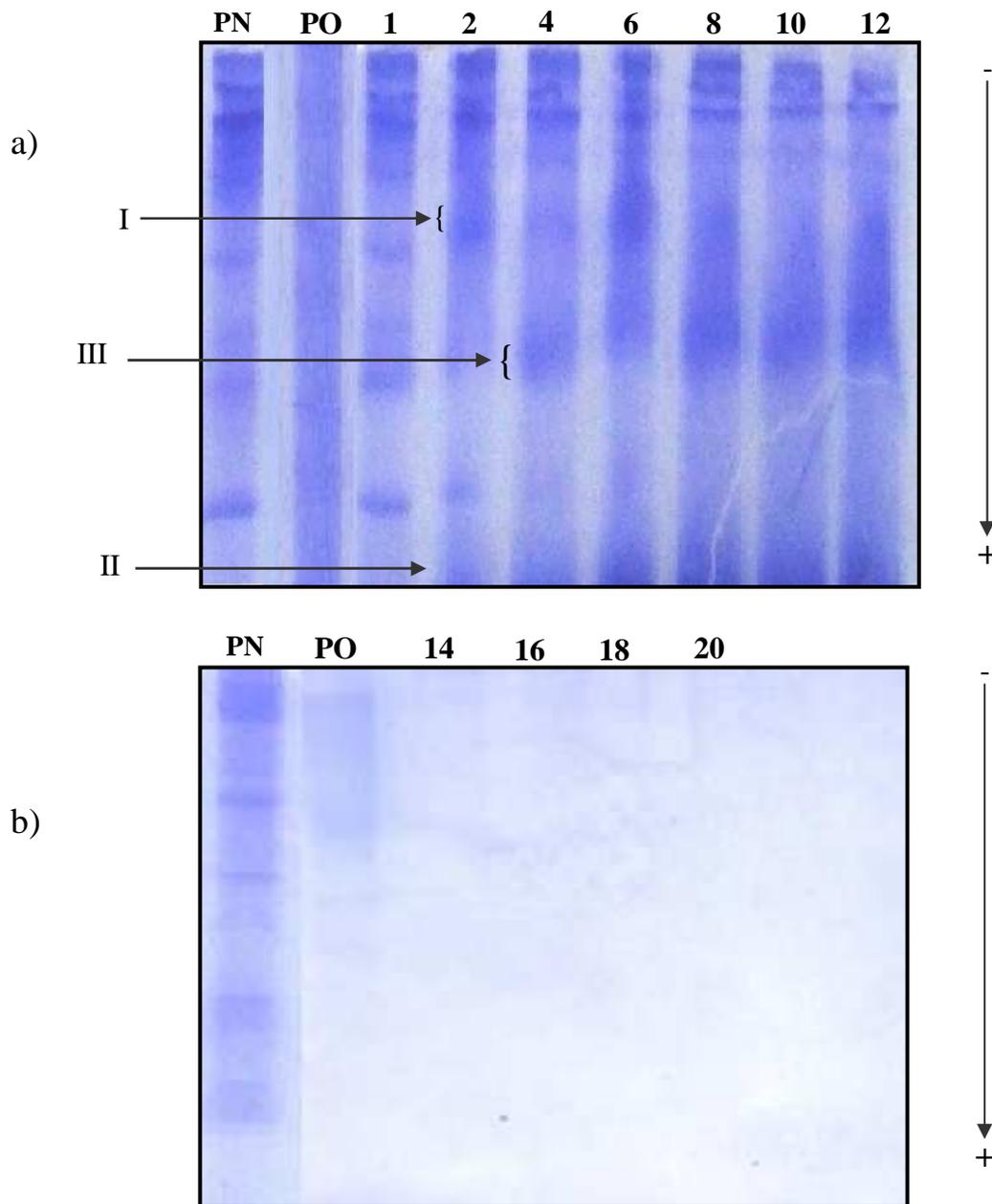


Figure 69 : Electrophorégramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système $H_2O_2/FeSO_4$ (50mM/30mM) incubées avec différentes concentrations de l'extrait phénolique de l'olive a) : 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12mg/ml ; b) : 14, 16, 18, 20 mg/ml ; PN: protéines non oxydées; PO :protéines oxydées.

Par ailleurs, AJILA et PRASADA RAO, (2008), ont montré l'effet protecteur de l'extrait de la peau de mangue riche en PP contre le stress oxydant induit par H₂O₂ sur les protéines membranaires. Cet extrait a efficacement protégé les protéines contre la dégradation oxydative. HALDER et BHADURI (1998), de leur côté ont rapporté également que l'extrait du thé vert et du thé noir riches en catéchine pourraient efficacement prévenir la dégradation des protéines dans des conditions de stress oxydant.

Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus concernant le rôle protecteur des PP, et dans notre cas des CPO contre l'oxydation des protéines de la membrane du globule rouge.

L'apparition de nouvelles bandes protéiques (I, II et III) pourrait être expliquée par l'apparition d'un effet pro-oxydant des PP aux concentrations utilisées.

KECELI et GORDON (2002) ont indiqué qu'en présence de fortes concentrations en fer, les PP de l'huile d'olive peuvent agir comme pro-oxydants en réduisant le fer ferrique obtenu par la réaction de Fenton, ce qui va amplifier la réaction de production de radicaux hydroxyles délétères pour les protéines.

CAO et *al.* (1997) ont également montré le comportement pro-oxydant des flavonoïdes en présence de cuivre. Il a été montré que cet effet pro-oxydant augmente avec l'augmentation de la concentration en ions métalliques et en flavonoïdes. L'effet pro-oxydant pourrait être expliqué par le faible pouvoir chélateur des métaux de ces PP.

On peut conclure que les CPO dans les conditions expérimentales de stress oxydant utilisées, à faibles concentrations ils agissent en tant qu'anti-oxydants alors qu'ils se comportent en tant que pro-oxydants à fortes concentrations. Cela pourrait s'expliquer par la concentration élevée en fer, le substrat de la réaction de Fenton, dans le milieu. Les PP vont en réduisant le fer ferrique, augmenter le taux de production des radicaux hydroxyles. Un autre mécanisme de cet effet pro-oxydant pourrait être leur faible pouvoir chélateur de métaux dans les conditions expérimentales utilisées.

Donc l'apparition des bandes (I, II et III) pourrait s'expliquer par l'oxydation des protéines et leurs fragmentations sous l'effet de stress oxydant induit ou encore par leur polymérisation.

A plus hautes concentrations en CPO (figure 69b) aucune bande n'est apparue. L'effet pro-oxydant dans ces cas est plus prononcé à cause des concentrations élevées en PP testées.

L'effet obtenu en présence de l'AG est donné par la figure 70. Sur la figure 70a, aux concentrations de 1 et 2 mg/ml, on constate que pratiquement toutes les bandes ont disparu à l'exception de la spectrine et de l'actine dont l'intensité est diminuée.

A partir de la concentration 4 jusqu'à 10 mg/ml, il y'a réapparition nette de la spectrine et de l'actine ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande (I) d'un PM de 25061,09Da. On note également l'apparition d'une bande de PM de 18749,94 Da (II). Cependant sur la figure 70b, on ne constate l'apparition d'aucune bande protéique.

A partir de ces résultats on peut conclure que l'AG a protégé certaines protéines de la membrane érythrocytaire entre autre la spectrine et l'actine contre l'oxydation notamment aux concentrations de 6, 8 et 10 µg/ml, probablement par le même mécanisme que celui des CPO.

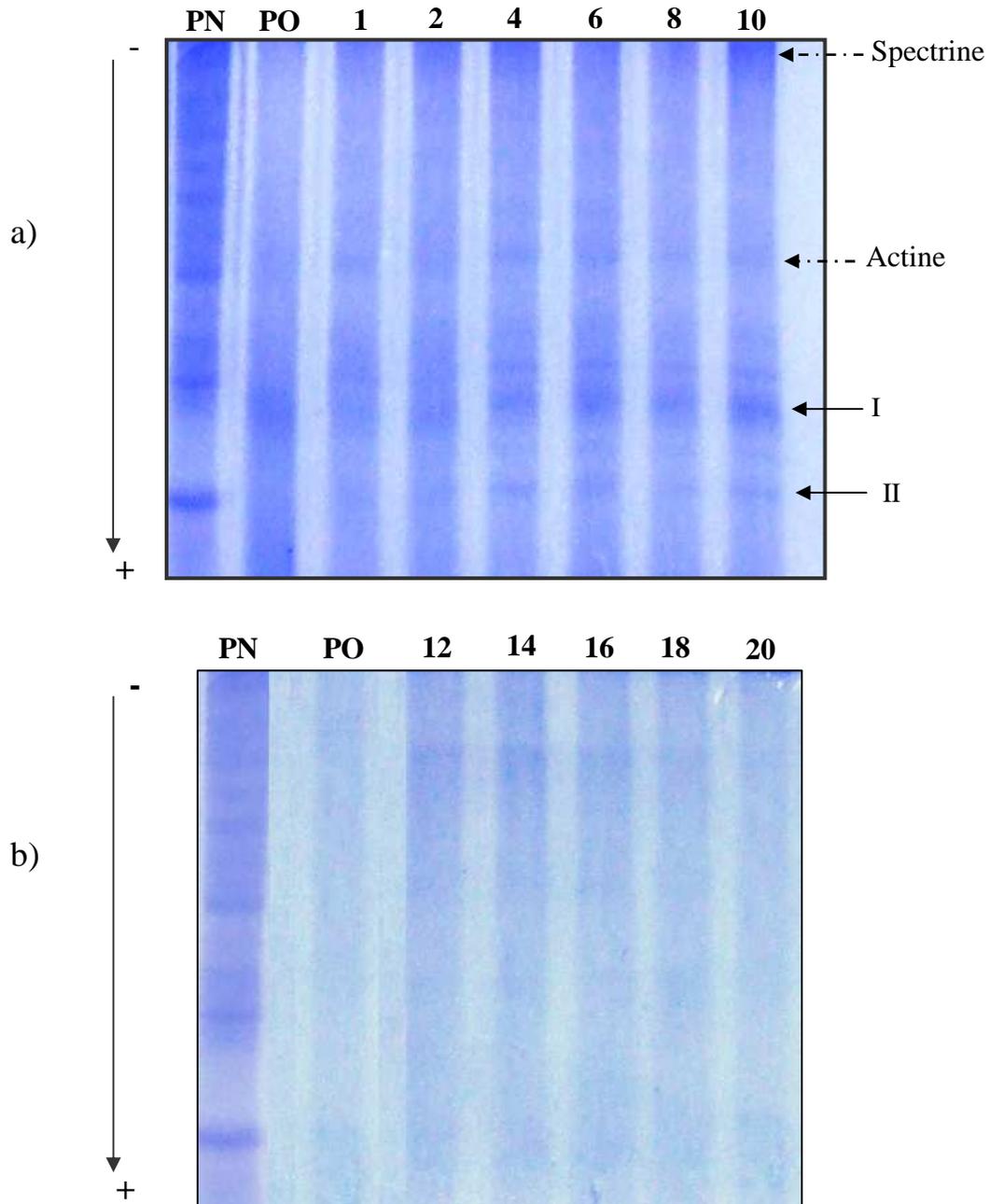


Figure 70 : Electrophorègramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système $H_2O_2/FeSO_4$ (50mM/30mM) incubées à différentes concentrations de l'acide gallique a) : 1, 2, 4, 6, 8, 10mg/ml ; b) 12, 14, 16, 18, 20 mg/ml ; PN: protéines non oxydées ; PO : protéines oxydées.

Un effet pro-oxydant de l'AG a été également retrouvé lorsque cet acide phénolique est testé à fortes concentrations (12, 14, 16, 18 et 20 µg/ml).

L'effet pro-oxydant de l'AG a été signalé par YEN *et al.* (2002), qui a expliqué également l'effet pro-oxydant de cet acide phénolique par le fait que c'est un PP ayant un pouvoir réducteur important lui permettant de régénérer le fer sous forme réduite, en plus de son faible pouvoir chélateur de métaux. Par ailleurs, l'AG a montré un effet apoptotique sur de nombreux types cellulaires, ce qui est expliqué en grande partie par son effet pro-oxydant (SAKAGAMI et SATOH, 1997).

L'effet obtenu en présence de la vit C est donné par la figure 71. A une concentration de 1 mg/ml, on constate l'apparition d'une bande intense nouvelle (I) de PM compris entre 40394,16 et 38815,03 Da, et l'apparition d'une bande notée (II) de PM inférieur à la première (29308,93-24154,60 Da). Une bande (III) de faible PM apparaît également (15452,54 Da) toujours à la même concentration.

Aux concentrations de 4, 6, 8 et 10 mg/ml, la bande (I) est toujours présente. On remarque également la disparition de la bande (II) et (III) de plus faible PM. A la concentration de 8 et 10 mg/ml, on constate la réapparition légère de la spectrine (figure 71a).

Sur la figure 71b, on remarque que les mêmes bandes apparaissent. La bande I est plus intense, en plus de l'apparition à toutes les concentrations (12, 14, 16, 18 et 20 mg/ml) de la bande correspondant à la spectrine. La bande de plus faible PM apparaît de façon nette également.

A partir de ces résultats, on conclue que la vit C a exercé tout de même un effet anti-oxydant en protégeant la spectrine contre l'oxydation à partir d'une concentration de 8 mg/ml.

Les nouvelles bandes de moyen et de faible PM pourraient être le résultat du processus d'oxydation. Leur apparition pourrait s'expliquer par leur protection par la vit C de la dégradation oxydative totale. Ces bandes pourraient en fait correspondre à des protéines issues soit de la dégradation de protéines de plus haut PM ou encore de la polymérisation de protéines de faibles PM. Du fait de la présence de la vit C, l'oxydation n'a pas conduit à une fragmentation totale des protéines au point qu'aucune bande ne soit visualisable sur le gel.

Les nouvelles bandes apparues pourraient également s'expliquer par l'effet pro-oxydant de la vit C. En effet la stimulation de la vit C de l'oxydation en régénérant le fer ferreux, va conduire à une production accrue de radicaux hydroxyles qui vont favoriser la fragmentation et/ou la polymérisation des protéines.

Selon PANDA *et al.* 1999, la vit C a un rôle dans la prévention des protéines des dommages du stress oxydant et de la protéolyse accrue.

UYESAKA *et al.* (1992) ont rapporté que les nouvelles bandes de protéines oxydées peuvent être à l'origine de la diminution de la déformabilité des globules rouges. Le changement de la charge de surface des érythrocytes pourrait également être expliqué par l'oxydation des protéines et la diminution du taux d'acide sialique ce qui pourrait conduire à

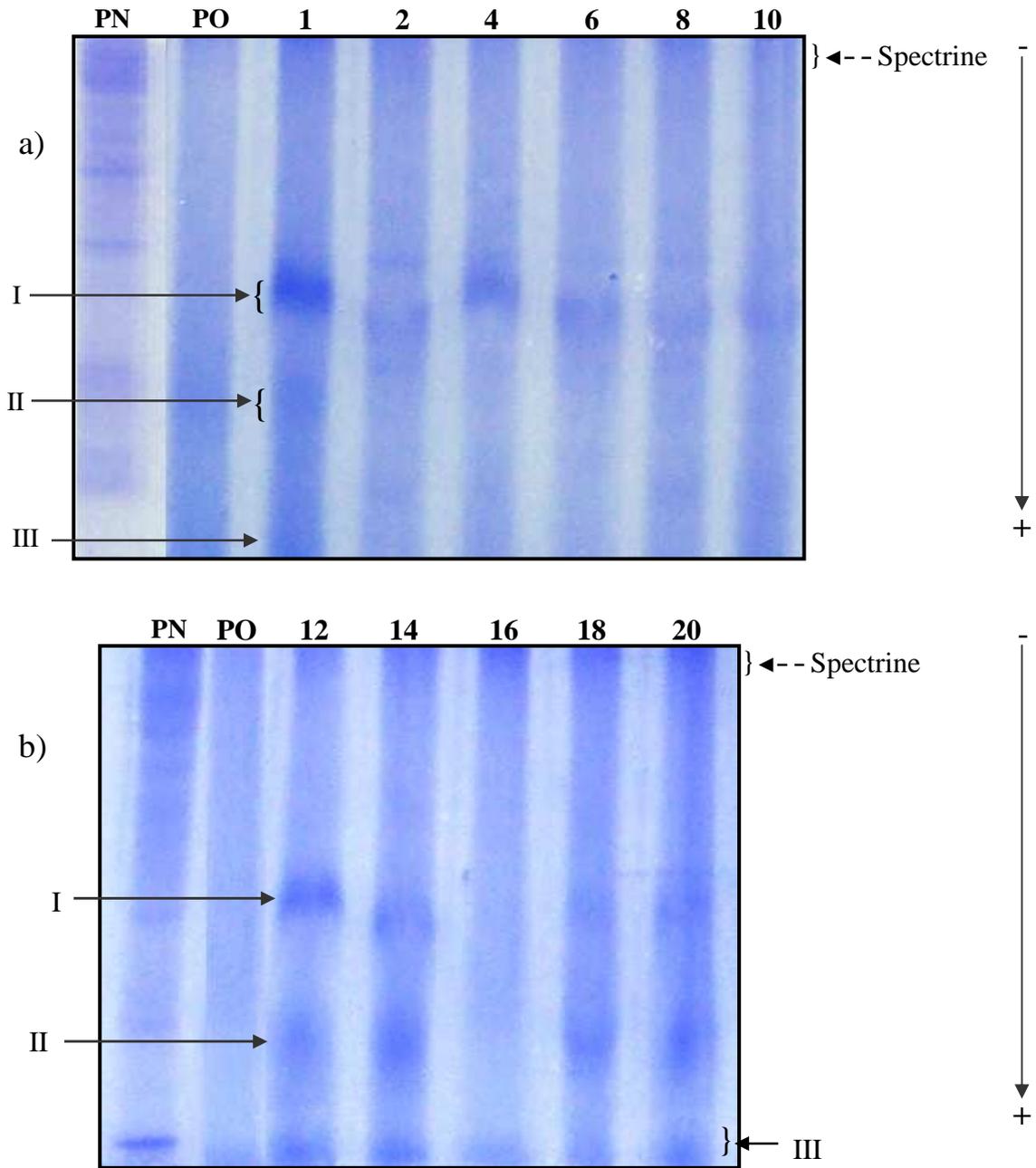


Figure 71 : Electrophorègramme des protéines membranaires érythrocytaires en PAGE-SDS dans des conditions de stress oxydatif par le système $H_2O_2/FeSO_4$ (50mM/30mM) incubées avec différentes concentrations de la vit C a) : 1, 2, 4, 6, 8, 10mg/ml ; b) : 12, 14, 16, 18, 20 mg/ml ; PN: protéines non oxydées; PO : protéines oxydées.

l'agrégation des érythrocytes menant à beaucoup de conditions pathologiques (SANGEETHA et *al.* 2005).

Ces résultats confirment que l'hors de l'exposition des érythrocytes au stress oxydant, les protéines membranaires pourraient en être la cible. En effet, il a été rapporté qu'en plus de la peroxydation lipidique, les changements de la conformation de la bande 3 seraient responsables de l'hémolyse accrue induite par des radicaux peroxydes (SATO et *al.*, 1995 ; SHIVA SHANKAR REDDY et *al.*, 2007). Selon SIMAO et *al.* (2006), l'oxydation de la bande 3 induit la formation d'un pore au niveau membranaire ce qui va conduire à l'hémolyse.

*Conclusion
générale*

Conclusion générale

Nous nous sommes intéressés aux activités anti-oxydantes des composés phénoliques totaux de la pulpe d'olive (CPO) ainsi que d'autres CP individuels. Les activités obtenues sont comparées à celle de l'antioxydant dont les propriétés sont bien connues à savoir la vitamine C. L'étude de l'effet combinatoire entre les CPO et la vit C a été également réalisée à certaines concentrations.

La quantification des CPO variété *chamlal*, a permis de mettre en relief la richesse de cette variété en CP (1633 mg \pm 0,16 d'équivalent d'AG/100 g de pulpe), un taux supérieur à certaines autres variétés d'olives existant notamment dans le bassin méditerranéen.

Quelques activités anti-oxydantes ont été mises en évidence au moyen de tests chimiques, à savoir le pouvoir réducteur et la capacité de neutralisation d'espèces radicalaires.

Le test du pouvoir réducteur a montré que les CPO ainsi que les autres phénols individuels sont doués de capacité réductrice et sont capables de ce fait de donner un atome d'hydrogène ou d'électron et de se comporter ainsi comme agents réducteurs. Les résultats ont montré que la capacité réductrice du fer des CPO est plus importante que celle de la vit C.

Un effet synergique est retrouvé entre les CPO et la vit C pour la réduction du fer alors que dans le cas du test phosphomolybdénique c'est plutôt un effet additif qui est retrouvé pour la plupart des concentrations testées.

Les tests de piégeage d'espèces radicalaires, le radical DPPH \cdot et H₂O₂, ont montré que les CPO possèdent des capacités de neutralisation importantes. Les résultats démontrent que l'activité des CPO est encore une fois plus importante que celle de la vit C. Un effet additif est retrouvé entre les CPO et la vit C, concernant le piégeage aussi bien du radical DPPH que de H₂O₂ à certaines concentrations. Pour le test DPPH un effet synergique est retrouvé pour les concentrations 60 et 80 μ g/ml en vit C.

Cette première partie expérimentale a mis en évidence deux mécanismes par lesquels les CP exercent leur action anti-oxydante: Le pouvoir réducteur et la capacité de piégeage de radicaux libres ou plus généralement d'espèces réactives de l'oxygène.

La deuxième partie expérimentale est consacrée à la démonstration des activités anti-oxydantes des CPO *in vitro*, sur un modèle cellulaire facile à obtenir ; les globules rouges et leurs systèmes membranaires.

L'activité protectrice des CP testés contre l'hémolyse, induite sous l'effet du H₂O₂, a été déterminée. Les résultats montrent que la vit C ainsi que les CP testés présentent un pouvoir anti-hémolytique. Sur ce système, la vit C présente la meilleure activité.

Pour bien comprendre le rôle protecteur des substances testées contre l'hémolyse, d'autres investigations ont été poursuivies concernant la capacité de ces substances à protéger les constituants membranaires érythrocytaires majeurs contre le stress oxydant à savoir les protéines et les lipides.

Sur un système membranaire la protection contre la peroxydation lipidique a été étudiée. Les résultats montrent que tous les CP présentent un effet protecteur contre l'oxydation des lipides. Les CPO ont présenté l'effet le plus important. Cependant la vit C, dans les conditions expérimentales utilisées a montré un effet pro-oxydant.

Sur également les membranes érythrocytaires, la protection conférée par ces molécules contre l'oxydation des protéines sous l'effet du système pro-oxydant $H_2O_2/FeSO_4$ a été également évaluée par séparation des protéines par électrophorèse PAGE-SDS.

Les résultats ont montré que l'incubation des protéines en présence du système du stress oxydant utilisé a conduit à leur dénaturation. En présence des substances à tester, différents profils sont obtenus suivant l'antioxydant utilisé et sa concentration.

Les CPO ont montré à une concentration de 1mg/ml un effet protecteur intéressant ou la majorité des bandes protéiques ont été protégées contre l'oxydation. Cependant en augmentant la concentration, l'effet pro-oxydant apparaît avec la disparition de certaines bandes et l'apparition de nouvelles. Cet effet pro-oxydant à fortes concentrations s'expliquerait du moins en partie par la forte concentration en fer présente dans le milieu en plus de celles des composés testés.

Un effet additif a été retrouvé pour tous les tests réalisés sur modèle cellulaire, en testant les CPO en présence de certaines concentrations choisies en vit C.

Il ressort de tous ces résultats que les CPO sont des molécules aux propriétés anti-oxydantes importantes le plus souvent supérieures à celles de la vit C. Leur caractère antioxydant s'expliquerait en grande partie par leur pouvoir réducteur et leur capacité de piégeage d'espèces radicalaires. Ces propriétés à la base de leur activité s'exercent également au niveau cellulaire.

Toutefois l'activité anti-oxydante de ces molécules s'exerce dans des conditions bien définies relatives au milieu et à leurs concentrations. Un effet pro-oxydant peut en effet se manifester notamment en présence de fortes concentrations en fer favorisant la réaction de Fenton.

Les CPO, molécules douées de capacités anti-oxydantes importantes, peuvent avoir leur application dans le domaine de la santé en prévenant l'apparition des maladies liées au stress oxydant ainsi que leur utilisation éventuelle dans le domaine agro-alimentaire en tant que conservateurs naturels, en alternative aux antioxydants synthétiques.

Il serait intéressant, comme continuité à ce travail, de procéder à l'analyse chromatographique de l'extrait phénolique total et d'évaluer les activités anti-oxydantes des CP purifiés permettant de définir les CP les plus actifs. Des tests *in vivo* seraient également nécessaires pour pouvoir confirmer les effets antioxydants de ces substances. Néanmoins, les effets sur la santé des PP ne dépendent pas seulement de leur niveau de consommation mais aussi de leur biodisponibilité dans le plasma sanguin. Une meilleure connaissance de leur biodisponibilité est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé.

Les composés phénoliques de l'olive, qui se partagent entre l'huile et les margines durant le processus de l'extraction de l'huile d'olive pourraient constituer donc des substances à valoriser. Particulièrement, les margines connues sous le nom de déchet oléicole, pourraient constituer une source riche en molécules phénoliques actives et permettrait à un certain degré de palier au problème de pollution de l'environnement causés principalement par les composés phénoliques difficilement dégradables par les microorganismes.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- ABAZA L., TALORETE T.P.N., YAMADA P., KURITA Y., ZARROUK M. and ISODA H. (2007).** Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a tunisian gerboui olive leaf extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71** (5), 1306–1312.
- AERTS R.J., BARRY T.N. and MCNABB W.C. (1999).** Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **75**, 1–12.
- AFIDOL. (2009).** Rapport d'activités AFIDOL 2009 : La filière oléicole française en 2009. 32-37.
- AFONSO V., CHAMPY R., MITROVIC D., COLLIN P. et LOMRI A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev. Rhum.*, **74**, 636–643.
- AGAR N.S. and BAKER M.L. (1996).** Role of catalase in H₂O₂-induced oxidant stress in marsupial erythrocytes. *Comp. Haematol. Int.*, **6**, 32-34.
- AJILA C.M. and PRASADA RAO U.J.S. (2008).** Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. *Food Chem. Tox.*, **46**, 303–309.
- ALARCON DE LA LASTRA C., BARRANCO M.D., MOTILVA V. and HERRERIAS M. (2001).** Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Curr. Pharm. Design.*, **7**, 933-950.
- AL-AZZAWIE H.F. and ALHAMDANI M.S.S. (2006).** Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.*, **78**, 1371–1377.
- ALDINI G., PICCOLI A., BERETTA G., MORAZZONI P., RIVA A., MARINELLO C. and MAFFEI FACINO R. (2006).** Antioxidant activity of polyphenols from solid olive residues of c.v. Coratina. *Fitoterapia*, **77**, 121–128.
- ALLEN R.G. (1998).** Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. *Age*, **21**, 47-76.
- ALLOUCHE N., FKI I. and SAYADI S. (2004).** Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 267-273.
- AMES B.N., SHIGENAGA M.K. and HAGEN T.M. (1993).** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 7915-7922.
- AMIOT M.-J., FLEURIET A. and MACHEIX J.-J. (1986).** Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 823-826.
- ANDRIKOPOULOS N.K., ANTONOPOULOU S. and KALIORA A.C. (2002).** Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by-products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, **35**, 479–484.
- ANGEROSA F., D'ALESSANDRO N., KONSTANTINOPOULOS P. and DI GIACINTO L. (1995).** GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1802-1807.
- ANGHILERI L.J. and THOUVENOT P. (2000).** Natural polyphenols–iron interaction its biological importance. *Biol. Trace Elem. Res.*, **73**, 251-258.
- ANTOLOVICH M., PRENZLER P.D., PATSALIDES E., MCDONALD S. and ROBARDS K. (2002).** Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**, 183–198.
- APAK R., GÜÇLÜ K., DEMIRATA B., ÖZYÜREK M., ÇELİK S.E., BEKTAŞOĞLU B., BERKER K.I. and ÖZYURT D. (2007).** Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay. *Molecules*, **12**, 1496-1547.
- ARDESTANI A. and YAZDANPARAST R. (2007).** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.*, **104**, 21–29.

- ARORA A., BYREM T.M., NAIR M.G. and STRASBURG G.M. (2000).** Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids, *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 102–109.
- ARRAEZ-ROMÁN D., CORTACERO-RAMIREZ S., SEGURA-CARRETERO A., MARTIN-LAGOS CONTRERAS J.A. and FERNANDEZ-GUTIERREZ A. (2006).** Characterization of the methanolic extract of hops using capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **27**, 2197–2207.
- ARRAEZ-ROMÁN D., ZUREK G., BÄBMANN C., ALMARAZ-ABARCA N., QUIRANTES R., SEGURA-CARRETERO A. and FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. (2007).** Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis–electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1909–1917.
- ARTS I.C.W. and HOLLMAN P.CH. (2005).** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studie. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 317S–25S.
- ARUOMA O.I. (1998).** Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *JAOCS.*, **75**, 199–212.
- ARUOMA O.I. (2003).** Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.*, **523–524**, 9–20.
- AURA A-M. (2005).** *In vitro* digestion models for dietary phenolic compounds. *VTT Publications*, 1-107.
- BABICH H. and VISIOLI F. (2003).** In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Il Farmaco*, **58**, 403–407.
- BACCOURI O., GUERFEL M., BACCOURI B., CERRETANI L., BENDINI A., LERCKER G., ZARROUK M. and DAOUD BEN MILED D. (2008).** Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chem.*, **109**, 743–754.
- BACOT S. (2004).** Caractérisation d'un nouvel aldehyde d'origine plaquettaire (a hydroxydodecadienal) et formation d'adduits de michael avec les phospholipides a ethanolamine. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France.
- BAIDEZ A.G., GOMEZ P., DEL RIO J.A. and ORTUNO A. (2007).** Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. *Physiol. Mol. Plant P.*, **69(4-6)**, 224–229.
- BALASUNDRAM N., YEW AI T., SAMBANTHAMURTHI R., SUNDRAM K. and SAMMAN S. (2005).** Antioxidant properties of palm fruit extracts. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.*, **4**, 319-324.
- BALASUNDRAM N., SUNDRAM K. and SAMMAN S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, **99**, 191–203.
- BANDONIENE D. and MUKOVIC M. (2002).** On-line HPLC-DPPH method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Makus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2482–2487.
- BATTINELLI L., DANIELE C., CRISTIANI M., BISIGNANO G., SAIJA A. and MAZZANTI G. (2006).** *In vitro* antifungal and anti-elastase activity of some aliphaticaldehydes from *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine*, **13**, 558–563.
- BAZOTI F.N., BERGQUIST J., MARKIDES K.E. and TSARBOPOULOS A. (2006).** Noncovalent interaction between amyloid- β -peptide (1-40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **17**, 568–575.
- BEECHER G.R. (2003).** Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J.Nutr.*, **133**, 3248S–3254S.

- BEGUM A.N., NICOLLE C., MILA I., LAPIERRE C., NAGANO K, FUKUSHIMA K, HEINONEN S.M., ADLERCREUTZ H., REMESY C. and SCALBERT A. (2004).** Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *J. Nutr.*, **134**, 120–127.
- BEN AHMED C., BEN ROUNA B. and BOUKHRIS M. (2007).** Effects of water deficit on olive trees cv. *Chemlali* under field conditions in arid region in Tunisia. *Sci. Hortic.*, **113**, 267–277.
- BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., LORENTE J., ORTUNO A. and DEL RIO J.A. (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.*, **68**, 457-462.
- BENDINI A., BONOLI M., CERRETANI L., BIGUZZI B., LERCKER G. and TOSCHI T.G. (2003).** Liquid–liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Chromatogr. (A)*, **985**, 425–433.
- BENDINI A., CERRETANI L., CARRASCO-PANCORBO A., GOMEZ-CARAVACA A.M., SEGURA-CARRETERO A., FERNANDEZ-GUTIERREZ A. and LERCKER G. (2007).** Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, **12**, 1679-1719.
- BENEDETTI S., BENVENUTI F., PAGLIARANI S., FRANCOGLI S., SCOGLIO S. and CANESTRARI F. (2004).** Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sci.*, **75**, 2353–2362.
- BENKHALTI F., PROST J., PAZ E., PEREZ-JIMENEZ F., EL MODAFAR C. and EL BOUSTANI E. (2002).** Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. *Nutr. Res.*, **22**, 1067–1075.
- BENNICK A. (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, **13** (2), 184-196.
- BENZIE I.F.F. (2003).** Evolution of dietary antioxidants. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, **136**, 113–126.
- BERARD E. (1997).** Métabolisme et régulation du monoxyde d'azote : un médiateur de contrôle difficile. *Arch. Pédiatrie*, **4**, 1004-1011.
- BERGER M.M. (2005).** Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin. Nutr.*, **24**, 172–183.
- BERGER M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutr. Clin. Métabol.*, **20**, 48–53.
- BERLETT B.S. and STADTMAN E.R. (1997).** Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **272**, 20313–20316.
- BERSET C. et CUVELIER M-E. (1996).** Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sci. Aliments*, **16**, 219-245.
- BIANCO A.D., MUZZALUPO I., PIPERNO A., ROMEO G. and UCCELLA N. (1999).** Bioactive derivatives of oleuropein from olive fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3531–3534.
- BIANCO A. and UCCELLA N. (2000).** Biophenolic components of olives. *Food Res. Int.*, **33**, 475–485.
- BIANCO A., MELCHIONI C., RAMUNNO A., ROMEO G. and UCCELLA N. (2004).** Phenolic components of *Olea europaea*--isolation of tyrosol derivatives. *Nat. Prod. Res.*, **18**(1), 29-32.
- BIANCO A., CHIACCHIO M.A., GRASSI G., IANNAZZO D., PIPERNO A. and ROMEO R. (2006).** Phenolic components of *Olea europea*: isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chem.*, **95**, 562–565.

- BIANCO A. and RAMUNNO A. (2006).** Cité par **ATTA-UR-RAHMAN** (ed.) *Studies in natural products chemistry*, 33. *Bioactive Natural Products (Part M)*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 750.
- BIANCO A., SERRILLI A.M. and MELCHIONI C. (2007).** Molecular composition and quality/taste of olive oil: monoterpenes and natural phenols. *ARKIVOC*, 146-156.
- BISWAS S., BHATTACHARYYA J. and DUTTA A.G. (2005).** Oxidant induced injury of erythrocyte-role of green tea leaf and ascorbic acid. *Moll. Cell. Biochem.*, **276**, 205–210.
- BITLER C.M., VIALE T.M., DAMAJ B. and CREA R. (2005).** Hydrolyzed olive vegetation waterin mice has anti-inflammatory activity. *J. Nutr.*, **135**, 1475–1479.
- BLOUET C. (2006).** *Proteines alimentaires et prévention des dysregulations glycemiques : effets du glutathion et de l'apport en cysteine*. Thèse de Doctorat. Institut national agronomique Paris-Grignon. France.
- BOCCI V., PESSINA G.P. and PAULESU L. (1980).** Studies of factors regulating the ageing of human erythrocytes—III. Metabolism and fate of erythrocytic vesicles. *Int. J. Biochem.*, **11**: 139–142.
- BOGANI P., GALLI C., VILLA M. and VISIOLI F. (2007).** Post prandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, **190**, 181–186.
- BONOLI M., MONTANUCCI M., TOSCHI T.G. and LERCKER G. (2003).** Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *J. Chromatogr. (A)*, **1011**, 163–172.
- BORS W., MICHEL C. and SARAN M. (1984).** Inhibition of bleaching of the carotenoid crocin, a rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **796**, 312–319.
- BOSKOU G., SALTA F.N., CHRYSOSTOMOU S., MYLONA A., CHIOU A. and ANDRIKOPOULOS N.K. (2006).** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chem.*, **94**, 558–564.
- BOUAZIZ M., CHAMKHA M. and SAYADI S. (2004).** Comparative Study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar chemlali from Tunisia. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5476-5481.
- BOURDON E. (2004).** *Altérations oxydatives de protéines aux importantes propriétés physiologiques : L'albumine-la protéine de régulation du fer (IRP2), la superoxyde dismutase-le proteasome*. Mémoire pour obtenir l'Habilitation à Diriger les Recherches. Université de la Réunion. La Réunion.
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E. and BERSET C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **28**, 25–30.
- BRENES M., REJANO L., GARCIA P., SANCHEZ A.H. and GARRIDO A. (1995).** Biochemical changes in phenolic compounds during spanish-style green olive processing. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2702-2706.
- BRESCIA M.A., PUGLIESE T., HARDY E. and SACCO A. (2007).** Compositional and structural investigations of ripening of table olives, *Bella della Daunia*, by means of traditional and magnetic resonance imaging analyses. *Food Chem.*, **105**, 400–404.
- BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA E. (2003).** Species differences in the susceptibility of erythrocytes exposed to free radicals *in vitro*. *Vet. Res. Commun.*, **27**, 211-217.
- BU Y., RHO S., KIM J., KIM M.Y., LEE D.H., KIM S.Y., CHOI H. and KIM H. (2007).** Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci. Lett.*, **414**, 218–221.
- BUDIYANTO A., U.AHMED N., WU A., BITO T., NIKAIDO O., OSAWA T., UEDA M. and ICHIHASHI M. (2000).** Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis*, **21 (11)**, 2085–2090.

- BUDNIKOV G.K.** and **ZIYATDINOVA G.K.** (2005). Antioxidants as analytes in analytical chemistry. *J. Anal. Chem.*, **60**(7), 600–613.
- BUEGE J.A.** and **AUST S.D.** (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **52**, 302–310.
- BUKOWSKA B.**, **MICHALOWICZ J.** and **DUDA W.** (2007). Alterations in human red blood cell properties induced by 3-(dimethylamino)phenol (*in vitro*). *Toxicol. in Vitro*, **21**, 1574–1580.
- BUTINAR B.** (2006). Antioxidants in virgin olive oils produced from two olive cultivars of slovene istria. *Annales, Ser. Hist. Nat.* **16**(2), 201–208.
- CAO G.**, **SOFIC E.** and **PRIOR RL.** (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 749–760.
- CARINI M.**, **ALDINI G.**, **BOMBARDELLI E.**, **MORAZZONI P.** and **MAFFEI FACINO R.** (2000). UVB – induced hemolysis of rat erythrocytes: protective effect of procyanidins from grape seeds. *Life Sci.*, **67**, 1799–1814.
- CARRASCO-PANCORBO A.**, **ARRAEZ-ROMAN D.**, **SEGURA-CARRETERO A.** and **FERNANDEZ-GUTIERREZ A.** (2006). Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*, **27**, 2182–2196.
- CASAS-SANCHEZ J.**, **ALSINA M.A.**, **HERRLEIN M.K.** and **MESTRES C.** (2007). Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *Colloid Polym. Sci.*, **285**, 1351–1360.
- CATURLA N.**, **PEREZ-FONS L.**, **ESTEPA A.** and **MICOL V.** (2005). Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes. *Chem. Phys. Lipids*, **137**, 2–17.
- CAZZOLA R.**, **RUSSO-VOLPE S.**, **CERVATO G.** and **CESTARO B.** (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur. J. Clin. Invest.*, **33** (10), 924–930.
- CHAUDIERE J.** and **FERRARI-ILIOU R.** (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Tox.*, **37**, 949–962.
- CHEN Z.Y.**, **CHAN P.T.**, **HO K.Y.**, **FUNG K.P.** and **WANG J.** (1996). Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem. Phys. Lipids*, **79**, 157-163.
- CHEN H-Y.**, **LIN Y-C.** and **HSIEH C-L.** (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chem.*, **104**, 1418–1424.
- CHEPDA T.**, **PERIER C.**, **CHAMSON A.** and **FREY J.** (1999). Effects pro- et antioxydants de l'ascorbate. *Nutr. Clin. Métabol.*, **13**, 115-120.
- CHEYNIER V.** (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 223S–9S.
- CHIMI H.**, **CILLARD J.**, **CILLARD P.** and **RAHMANI M.** (1991). Cité par **BOUAZIZ M.**, **CHAMKHA M.** and **SAYADI S.** (2004). Comparative Study on Phenolic Content and Antioxidant Activity during Maturation of the Olive Cultivar Chemlali from Tunisia. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5476-5481.
- CHUNG K.T.**, **WEI C.I.** and **JOHNSON M.G.** (1998). Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Sci. Technol.*, **9**, 168–175.
- CICCOLI L.**, **LEONCINI S.**, **SIGNORINI C.** and **COMPORTI M.** (2008). Cité par **VALACCHI G.** and **DAVIS P.** (2008). Oxidant in biology. A Question of Balance. Springer Science+ Business Media.
- CICERALE S.**, **LUCAS L.** and **KEAST R.** (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 458-479.

- CIESLIK E., GREȔA A. and ADAMUS W. (2006).** Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chem.*, **94**, 135–142.
- ÇIMEN M.Y.B. (2008).** Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin. Chim. Acta*, **390**, 1–11.
- CLIFFORD M. N. (2000).** Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.*, **80(7)**, 1033-1043.
- COLLINS A.R. (2005).** Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 261S–267S.
- CONI E., DI BENEDETTO R., DI PASQUALE M., MASELLA R., MODESTI D., MATTEI R. and CARLINI E.A. (2000).** Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*, **35 (1)**, 45–54.
- CORONA G., DEIANA M., INCANI A., VAUZOUR D., DESSI M.A. and SPENCER J.P.E. (2007).** Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 606–611.
- COSME F., RICARDO-DA-SILVA J.M. and LAUREANO O. (2008).** Interactions between protein fining agents and proanthocyanidins in white wine. *Food Chem.*, **106**, 536–544.
- COULON L. (2004).** Effet d'un hydroperoxyde lipidique et des LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans la libération de l'acide arachidonique des phospholipides plaquettaires. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France.
- COVAS M.I., DE LA TORRE K., FARRE-ALBALADEJO M., KAIKKONEN J., FITO M., LOPEZ-SABATER C., PUJADAS-BASTARDES M.A., JOGLAR J., WEINBRENNER T., LAMUELA-RAVENTOS R.M. and DE LA TORRE R. (2006).** Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biol. Med.*, **40**, 608 – 616.
- COVAS M.I., NYSSONEN K., POULSEN H.E., KAIKKONEN J., ZUNFT H.J.F., KIESEWETTER H., GADDI A., DE LA TORRE R., MURSU J., BAUMLER H., NASCETTI S., SALONEN J.T., FITO M., VIRTANEN J. and MARRUGAT J. (2006).** The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors. *Anal. Intern. Med.*, **145 (5)**, 333–341.
- CRACOWSKI J.L., STANKE-LABESQUE F. et BESSARD G. (2000).** Isoprostanes : nouveaux marqueurs du stress oxydant. Aspects fondamentaux et cliniques. *Rev. Méd. Interne*, **21**, 304–307.
- CRIADO M.N., MORELLO J.R., MOTILVA M.J. and ROMERO M.P. (2004).** Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the arbequina variety in Spain. *JAOCS.*, **81**, 633–640.
- CROSS C.E., MOTCHNIK P.A., BRUENER B.A., JONES D.A., KAUR H., AMES B.N. and HALLIWELL B. (1992).** Oxidative damage to plasma constituents by ozone. *FEBS lett.*, **298(2, 3)**, 269-272.
- CUVELIER M.E., RICHARD H. and BERSSET C. (1992).** Cité par **BOUAZIZ M., CHAMKHA M. and SAYADI S. (2004).** Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar chemlali from Tunisia. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5476-5481.
- DANGLES O. and BROUILLARD R. (1992).** Polyphenol interactions. The copigmentation case: thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *Can. J. Chem.*, **70**, 2174–2189.
- DANIEL O., MEIER M.S., SCHLATTER J. and FRISCHKNECHT P. (1999).** Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environ. Health Perspect.*, **107**, 109-114.

- DARLEY-USMAR V., WISEMAN H. and HALLIWELL B. (1995).** Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.*, **369**, 131-135.
- DAS D.K., ENGELMAN R.M., LIU X., MAITY S., ROUSOU J.A., FLACK J., LAKSMIPATI J., JONES R.M., PRASAD M.R. and DEATON D.W. (1992).** Oxygen-derived free radicals and hemolysis during open heart surgery. *Moll. Cell. Biochem.*, **111**, 77-86.
- DAVIES M.J., FU S., WANG H. and DEAN R.T. (1999).** Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 1151-1163.
- DAVIS A.L., LEWIS J.R., CAI Y., POWEL C., DAVIS A.P., WILKINS O.P.G., PUDNEY P. and CLIFFORD M.N. (1997).** A polyphenolic pigment from black tea. *Phytochemistry*, **46 (8)**, 1397-1402.
- DE BOER V.C.J. (2007).** Towards functional effects of polyphenols. Modulation of energy metabolism revealed. Thèse de Doctorat. Université de Wageningen. Pays-Bas.
- DE LA PUERTA R., RUIZ GUTIERREZ V. and HOULT J.R.S. (1999).** Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 445-449.
- DE LA PUERTA R., MARTINEZ DOMINGUEZ M.E., RUIZ-GUTIERREZ V., FLAVILL J.A. and HOULT J.R.S. (2001).** Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. *Life Sci.*, **69**, 1213-1222.
- DE LA TORRE-CARBOT K., CHAVEZ-SERVIN J.L., JAUREGUI O., CASTELLOTE A.I., LAMUELA-RAVENTOS R.M., FITO M., COVAS M.I., MUNOZ-AGUAYO D. and LOPEZ-SABATER M.C. (2007).** Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: Determination by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analyt. Chim. Acta*, **583**, 402-410.
- DE LEONARDIS A., MACCIOLA V., LEMBO G., ARETINI A. and NAG A. (2007).** Studies on oxidative stabilisation of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater. *Food Chem.*, **100**, 998-1004.
- DE ZWART L.L., MEERMAN J.H.N., COMMANDEUR J.N.M. and VERMEULEN N.P.E. (1999).** Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, **26(1/2)**, 202-226.
- DEL RIO J.A., BAIDEZ A.G., BOTIA J.M. and ORTUNO A. (2003).** Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chem.*, **83**, 75-78.
- DELLA RAGIONE F., CUCCIOLLA V., BORRIELLO A., DELLA PIETRA V., PONTONI G., RACIOPPI L., MANNA C., GALLETTI P. and ZAPPIA V. (2000).** Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **278**, 733-739.
- DEUTSCH J.C. (1998).** Ascorbic acid possesses labile oxygen atoms in aqueous solution. *J. Chromatogr (A)*, **802**, 385-390.
- DICKO M.H., GRUPPEN H., TRAORE A.S., VORAGEN A.G.J. and VAN BERKEL W.J.H. (2006).** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, **1(1)**, 21-38.
- DIMITRIOS B. (2006).** Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.*, **17**, 505-512.
- DIXON R.A., XIE D.Y. and SHARMA S.B. (2005).** Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, **165**, 9-28.
- DREWNOWSKI A. and GOMEZ-CARNEROS C. (2000).** Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, 1424-1435.

- DUMASWALA U.J., ZHUO L., JACOBSEN D.W., JAIN S.K. and SUKALSKI K.A. (1999).** Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes : role of glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 1041–1049.
- DURAND T., CRACOWSKI J.L. et BERDEAUX O. (2005).** Les isoprostanes, biomarqueurs de peroxydation lipidique chez l'homme. Partie 1. Nomenclature et synthèse. *Pathol. Biol.*, **53**, 349–355.
- EBRAHIMZADEH M.A., POURMORAD F. and HAFEZI S. (2008).** Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk. *Turk J Biol*, **32**, 1-7.
- FABIANI R., DE BARTOLOMEO A., ROSIGNOLI P., SERVILI M., SELVAGGINI R., MONTEDORO G.F., DI SAVERIO C. and MOROZZI G. (2006).** Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J. Nutr.*, **136**, 614–619.
- FARAH A. and DONANGELO C.M. (2006).** Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, **18** (1), 23-36.
- FAVIER A. (2003).** Le stress oxydant. *L'Act. Chim.*, 108-115.
- FERREIRA I.C.F.R., BARROS L., SOARES M.E, BASTOS M.L. and PEREIRA J.A. (2007).** Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chem.*, **103**, 188–195.
- FITO M., COVAS M.I., LAMUELA-RAVENTOS R.M., VILA J., TORRENTS J., DE LA TORRE C. and MARRUGAT J. (2000).** Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids*, **35** (6), 633–638
- FITO M., CLADELLAS M., DE LA TORRE R., MARTI J., ALCANTARA M., PUJADAS-BASTARDES M., MARRUGAT J., BRUGUERA J., LOPEZ-SABATER M.C., VILA J. and COVAS M.I. (2005).** Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, **181**, 149–158.
- FKI I., BOUAZIZ M., SAHNOUN Z. and SAYADI S. (2005).** Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 5362–5370.
- FLEMING H.P., WALTER W.M., Jr. and ETCHELLS J.L. (1973).** Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *appl. Microbiol.*, **26**(5), 777-782.
- FOGLIANO V., VERDE V., RANDAZZO G. and RITTENI A. (1999).** Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1035–1040.
- FONTAINE E., BARNOUD D., SCHWEBEL C. et LEVERVE X. (2002).** Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, **11**, 411-420.
- FRANCONI F., COINU R., CARTA S., URGEGHE P.P., IERI F., MULINACCI N. and ROMANI A. (2006).** Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3121-3125.
- FRANK J. (2004).** Dietary phenolic compounds and vitamin E bioavailability. Thèse de Doctorat. Université suédoise des sciences agronomiques. Suède.
- FREI B. (1991).** Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low density lipoprotein against oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 1113S–1118S.
- FUJINO T., TADA T., HOSAKA T., BEPPU M. and KIKUGAWA K. (2000).** Presence of oxidized protein hydrolase in human cell lines, rat tissues, and human/rat plasma. *J. Biochem.*, **127**, 307–13.
- FURNERI P.M., MARINO A., SAIJA A., UCCELLA N. and BISIGNANO G. (2002).** In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, **20**, 293–296.

- GAETKE L.M.** and **CHOW C.K.** (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, **189**, 147–163.
- GALLAGHER P.G.** and **FORGET B.G.** (1993). Spectrin gene in health and disease. *Semin Hematol.*, **30**(1), 4–21.
- GALLI C.** et **VISIOLI F.** (1999). Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the mediterranean diet. *Lipids*, **34**, 523–526.
- GARBARZ M., DHERMY D., LECOMTE M.C., FEO C., CHAVEROCHE I., GALAND C., BOURNIER O., BERTRAND O.** and **BOIVIN P.** (1984). A variant of erythrocyte membrane skeletal protein band 4.1 associated with hereditary elliptocytosis. *Blood*, **64**(5), 1006-1015.
- GARDNER P.T., MCPHAIL D.B.** and **DUTHIE G.G.** (1998). Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *J. Sci. Food. Agric.*, **76**, 257–262.
- GIROTTI-CHANU C.** (2006). Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea Debilis*. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France.
- GOKTURK BAYDAR N., OZKAN G.** and **YASAR S.** (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, **18**, 1131–1136.
- GOMEZ-RICO A., FREGAPANE G.** and **SALVADOR M.D.** (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Res. Int.*, **41**, 433–440.
- GOMEZ-ROMERO M., ARRAEZ-ROMAN D., MORENO-TORRES R., GARCIA-SALAS P., SEGURA-CARRETERO A.** and **FERNANDEZ-GUTIERREZ A.** (2007). Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, **30**, 595–603.
- GOMEZ-ROMERO M., ARRAEZ-ROMAN D., SEGURA-CARRETERO A.** and **FERNANDEZ-GUTIERREZ A.** (2007). Analytical determination of antioxidants in tomato: Typical components of the Mediterranean diet. *J. Sep. Sci.*, **30**, 452–461.
- GONZALEZ-FLECHA B.** and **DEMPLE B.** (1997). Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **179**, 382-388.
- GONZALEZ-PARAMAS A.M., LOPES DA SILVA F., MARTIN-LOPEZ P., MACZ-POP G., GONZALEZ-MANZANO S., ALCALDE-EON C., PEREZ-ALONSO J.J., ESCRIBANO-BAILON M.T., RIVAS-GONZALO J.C.** and **SANTOS-BUELGA C.** (2006). Flavanol–anthocyanin condensed pigments in plant extracts. *Food Chem.*, **94**, 428–436.
- GONZALEZ-SANTIAGO M., MARTIN-BAUTISTA E., CARRERO J.J., FONOLLA J., BARO L., BARTOLOME M.V., GIL-LOYZAGA P.** and **LOPEZ-HUERTAS E.** (2006). One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, **188**, 35–42.
- GOUDABLE J.** et **FAVIER A.** (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr. Clin. Métabol.*, **11**, 115-120.
- GUEYE P.M.** (2007). « Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge ». Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur – Strasbourg I. France.
- GUITTON J., TINARDON F., LAMRINI R., LACAN P., DESAGE M.** and **FRANCINA A.** (1998). Decarboxylation of [1-¹³C]leucine by hydroxyl radicals - for clinical research and diagnosis. *Free Radical Biol. Med.*, **25** (3), 340-345.

- GULCIN I. (2006).** Antioxidant activity of caffeic acid (3,4 dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, **217**, 213–220.
- GUTFINGER J. (1981).** Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 966–968.
- HAGERMAN A.E. and BUTLER L.G. (1981).** The specificity of proanthocyanidin-protein interaction. *J. Biol. Chem.*, **256 (9)**, 4444–4497.
- HAJIMAHMOODI M., SADEGHI N., JANNAT B., OVEISI M.R., MADANI S. and KIAYI M. (2008).** Antioxidant activity reducing power and total phenolic content of iranian olive cultivar. *J. Biol. Sci.*, **8(4)**, 779–783.
- HALDER J. and BHADURI A.N. (1998).** Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 903–907.
- HALLIWELL B. and GROOTVELD M. (1987).** The measurement of free radical reactions in humans Some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett*, **213(1)**, 9–14.
- HALLIWELL B. (1991).** Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.*, **9**, 3C-14S–3C-22S.
- HALLIWELL B. (1994).** Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr. Rev.*, **52**, 253–265.
- HALLIWELL B. (1995).** Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*, **49(10)**, 1341–1348.
- HALLIWELL B. (1999).** Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat. Res.*, **443**, 37–52.
- HALLIWELL B., CLEMENT M.V. and LONG L.H. (2000).** Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.*, **486**, 10–13.
- HALLIWELL B. (2002).** Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical Biol. Med*, **32(10)**, 968–974.
- HALLIWELL B. (2006).** Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.*, **31(9)**, 509–515.
- HAMDEN K., ALLOUCHE N., DAMAK M. and ELFEKI A. (2009).** Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chem-Biol. Interact.*, **180**, 421–432.
- HAMDI H.K. and CASTELLON R. (2005).** Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 769–778.
- HAMPTON M.B. and ORRENIUS S. (1997).** Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.*, **414**, 552–556.
- HAN X., SHEN T. and LOU H. (2007).** Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.*, **8**, 950–988.
- HANDIQUE J.G. and BARUAH J.B. (2002).** Polyphenolic compounds: an overview. *React. Funct. Polym.*, **52**, 163–188.
- HARATS D., CHEVION S., NAHIR M., NORMAN Y., SAGEE O. and BERRY E.M. (1998).** Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamins C and E in vivo. *Am. J. Clin. Nutr.*, **67**, 240–245.
- HASLAM E. (2007).** Vegetable tannins—Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, **68**, 2713–2721.
- HATFIELD R. and VERMERRIS W. (2001).** Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol.*, **126**, 1351–1357.
- HE Z. and XIA W. (2007).** Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit by RPHPLC–DAD–ESI–MS. *Food Chem.*, **105**, 1307–1311.
- HENNEBELLE T. (2006).** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota*

- pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille-Lilles1. France.
- HILLIER R.M. (1976).** The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Res.*, **43**, 259-265.
- HOUSSET B. (1990).** Aberrations du métabolisme des protéines et des acides nucléiques au cours du vieillissement. Rôle des radicaux libres. *Rev. Med. Interne*, **11**, 62-66.
- HUANG Y.S., REDDEN P., LIN X., SMITH R., Mackinnon S. and HORROBIN D.F. (1991).** Effect of dietary olive oil non-glyceride fraction on plasma cholesterol level and liver phospholipid fatty acid composition. *Nutr. Res.*, **11**, 439-448.
- HUDAIB M, GOTTI R, POMPONIO R. and CAVRINI V. (2003).** Recovery evaluation of lipophilic markers from Echinacea purpurea roots applying microwave-assisted solvent extraction versus conventional methods. *J. Sep. Sci.*, **26**, 97-104.
- IRITI M. and FAORO F. (2008).** Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water Air Soil Pollut.*, **187**, 285-301.
- JAMES A.M., SMITH R.A.J. and MURPHY M.P. (2004).** Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q. *Arch. Biochem. Biophys.*, **423**, 47-56.
- JANA A.K., AGARWAL S. and CHATTERJEE S.N. (1990).** Membrane lipid peroxidation by ultrasound: mechanism and implications. *J Bioscience*, **15**, 211-215.
- JANUEL C. (2003).** Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète. Etude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. Thèse de Doctorat. Université de Lyon I/INSA-Lyon. France.
- JAYAPRAKASHA G.K., GIRENAVAR B. and PATIL B.S. (2008).** Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT*, **41**, 376-384.
- JOZWIK M., JOZWIK M., JOZWIK M., SZCZYPKA M., GAJEWSKA J. and LASKOWSKA-KLITA T. (1997).** Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin. Chim. Acta*, **267**, 129-142.
- KAHL R. (1991).** Cité par **SAIJA A., TROMBETTA D., TOMAINO A., CASCIO R.L., PRINCI P., UCCELLA N., BONINA F. and CASTELLI F. (1998).** 'In vitro' evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int. J. Pharm.*, **166**, 123-133.
- KAVIARASAN S., VIJAYALAKSHMI K. and ANURADHA C.V. (2004).** Polyphenol-rich extract of fenugreek seeds protect erythrocytes from oxidative damage. *Plant Food Hum. Nutr.*, **59**, 143-147.
- KAY M.M.B., GOODMAN S.R., SORENSEN K., WHITFIELD C.F., WONG P., ZAKI L. and RUDLOFF V. (1983).** Senescent cell antigen is immunologically related to band 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 1631-1635.
- KAY M.M.B. (1984).** Localization of senescent cell antigen on band 3. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 5753-5757.
- KECELI T. and GORDON M.H. (2002).** Ferric ions reduce the antioxidant activity of the phenolic fraction of virgin olive oil. *J. Food Sci.*, **67** (3), 943- 947.
- KHAN Md.Y., PANCHAL S., VYAS N., BUTANI A. and KUMAR V. (2007).** *Olea europaea*: A phyto-pharmacological review. *Phcog. Rev.*, **1** (1), 114-118.
- KHANBABAEE K. and VAN REE T. (2001).** Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 641-649.
- KHOUI S., ALOUI F. and SAYADI S. (2008).** Extraction of antioxidants from olive mill wastewater and electro-coagulation of exhausted fraction to reduce its toxicity on anaerobic digestion. *J. Hazard. Mater.*, **151**, 531-539.
- KING A. and YOUNG G. (1999).** Characteristic and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.*, **99**, 213-218.

- KLOTZ L.O. (2005).** Modulation of cellular signaling processes by reactive oxygen species. *Hdb. Env. Chem.*, **2**, 203–218.
- KURODA Y. and HARA Y. (1999).** Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat. Res.*, **436**, 69–97.
- LAEMMLI U. K. and FAVRE H. (1973).** Maturation of the head of bacteriophage T4 I DNA packaging events. *J. Moll. Biol.*, **780**, 575-599.
- LAGUERRE M., LÓPEZ-GIRALDO L.J., LECOMTE J., PINA M. et VILLENEUVE P. (2007).** Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *OCL*, **14(5)**, 278-292.
- LEE-HUANG S., ZHANG L., P.L., CHANG Y.T. and HUANG P.L. (2003).** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1infection and OLE treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, 1029–1037.
- LEE-HUANG S., HUANG P.L., ZHANG D., LEE J.W., BAO J., SUN Y., CHANG Y.T., ZHANG J. and HUANG P.L. (2007).** Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. Integrase inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 879–884.
- LEFEVRE G., BELJEAN-LEYMARIE M., BEYERLE F., BONNEFONT-ROUSSELOT D., CRISTOL JP., THEROND P. et TORREILLES J. (1998).** Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Ann. Biol. Clin.*, **56(3)**, 305-319.
- LESAGE-MEESSEN L., NAVARRO D., MAUNIER S., SIGOILLOT J-C., LORQUIN J., DELATTRE M., SIMON J-L., ASTHER M. and LABAT M. (2001).** Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem.*, **75**, 501–507.
- LESSCHAEVE S. and NOBLE A.C. (2005).** Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 330S–5S.
- LETELLIER M. and BUDZINSKI H. (1999).** Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, **27**, 259-271.
- LEVINE R.L., WEHR N., WILLIAMS J.A., STADMAN E.R. and SHACTER E. (2000).** 'Determination of carbonyl groups in oxidized proteins'. *Methods Mol. Biol.*, **99**, 15-24.
- LIBERATORE L., PROCIDA G., D'ALESSANDRO N. and CICHELLI A. (2001).** Solid-phase extraction and gaz chromatographic analysis of phenolic compounds in vergin olive oil. *Food Chem.*, **73**, 119–124.
- LINDERKAMP O., KIAU U. and RUEF P. (1997).** Cellular and membrane deformability of red blood cells in protein infants with and with out growth retardation. *Clin. Hemorheol. Micro.*, **17**, 279–283.
- LINOS A., KAKLAMANI V.G. KAKLAMANI E. KOUMANTAKI Y. GIZIAKI E. PAPAZOGLU S. and MANTZORO C.S. (1999).** Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables? *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**, 1077–1082.
- LISSI E.A., SALIM-HANNA M., PASCUAL C. and CASTILLO M.D. (1995).** Del Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) from enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biol. Med.*, **18**, 153–158.
- LOGAN B.A., KORNIEYEV D., HARDISON J. and HOLADAY A.S. (2006).** The role of antioxidant enzymes in photoprotection. *Photosynth. Res.*, **88**, 119–132.
- LOPEZ S., PACHECO Y.M., BERMUDEZ B., ABIA R. and MURIANA F.J.G. (2004).** Olive oil and cancer. *Grasas. Aceites*, **55**, 33-41.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951).** Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biochem.*, **193**, 265-275.
- LUBRANO V., VASSALLE C., L'ABBATE A. and ZUCHELLI G.C. (2002).** A new method to evaluate oxidative stress in humans. *IBS.*, **17**, 172–175.

- LUCK G., LIAO H., MURRAY N.J., GRIMMER H.R., WARMINSKI E.E., WILLIAMSON M.P., LILLEY E.H. and HASLAM E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, **37** (2), 357-371.
- MAIURI M.C., DE STEFANO D., DI MEGLIO P., IRACE C., SAVARESE M., SACCHI R., CINELLI M.P. and CARNUCCIO R. (2005). Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **371**, 457–465.
- MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C. and JIMENEZ L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**, 727–47.
- MANNA C., MIGLIARDI V., GOLINO P., SCOGNAMIGLIO A., GALLETTI P., CHIARIELLO M. and ZAPPIA V. (2004). Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J. Nutr. Biochem.*, **15**, 461–466.
- MANNA C., GALLETTI P., CUCCIOLLA V., MONTEDORO G. and ZAPPIA V. (1999). Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr. Biochem.*, **10**, 159–165.
- MARFAK A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. France.
- MARRUGAT J., COVAS M.I., FITO M., SCHRÖDER H., MIRO-CASAS E., GIMENO E., LOPEZ-SABATER M.C., DE LA TORRE R. and FARRE M. (2004). Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation. *Eur. J. Nutr.*, **43**, 140–147.
- MCDONALD S., PRENZLER P.D., ANTOLOVICH M. and ROBARDS K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.*, **73**, 73-84.
- MEIR S., KANNER J., AKIRI B. and HADAS S.P. (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defence systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1813–1815.
- MENENDEZ J.A., VAZQUEZ-MARTIN A., COLOMER R., BRUNET J., CARRASCO-PANCORBO A., GARCIA-VILLALBA R., FERNANDEZ-GUTIERREZ A. and SEGURA-CARRETERO A. (2007). Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC. Cancer*, **7** (80), 1-19.
- MICOL V., CATURLA N., PEREZ-FONS L., MAS V., PEREZ L. and ESTEPA A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antivir. Res.*, **66**, 129–136.
- MILES E.A., ZOUBOULI P. and CALDER P.C. (2005). Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, **21**, 389-394.
- MILLER H.E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **45**, 91.
- MILLER N.J., RICE-EVANS C., DAVIES M.J., COPINATHAN V. and MILNER A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonants. *Clin. Sci.*, **26**, 265–277.
- MISNAWI, JINAP S., JAMILAH B. and NAZAMID S. (2004). Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. *Food Qual. Prefer.*, **15**, 403–409.
- MOHAMMEDI Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles et flavonoides de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen. Algérie.

- MONTEDORO G.F., SERVILI M., BALDIOLI M. and MINIATI E. (1992).** Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1571–1576.
- MONTEDORO G.F., SERVILI M., BALDIOLI M., SELVAGGINI R., MINIATI E. and MACCHIONI A. (1993).** Simple and hydrolysable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 2228–2234.
- MORELLO J-R., ROMERO M-P. and MOTILVA M-J. (2004).** Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from arbequina, farga, and morrut cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6002-6009.
- MORENO J.J. (2003).** Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages raw 264.7. *Free Radical Biol. Med.*, **35** (9), 1073–1081.
- MORZEL M., GATELLIER P., SAYD T., RENERRE M. and LAVILLE E. (2006).** Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Sci.*, **73**, 536–543.
- MOURE A., CRUZ J.M., FRANCO D., DOMINGUEZ J.M., SINEIRO J., DOMINGUEZ H., NUNEZ M.J. and PARAJO J.C. (2001).** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, **72**, 145–171.
- MURKOVIC M., LECHNER S., PIETZKA A., BRATACOS M. and KATZOGIANNOS E. (2004).** Analysis of minor components in olive oil. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, **61**, 155–160.
- NACZK M. and SHAHIDI F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. (A)*, **1054**, 95–111.
- NACZK M. and SHAHIDI F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **41**, 1523–1542.
- NENADIS N. and TSIMIDOU M. (2002).** Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) tests. *JAOCs.*, **79**, 1191–1195.
- NERGIZ C. and ONAL K. (1991).** Determination of Phenolic Acids in Virgin Olive Oil. *Food Chem.*, **39**, 237-240.
- NETTO L.E.S., OLIVEIRA M.A., MONTEIRO G., DEMASI A.P.D., CUSSIOL J.R.R., DISCOLA K.F., DEMASI M., SILVA G.M., ALVES S.V., FARIA V.G. and HORTA B.B. (2007).** Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, **146**, 180–193.
- NEVE J. (2002).** Modulation de l’apport alimentaire en anti-oxydants Optimisation of dietary intake of anti-oxidants. *Nutr. Clin. Métabol.*, **16**, 292–300.
- O’DELL B.L., BROWNING J.D. and REEVES P.G. (1987).** Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes. *J. Nutr.*, **117**, 1883–1889.
- O’DOWD Y., DRISS F., DANG P.M.C., ELBIM C., GOUGEROT-POCIDALO M.A., PASQUIER C. and 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.
- O’CONNELL J.E. and FOX P.F. (2001).** Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *Int. Dairy J.*, **11**, 103–120.
- OBIED H.K., ALLEN M.S., BEDGOOD D.R., PRENZLER P.D., ROBARDS K. and STOCKMANN R. (2005).** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 823–837.

- OBIED H.K., BEDGOOD JR. D.R., PRENZLER P.D. and ROBARDS K. (2007).** Bioscreening of australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food Chem. Tox.*, **45**, 1238-1248.
- OJALA T. (2001).** Biological screening of plant coumarins. Thèse de Doctorat. Université d'Helsinki. Finlande.
- OLALEYE M.T., ADEGBOYE O.O. and AKINDAHUNSI A.A. (2006).** *Alchornea cordifolia* extract protects wistar albino rats against acetaminophen-induced liver damage. *Afr. J. Biotechnol.*, **5 (24)**, 2439-2445.
- OMAR S. H. (2010).** Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.*, **78**, 133–154.
- OPREA-MITROFAN L.M. (2006).** Recherches de nouveaux marqueurs de mort programmée (apoptose) dans les membranes des hématies humaines sénescents. Impact en transfusion sanguine. Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Technologie de Lille 1. France.
- OWEN R.W., GIACOSA A., HULL W.E., HAUBNER R., SPIEGELHALDER B. and BARTSCH H. (2000).** The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur. J. Cancer*, **36**, 1235–1247.
- OWEN O.W., GIACOSA A., HULL W.E., HAUBNER R., WÜRTELE G., SPIEGELHALDER B. and BARTSCH H. (2000).** Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet. Oncol.*, **1**, 107–112.
- OWEN R.W., MIER W., GIACOSA A., HULL W.E., SPIEGELHALDER B. and BARTSCH H. (2000).** Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Tox.*, **38**, 647–659.
- OWEN R.W., HAUBNER R., MIER W., GIACOSA A., HULL W.E., SPIEGELHALDER B. and BARTSCH H. (2003).** Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem. Tox.*, **41**, 703–717.
- OWUOR E.D. and KONG A.N.T. (2002).** Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 765–770.
- OYAIZU M. (1986).** Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *J. Nutr.*, **44**, 307–315.
- PAHLAVANI M.A. and REMMEN H.V. (1997).** New directions for studying the role of free radicals in aging. *Age*, **20**, 151-163.
- PAIVA-MARTINS F., GORDON M.H. and GAMEIRO P. (2003).** Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, **124**, 23–36.
- PAIVA-MARTINS F., FERNANDES J., ROCHA S., NASCIMENTO H., VITORINO R., AMADO F., BORGES F., BELO L. and SANTOS-SILVA A. (2009).** Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol. Nutr. Food Res.*, **53**, 1-8.
- PAIXAO N., PERESTRELO R., MARQUES J.C. and CAMARA J.S. (2007).** Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.*, **105**, 204–214.
- PANDA K., CHATTOPADHYAY R., GHOSH M.K., CHATTOPADHYAY D.J. and CHATTERJEE I.B. (1999).** Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. *Free Rad Biol Med*, **27**, 1064–1079.
- PANIZZI L., SCARPATI M.L. and ORIENTE G. (1960).** Cité par **BIANCO A. and RAMUNNO A. (2006).** The Chemistry of *Olea europaea*. 859-903. In: **ATTA-UR-RAHMAN** (ed.) Studies in natural products chemistry, 33. Bioactive Natural Products (Part M). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 750.

- PANSERA M.R., IOB G.A., ATTI-SANTOS A.C., ROSSATO M., ATTI-SERAFINI L. and CASSEL E. (2004). Extraction of tannin by *Acacia mearnsii* with supercritical fluids. *Braz. Arch. Biol. Techn.*, **47** (6), 995-998.
- PAPADOPOULOU A. and FRAZIER R.A. (2004). Characterization of protein–polyphenol interactions. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**, 186–190.
- PARK SA-W. and LEE S-M. (2008). Antioxidant and prooxidant properties of ascorbic acid on hepatic dysfunction induced by cold ischemia/reperfusion. *Eur. J. Pharmacol.*, **580**, 401–406.
- PAZDZIOCH-CZOCZRA M. and WIDENSKA A. (2002). Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide scavenging activity. *Analyt Chim Acta*, **452**, 177–184.
- PENG J., JONES G.L. and WATSON K. (2000). Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radical Biol. Med.*, **28**(11), 1598–1606.
- PERONA J.S., CABELLO-MORUNO R. and RUIZ-GUTIERREZ V. (2006). The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J. Nutr. Biochem.*, **17**, 429–445.
- PETERS L.L. and LUX S.E. (1993). Ankyrin: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. *Semin. Hematol.*, **30**(2), 85–118.
- PETRONI A., BLASEVICH M., PAPINI N., SALAMI M., SALA A. and GALLI C. (1997). Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry. *Throm. Res.*, **87**(3), 315-322.
- PFÄFFEROTT C., MEISELMAN H.J. and HOCHSTEIN P. (1982). The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. *Blood*, **59**, 12–15.
- PINCEMAIL J., BONJEAN K., CAYEUX K. et DEFRAIGNE J.O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutr. Clin. Métabol.*, **16**, 233–239.
- PINCEMAIL J. et DEFRAIGNE J.O. (2003). Le coenzyme Q10 ou ubiquinone: un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, **8**(2), 55–60.
- PINCEMAIL J., DEGRUNE F., VOUSSURE S., MALHERBE C., PAQUOT N. et DEFRAIGNE J.O. (2007). Effet d’une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutr. Clin. Métabol.*, **21**, 66–75.
- PIN-DER-DUH X. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free radical and active oxygen. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 455–461.
- PIRISI F.M., ANGIIONI A., CABRAS P., GARAU V.L., Di TEULADA M.T.S., Dos SANTOS M.K. and BANDINO G. (1997). Phenolic compounds in virgin olive oils I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution. *J. Chromatogr. (A)*, **768**, 207-213.
- POLZONETTI V., EGIDI D., VITA A., VINCENZETTI S. and NATALINI P. (2004). Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food Chem.*, **88**, 11–15.
- PREYS S., MAZEROLLES G., COURCOUX P., SAMSON A., FISCHER U., HANAFI M., BERTRAND D. and CHEYNIER V. (2006). Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analyt. Chim. Acta*, **563**, 126–136.
- PRIEGO-CAPOTE F., RUIZ-JIMENEZ J. and LUQUE DE CASTRO M.D. (2004). Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis–diode array detection Application to the characterisation of alperujo after ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatogr. (A)*, **1045**, 239–246.
- PRIETO P., PINEDA M. and AGUILAR M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.*, **269**, 337–341.

- PRIGENT S. (2005).** Interactions of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties. Thèse de Doctorat. Université de Wageningen. Pays-Bas.
- PRIOR R., WU X. and SCHICH K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302.
- PUEL C., QUINTIN A., AGALIAS A., MATHEY J., OBLED C., MAZUR A., DAVICCO M.J., LEBECQUE P., SKALTSOUNIS A. L. and COXAM V. (2004).** Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *Br J Nutr*, **92**, 119–127.
- PUEL C., MATHEY J., AGALIAS A., KATI-COULIBALY S., MARDON J., OBLED C., DAVICCO M.J., LEBECQUE P., HORCAJADA M.N., SKALTSOUNIS A.L. and COXAM V. (2006).** Dose–response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clin. Nutr.*, **25**, 859–868.
- QUILES J.L., FARQUHARSON A.J., SIMPSON D.K., GRANT I. and WAHLE K.W.J. (2002).** Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *Br. J. Nutr.*, **88**, 225–234.
- RAHMAN I., BISWAS S.K. and KODE A. (2006).** Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.*, **533**, 222–239.
- RATTY A.K. and DAS N.P. (1988).** Cité par **SAIJA A., TROMBETTA D., TOMAINO A., CASCIO R.L., PRINCI P., UCCELLA N., BONINA F. and CASTELLI F. (1998).** ‘*In vitro*’ evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int. J. Pharm.*, **166**, 123–133.
- RAWEL H.M. and KULLING S.E. (2007).** Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. *J. Verbr. Lebensm.*, **2**, 399–406.
- RAZZABONI B.L. and BOLSAITIS P. (1990).** Evidence of an oxidative mechanism for the hemolytic activity of silica particles. *Environ. Health Perspect.*, **87**, 337-341.
- REED J.D., KRUEGER C.G. and VESTLING M.M. (2005).** MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry*, **66**, 2248–2263.
- REIN M. J. (2005).** Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins (dissertation). Thèse de Doctorat. Université d’Helsinki. Finlande.
- RICE-EVANS CA. and BURDON RH. (1994).** Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. *Elsevier Science BV*, 131-153.
- RICE-EVANS CA., MILLER NJ. and PAGANGA G. (1996).** Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 933–956.
- RIOS J.J., GIL M.J. and GUTIERREZ-ROSALES F. (2005).** Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *J. Chromatogr. (A)*, **1093**, 167–176.
- ROBARDS K. and ANTOLOVICH M. (1997).** Analytical chemistry of fruit bioflavonoids, a review. *Analyst*, **122**, 11R–34R.
- RODRIGUEZ J., DI PIERRO D., GIOIA M., MONACO S., DELGADO R., COLETTA M. and MARINI S. (2006).** Effects of a natural extract from *Mangifera indica* L, and its active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1333–1342.
- ROGINSKY V. and LISSI E.A. (2005).** Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, **92**, 235–254.

- ROMANI A., MULINACCI N., PINELLI P., VINCIERI F.F. and CIMATO A. (1999).** Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 964-967.
- ROSENBLUM B.B., HANASH S.M., YEW N. and NEEL J.V. (1982).** Cité par **OPREA-MITROFAN L.M. (2006).** Recherches de nouveaux marqueurs de mort programmée (apoptose) dans les membranes des hématies humaines sénescents. Impact en transfusion sanguine. Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Technologie de Lille 1. France.
- ROUPE K.A., REMSBERG C.M., YAÑEZ J.A. and DAVIES N.M. (2006).** Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.*, **1**, 81-101.
- ROZANOWSKA M., SARNA T., LAND E.J. and TRUSCOTT T.G. (1999).** Free radical scavenging properties of melanin. Interaction of Eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radical Biol. Med.*, **26(5/6)**, 518-525.
- RUANO J., LOPEZ-MIRANDA J., FUENTES F., MORENO J.A., BELLIDO C., PEREZ-MARTINEZ P., LOZANO A., GÓMEZ P., JIMÉNEZ Y. and PÉREZ JIMÉNEZ F. (2005).** Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *JACC.*, **46(10)**, 1864-1868.
- RUCH R.J., CHENG S.J. and KLAUNIG J.E. (1989).** Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, **10**, 1003-1008.
- RUSSO G.L. (2007).** Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 533-544.
- RYAN D. and ROBARDS K. (1998).** Phenolic compounds in olives. *Analyst*, **123**, 31R-44R.
- RYAN D., ROBARDS K. and LAVEE S. (1999).** Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. (A)*, **832**, 87-96.
- RYAN D., ROBARDS K., PRENZLER P., JARDINE D., HERLT T. and ANTOLOVICH M. (1999).** Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *J. Chromatogr. (A)*, **855**, 529-537.
- RYAN D., LAWRENCE H., PRENZLER P.D., ANTOLOVICH M. and ROBARDS K. (2001).** Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Analyt. Chim. Acta*, **445**, 67-77.
- RYAN D., ANTOLOVICH M., PRENZLER P., ROBARDS K. and LAVEE S. (2002).** Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea*. *Sci. Horticulture-AMSTERDAM*, **92**, 147-176.
- SADRZSDEH S.M.H., GRAF E., PANTER S.S, HALLAWAY P.E. and EATON J.W. (1984).** Hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **259 (23)**, 14354-14356.
- SAFFARI Y. and SADRZADEH S.M.H. (2004).** Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sci.*, **74**, 1513-1518.
- SAIJA A., SCALESE M., LANZA M., MARZULLO D., BONINA F. and CASTELLI F. (1995).** Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.*, **19**, 481-486.
- SAIJA A., TROMBETTA D., TOMAINO A., CASCIO R.L., PRINCI P., UCCELLA N., BONINA F. and CASTELLI F. (1998).** 'In vitro' evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int. J. Pharm.*, **166**, 123-133.
- SAIJA A. and UCCELLA N. (2001).** Olive biophenols: functional effects on human wellbeing. *Trends Food Sci. Technol.*, **11**, 357-363.

- SAITTA M., LO CURTO S., SALVO F., DI BELLA G. and DUGO G. (2002).** Gas chromatographic–tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analyt. Chim. Acta*, **466**, 335–344.
- SAKAGAMI H. and SATOH K. (1997).** Pro-oxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. *Anticancer Res.*, **17**, 221–224.
- SALAMI M., GALLI C., DE ANGELIS L. and VISIOLI F. (1995).** Formation of f,-isoprostanes in oxidized low density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacol. Res*, **31(5)**, 275–279.
- SALVADOR M.D., ARANDA F. and FREGAPANE G. (2001).** Influence of fruit ripening on ‘‘Cornicabra’’ virgin olive oil quality. A study of four successive crop seasons. *Food Chem.*, **73**, 45–53.
- SAMANIEGO SANCHEZ C., TRONCOSO GONZALEZ A.M., GARCIA-PARRILLA M.C., QUESADA GRANADOS J.J., LOPEZ GARCIA DE LA SERRANA H. and LOPEZ MARTINEZ M.C. (2007).** Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analyt. Chim. Acta*, **593**, 103–107.
- SANGEETHA P., BALU M., HARIPRIYA D. and PANNEERSELVAM C. (2005).** Age associated changes in erythrocyte membrane surface charge: Modulatory role of grape seed proanthocyanidins. *Exp. Gerontol.*, **40**, 820–828.
- SATO Y., KAMO S., TAKANISHI T. and SUZUKI Y. (1995).** Mechanism of free radicals-induced haemolysis of human erythrocytes: haemolysis by water-soluble radical initiator. *Biochemistry*, **34**, 8940–8949.
- SATO H., GENET C., STREHLE A., THOMAS C., LOBSTEIN A., WAGNER A., MIOSKOWSKI C., AUWERX J. and SALADIN R. (2007).** Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 793–798.
- SAVARESE M., DE MARCO E. and SACCHI R. (2007).** Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciotana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem.*, **105 (2)**, 761–770.
- SCALBERT A. and WILLIAMSON G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, **130**, 2073S–2085S.
- SCALBERT A., JOHNSON I.T. and SALTMARSH M. (2005).** Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 215S–217S.
- SCARPATI M. L. and LO SCALZO R. (1993).** A new secoiridoid from olive wastewaters. *J. Nat. Prod.*, **56**, 621–623.
- SCHENKEL-BRUNNER. (1995).** Cité par **OPREA-MITROFAN L.M. (2006).** Recherches de nouveaux marqueurs de mort programmée (apoptose) dans les membranes des hématies humaines sénescentes. Impact en transfusion sanguine. Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Technologie de Lille 1. France.
- SCOTT M.D., VAN DEN BERG J.J., REPKA T., ROUYER-FESSARD P., HEBBEL R.P. and BEUZARD Y. (1993).** Effect of excess alphahemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model betathalassemic erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, **91**, 706–17012.
- SEIFRIED H.E., ANDERSON D.E., FISHER E.I. and MILNER J.A. (2007).** A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.*, **18(9)**, 567–79.
- SENEVIRATHNE M., KIM S-H., SIRIWARDHANA N., HA J-H., LEE K-W. and JEON Y-J. (2006).** Antioxidant potential of *ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci. Tech. Int.*, **12(1)**, 27–38.
- SENTURK U.K., GUNDUZ F., KURU O., AKTEKIN M.R., KIPMEN D. YALCIN O., KUCUKATAY M.B., YESILKAYA A. and BASKURT O.K. (2001).** Exercise-induced

- oxidative stress affects erythrocyte in sedentary rats but not exercise-trained rats. *J. Appl. Physiol.*, **91**, 1999–2004.
- SERAFINI M. (2006)**. The role of antioxidants in disease prevention. *Medicine*, **34(12)**, 533–535.
- SERVAIS S. (2004)**. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : effets de l’âge et d’une supplémentation en oméga-3. Thèse de Doctorat. Université de Claude Bernard- Lyon 1. France.
- SERVILI M., BALDIOLI M., SELVAGGINI R., MACCHIONI A. and MONTEODORO GF. (1999)**. Phenolic compounds of olive fruit: one- and twodimensional nuclear magnetic resonance characterization of nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 12–18.
- SERVILI M., SELVAGGINI R., ESPOSTO S., TATICCHI A., MONTEODORO G.F. and MOROZZI G. (2004)**. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr. (A)*, **1054**, 113–127.
- SERVILI M., ESPOSTO S., FABIANI R., URBANI S., TATICCHI A., MARIUCCI F., SELVAGGINI R. and MONTEODORO G. F. (2009)**. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, **17**, 76–84.
- SHAHIDI F. and WANASUNDR A. P. D. (1992)**. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 67-103.
- SHARMA R. and PREMACHANDRA B.R. (1991)**. Membrane-bound hemoglobin as a marker of oxidative injury in adult and neonatal red blood cells, *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **46**, 33–44.
- SHIVA SHANKAR REDDY C.S., SUBRAMANYAM M.V.V., VANI R. and ASHA DEVI S. (2007)**. *In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes : effect of antioxidant supplements. *Toxicol. in Vitro*, **21**, 1355–1364.
- SICINSKA P., BUKOWSKA B., MICHALOWICZ J. and DUDA W. (2006)**. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. *Toxicon.*, **47**, 387–397.
- SIGNORELLI P. and GHIDONI R. (2005)**. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J. Nutr. Biochem.*, **16**, 449–466.
- SIGNORINI C., FERRALI M., CICCOLI L., SUGHERINI L., MAGNANI A. and COMPORTI M. (1995)**. Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. *FEBS Lett.*, **262**, 165–170.
- SILBERBERG M., MORAND C., MATHEVON T., BESSON C., MANACH C., SCALBERT A. and REMESY C. (2006)**. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur. J. Nutr.*, **45**, 88–96.
- SIMAO C.A., SUZUKAWA A.A., CASADO M.F., OLIVEIRA R.D., GUARNEIR F.A. and CECCHINI R. (2006)**. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,20-azobis (amidinopropane). *Life Sci.*, **78**, 1202–1210.
- SINGH I., MOK M., CHRISTENSEN A.M., TURNER A.H. and HAWLEY J.A. (2007)**. The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, in press.
- SINGH N. and RAJINI P.S. (2008)**. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chem-Biol. Interact.*, **173**, 97–104.
- SOARES J.R., DINS T.C.P., CUNHA A.P. and AMEIDA L.M. (1997)**. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Res.*, **26**, 469–478.

- SOARES A.F. (2005).** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponectine et prostaglandines. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France.
- SOLER-RIVAS C., GARCIA-ROSADO A., POLONIA I., JUNCA-BLANCH G., MARIN F.R. and WICHERS H.J. (2006).** Microbiological effects of olive mill waste addition to substrates for *Pleurotus pulmonarius* cultivation. *Int. Biodeter. Biodegr.*, **57**, 37–44.
- SONI M.G., BURDOCK G.A., CHRISTIAN M.S., BITLER C.M. and CREA R. (2006).** Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chem. Tox.*, **44**, 903–915.
- SORG O. (2004).** Oxidative stress : a theoretical model or a biological reality? *C. R. Biologies*, **327**, 649–662.
- SOUSA A., FERREIRA I.C. F. R., CALHELHA R., ANDRADE P.B., VALENTAO P., SEABRA R., ESTEVINHO L., BENTO A. and PEREIRA J.A. (2006).** Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives ‘alcaparra’. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 8533–8538.
- SOUSA A., FERREIRA I.C.F.R., BARROS L., BENTO A. and PEREIRA J.A. (2008).** Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives ‘alcaparras’. *LWT- Food Sci. Technol.*, **41**, 739–745.
- STADTMAN E.R. (1990).** Metal-ion catalysed oxidation of proteins : biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.*, **9** (4), 315–325.
- STOCLET J.C., CHATAIGNEAU T., NDIAYE M., OAK M.H., EL BEDOUI J., CHATAIGNEAU M. and SCHINI-KERTH V.B. (2004).** Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharmacol.*, **500**, 299–313.
- TAN H.W., TUCK K.L., STUPANS I. and HAYBALL P.J. (2003).** Simultaneous determination of oleuropein and hydroxytyrosol in rat plasma using liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. (B)*, **785**, 187–191.
- TANNER M.J.A. and BOXER D.H. (1972).** Separation and some properties of the major proteins of the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.*, **129**, 333–347.
- TAPIERO H., TEW K.D., NGUYEN BA G. and MATHE G. (2002).** Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies ? *Biomed. Pharmacother.*, **56**, 200–207.
- TASIOULA-MARGARI M. and OKOGERI O. (2001).** Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chem.*, **74**, 377–383.
- TEDESCO I., RUSSO G.L., NAZZARO F., RUSSO M. and PALUMBO R. (2001).** Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *J. Nutr. Biochem.*, **12**, 505–511.
- TERAO J., PISKULA M. and YAO Q. (1994).** Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 278–284.
- THANNICKAL V.J. and FANBURG B.L. (2000).** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **279**, L1005–L1028.
- THOMAS C.E., MCLEAN L.R., PARKER R.A. and OHLWEILER D.F. (1992).** Cité par SAIJA A., TROMBETTA D., TOMAINO A., CASCIO R.L., PRINCI P., UCCELLA N., BONINA F. and CASTELLI F. (1998). ‘In vitro’ evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int. J. Pharm.*, **166**, 123–133.
- TREUTTER D. (2006).** Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.*, **4**, 147–157.

- TRICHOPOULOU A., KATSOUYANNI K., STUVER S., TZALA L., GNARDELLIS C., RIMM E. and TRICHOPOULOS D. (1995).** Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**(2), 110–116.
- TRIPOLI E., GIAMMANCO M., TABACCHI G., DI MAJO D., GIAMMANCO S. and LA GUARDIA M. (2005).** The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.*, **18**, 98–112.
- TSAO R. and DENG Z. (2004).** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. (B)*, **812**, 85–99.
- TSIMIDOU M., PAPADOPOULOS G. and BOSKOU D. (1992).** Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chem.*, **44**, 53–60.
- TUBARO F., GHESELLI A., RAPUZZI P., MAIORINO M. and URSINI F. (1998).** Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biol. Med.*, **24**, 1228–1234.
- TUCK K.L. and HAYBALL P.J. (2002).** Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 636–644.
- UCCELLA N. (2001 a).** Olive biophenols: biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends Food Sci. Technol.*, **11**, 315–327.
- UCCELLA N. (2001 b).** Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trends Food Sci. Technol.*, **11**, 328–339.
- USAQUEN-CASTRO X., MARTINEZ-RUBIO M., AYA-BAQUERO H. and GONZALEZ-MARTINEZ G. (2006).** Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from red-grape (*Vitis vinifera*) residues. *IUFoST*, 1315- 1324.
- UYESAKA N., HASEGAWA S., ISHIOKA N., ISHIOKA R., SHIO H. and SCHECHTER A.N. (1992).** Effects of superoxide anions on red cell deformability and membrane proteins. *Biorheology*, **29**, 217–229.
- VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J., CRONIN M.T.D., MAZUR M. and TELSER J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell B*, **39**, 44–84.
- VAN DEN BERG J.J.M., DEN KAMP J.A.F.O.P., LUBIN B.H., ROELOFSEN B. and KUYPERS F.A. (1992).** Kinetics and site-specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **12**, 487–498. In **SINGH N. and RAJINI P.S. (2008).** Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chem-Biol. Interact.*, **173**, 97–104.
- VAN HEKKEN D. L. and THOMPSON M. P. (1991).** Application of phast system to the resolution of bovine milk proteins on urea-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1204-1210.
- VERSTRAETEN SV., KEEN CL., SCHMITZ HH., FRAGA CG. and OTEIZA PI. (2003).** Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 84–92.
- VILLEMUR P. et DOSBA F. (1997).** Oléiculture : évolution variétale et acquisition de la maîtrise des pratiques culturelles : Huile d'olive. *OCL*, **4** (5), 351-355.
- VINHA A.F., FERRERES F., SILVA B.M., VALENTAO P., GONCALVES A., PEREIRA J.A., OLIVEIRA M.B., SEABRA R.M. and ANDRADE P.B. (2005).** Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.*, **89**, 561–568.
- VISIOLI F. and GALLI C. (1994).** Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci.*, **55**, 1965–1971.

- VISIOLI F., BELLOMO G., MONTEODORO G.F. and GALLI C. (1995).** Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, **117**, 25-32.
- VISIOLI F. and GALLI C. (1995).** Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease: the potential role of olive oil and its minor constituents. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **5**, 306–314.
- VISIOLI F., BELLOMO G. and GALLI C. (1998).** Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **247**, 60–64.
- VISIOLI F., BELLOSTA S. and GALLI C. (1998).** Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.*, **62(6)**, 541–546.
- VISIOLI F. and GALLI C. (1998).** The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr. Rev.*, **56**, 142–147.
- VISIOLI F., CARUSO D., GALLI C., VIAPPANI S., GALLI G. and SALA A. (2000).** Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **278**, 797–799.
- VISIOLI F., GALLI C., PLASMATI E., VIAPPANI S., HERNANDEZ A., COLOMBO C. and SALA A. (2000).** Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking–induced oxidative stress. *Circulation*, **102**, 2169–2171.
- VISIOLI F., CARUSO D., GRANDE S., BOSISIO R., VILLA M., GALLI G., SIRTORI C. and GALLI C. (2005).** Virgin olive oil study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur. J. Nutr.*, **44**, 121–127.
- VLAHOV G. (1992).** Flavonoids in three olive (*Olea europea*) fruit varieties during maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **58**, 157–159.
- WANG J., MIYAZAWA T. and FUJIMOTO K. (1991).** Inhibition of methyl linoleate peroxidation by maize zein in powder model system at high water activity. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1531–1536.
- WANG H., GAO X.D., ZHOU G.C., CAI L. and YAO W.B. (2008).** *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chem.*, **106**, 888–895.
- WATERMAN E. and LOCKWOOD B. (2007).** Active Components and Clinical Applications of Olive Oil. *Altern. Med. Rev.*, **12(4)**, 331–342.
- WETTASINGHE M. and SHAHIDI F. (2000).** Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chem.*, **70**, 17–26.
- WILLIAMSON G. and MANACH C. (2005).** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 243S–255S.
- WINKELHAUSEN E., POSPIECH R. and LAUFENBERG G. (2005).** Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, **24(1)**, 41–46.
- WINYARD P.G., MOODY C.J. and JACOB C. (2005).** Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem. Sci.*, **30(8)**, 453–461.
- WIRTH D., CHRISTIANS E.S., DRION P.V., DESSY-DOIZE C. et GUSTIN P. (2003).** Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Ann. Méd. Vét.*, **147**, 127–144.
- WISEMAN H., KAUR H. and HALLIWELL B. (1995).** DNA damage and cancer : measurement and mechanism. *Cancer Lett.*, **93**, 113–120.
- WISEMAN H. and HALLIWELL B. (1996).** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, **313**, 17–29.

- WISEMAN S.A., TIJBURG L.B.M. and VAN DE PUT F.H.M.M. (2002). Olive oil phenolics protect LDL and spare vitamin E in the hamster. *Lipids*, **37**, 1053–1057.
- WLODEK L. and KUSIOR D. (2006). Oxidative hemolysis of erythrocytes. *BAMBED.*, **34** (6), 438–443.
- WOLLGAST J. and ANKLAM E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.*, **33**, 423–447.
- XIAO Z.P., SHI D.H., LI H.Q., ZHANG L.N., XU C. and ZHU H.L. (2007). Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorg. Med. Chem.*, 1–8.
- YANG D.P., KONG D.X. and ZHANG H.Y. (2007). Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chem.*, **104**, 1269–1271.
- YEN G-C., DUH P-D. and TSAI H-L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.*, **79**, 307–313.
- YIQIN L. and JUNFAN L. (2007). Erythrocyte membrane proteins and membrane skeleton. *Front. Biol. China*, **2**(3), 247–255.
- YOUSFI K., CERT R.M., JOSE M. and GARCIA J.M. (2006). Changes in quality and phenolic compounds of virgin olive oils during objectively described fruit maturation. *Eur. Food Res. Technol.*, **223**, 117–124.
- YRJÖNEN T. (2004). Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Thèse de Doctorat. Université d’Helsinki. Finlande.
- YU L., HALEY S., PERRET J., HARRIS M., WILSON J. and QIAN M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1619–24.
- YUAN X., WANG J., YAO H. and CHEN F. (2005). Free radical-scavenging capacity and inhibitory activity on rat erythrocyte hemolysis of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **38**, 877–883.
- ZAFRA A., JUAREZ M.J.B., BLANC R., NAVALON A. and GONZALEZ J., VILCHEZ J.L. (2006). Determination of polyphenolic compounds in wastewater olive oil by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*, **70**, 213–218.

Annexes

Annexe 1 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY et *al.* (1951)**1. Solutions :****Solutions alcalines A**

- Soude 0,1 N.....500 ml
- Carbonate de sodium anhydre (Na₂CO₃).....10 g

Solution cuivrique B

- CuSO₄, 5H₂O (0,32 g/ 100ml).....2 ml
- Tartrate double de Na et de K (1 g/100ml).....2 ml

Solution C

- Solution A50 ml
- Solution B.....1 ml

Solution mère de BSA

- BSA.....10 mg
- Eau distillée100 ml

Gamme étalon

A partir de la solution de BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous

Concentration en BSA µg/ml	0	10	25	50	75	100
Solution mère de BSA (µl)	0	100	250	500	750	1000
Eau distillée (µl)	1000	900	750	500	250	0

2. Méthode

- 1 ml d'échantillon contenant 100 µg de protéine maximum et 25 µg minimum
- ajouter 5 ml de solution C et mélanger ;
- laisser 10 min à température ambiante ;
- ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- laisser 30min à l'obscurité ;
- lire la DO à 750 nm.

3. Expression des résultats

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentration en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparée et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration de la protéine inconnue X est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

Annexe 2: Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native).**Solution d'acrylamide (A)**

Acrylamide.....	36 g
Bisacrylamide.....	1 g
Eau distillée.....	100 ml

Tampon de gel (B)

Tris.....	9,14 g
Eau distillé.....	100 ml

Ajuster à pH 8,9 avec de HCl 4N

Tampon d'électrode (pour une plaque)

Tris.....	0,12 g
Glycine.....	0,58 g
Eau distillé.....	200 ml

Ajuster à pH 8.3 avec du Tris

Tampon d'échantillon

Tampon du gel (B).....	100 µl
Eau distillée	700 µl
Glycérol 50%.....	200 µl
Bleu de Bromophénol.....	une tête d'aiguille

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 1 ml de ce tampon

Electrophorèse**Préparation du gel : T = 12% et C = 2,7% (pour une plaque)**

Solution (A)	3.25 ml
Solution (B)	5 ml
Eau distillée	1,68 ml

Dégazer le mélange (maximum 2 mn)

TEMED.....	10 µl
Solution de persulfate d'ammonium 10%.....	75 µl

Couler et mettre le peigne immédiatement

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 25 V

Fixation : 45min dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration

Annexe 3 : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)**Solution :****Solution d'acrylamide (A)**

Acrylamide.....	36 g
Bisacrylamide.....	1 g
Eau distillée.....	100 ml

Tampon de gel de séparation

Tris.....	18.15 g
Eau distillé.....	100 ml

Ajuster à pH 8.8 avec de HCl 4N

Tampon de gel de concentration

Tris.....	6 g
Eau distillé.....	100 ml

Ajuster à pH 6.8 avec de HCl 4N

Tampon d'électrode

Tris.....	1.2 g
Glycine.....	5,76 g
SDS.....	0,2 g
Eau distillée.....	200 ml

Ajuster à pH 8.3 avec du Tris

Tampon d'échantillon

Solution (C).....	500 µl
Eau distillé.....	250 µl
SDS (10%).....	250 µl
2-mercaptoéthanol.....	50 µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon

Chauffage à 100°C pendant 4 à 5 min puis refroidir dans un bain d'eau froide

Ajouter 200 µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques graines de bleu de bromophénol

Solution de fixation

TCA.....	12 g
Eau distillée (qsp).....	100 ml

Solution de coloration

Bleu de Coomassie R250.....	0.5 g
TCA.....	4 g
Méthanol.....	100 ml
Eau distillé.....	100 ml

Solution de décoloration

Acide acétique.....	37,5 ml
Eau distillée.....	312,5 ml
Méthanol.....	150 ml

Solution de persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium.....	0,1 g
Eau distillée (qsp).....	1 ml

Electrophorèse**Préparation du gel de séparation : T = 12 % et C = 2,7 % (pour une plaque)**

Solution (A).....	2,70 ml
Solution (S).....	2,51 ml
Eau distillée.....	2,73 ml

Dégazer pendant 2 min maximum

SDS 10%.....	100 µl
TEMED.....	13 µl
Persulfate d'ammonium 10%.....	75 µl

Couler à environ 1.5 cm du sommet de la plaque de moindre

Préparation du gel de concentration : T= 4,8 % et C = 2,7 % (pour une plaque)

Solution (A).....	650 µl
Solution (C).....	1,25 ml
Eau distillées.....	2,9 ml

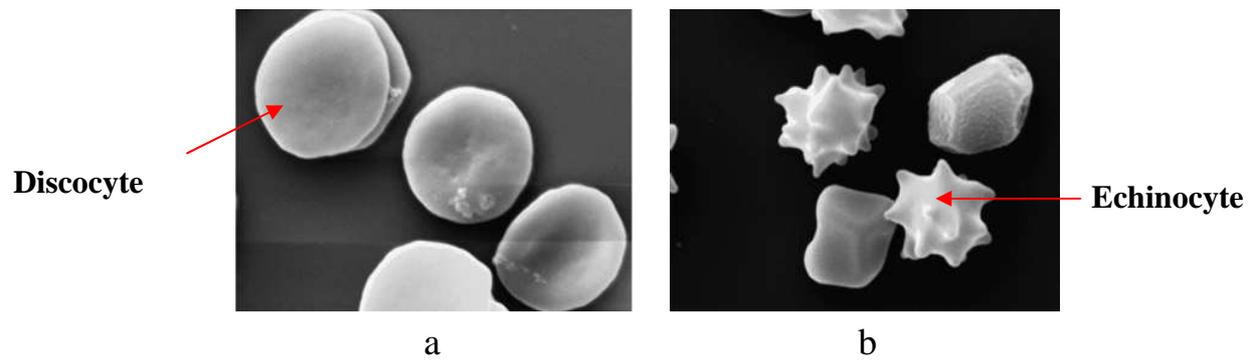
Dégazer quelques secondes

Solution de SDS à 10%.....	50 µl
TEMED.....	30 µl
Persulfate d'ammonium à 10%.....	100 µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl**Mise sous tension :** 20 mA, 25 V**Fixation :** 45 minutes dans la solution de fixation**Coloration :** 1 heure dans la solution de coloration**Décoloration :** dans la solution de décoloration

Annexe 4 :



Micrographie électronique (X 4000) d'érythrocytes normales (a) et d'érythrocytes traités par H_2O_2 (SINGH et RAJINI, 2008).