

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques
Département de Biologie



THESE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat
En Sciences biologiques
Option : Biologie et Physiologie Animale

Thème

**Effets des margines et de leur extrait phénolique sur les
dyslipidémies (étude *in vivo*) et sur l'activation plaquettaire.**

Présentée par : Mme MESSAOUDI DJAMILA

Soutenue publiquement le : 04 /03 /2020

Devant le jury :

Président	: Mr Ramdane MOUSSAOUI	Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
Directrice de thèse	: Mme Farida MOULTI-MATI	Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
Examineurs	: Mme Rosa BENABDESSALEM	Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
	Mme Habiba OUSSEDIK- OUMEHDI	Professeur à l'USTHB.
	Mme Hayat AMELLAL- CHIBANE	Professeur à l'Université de Bouverd.
	Mr Smain MEGATELI	Maitre de conférence classe A, à l'université Saad Dahlab-Blida1.

Remerciements

Mes premiers remerciements sont pour monsieur Abderrahmane MATI, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, et directeur du laboratoire de Biochimie Analytique et de biotechnologie (LABAB) pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire. Je le remercie pour son soutien, sa bonne humeur et sa gentillesse.

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

J'exprime également mes remerciements envers le Docteur BOUALLAGUI Z., pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, au niveau du centre de Recherche de biotechnologie de Sfax (CBS), en Tunisie. Je le remercie infiniment pour sa disponibilité et ses conseils précieux.

Mes remerciements également pour Docteur HENAB A., du laboratoire d'anatomie pathologie au niveau du CHU NEDIR MOHAMED de Tizi Ouzou et pour Docteur ZERRAR A., du laboratoire d'analyses médicales à Tizi Ouzou, pour leurs aides précieuses.

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

Le professeur MOUSSAOUI R., de l'université Mouloud Mammeri de Tizi- Ouzou, que je remercie pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Mme OUSSEDIK- OUMEHDI H., Professeur à l'USTHB pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Mme BENABDESSELAM R. Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour avoir aimablement accepté de juger mon travail.

Mme AMELLAL-CHIBANE H. Professeur à l'université M'Hamed Bougara de Boumerdes pour l'honneur qu'il me fait de faire partie du jury de ma thèse.

Mr MEGATELI S., Maitres de conférences classe A pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse

Je remercie tout le personnel de la faculté de médecine de Tizi Ouzou, pour leurs importantes aides qu'ils m'ont apportées tout au long de la réalisation de ce travail de thèse, à commencer par l'ancien doyen de la faculté le professeur AIT ALI H., Monsieur BOUALI A., KHENACHE M.A., Mme HARCHAOUI S. le Docteur SELLAH H., Mme HAMEG N., sans oublier ma meilleure amie Melle HELLAL N.

Je remercie toute l'équipe du LABAB également pour leur sympathie et leur agréable compagnie : Lamia, Samia CHABI, Dalila, Nassima, Chahra, Samia BIDOUHENE, Hassina, Assia, Lydia, Souad, Amel, Sarah, Rym et Samia DERMECHE.

Je remercie mes parents, mes frères et sœurs qui m'ont soutenu et encouragé pour aboutir à ce travail de thèse, un travail que je dédie à mes deux enfants rayane et Alycia et à la mémoire de mon grand-père MESSAOUDI Moussa.

**“Win yettruzun asallu, itedu aken yufa
mačči aken yebya”**

Mouloud MAMMERI

« Le pionnier en toute chose fait comme il peut pas comme il veut ».

Table des matières

Page

RESUME

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

GLOSSAIRE

LISTES DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE 01

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les lipides dans l'organisme	03
1.1. Les lipides dans l'organisme	03
1.2. Absorption des lipides	03
1.3. Métabolisme des lipoprotéines.....	04
1.4. Lipides et obésité.....	06
1.5. La stéatose hépatique et l'obésité.....	09
1.6. L'obésité expérimentale	10
II. Les margines	11
2.1. Production des margines et de l'huile d'olive.....	11
2.2. Les systèmes d'extraction d'huile d'olive.....	12
2.3. Composition des margines.....	13
2.3.1. Les glucides, les composés azotés et les vitamines.....	14
2.3.2. Les huiles et les acides organiques.....	14
2.3.3. Les composés phénoliques.....	14
2.3.3.1. Les monomères aromatiques.....	15
2.3.3.2. Les composés phénoliques à haut poids moléculaire.....	16
2.4. L'hydroxytyrosol.....	16
2.4.1. Formation de l'hydroxytyrosol.....	16
2.4.2. Effets biologiques de l'hydroxytyrosol.....	18
2.4.3. Biodisponibilité de l'hydroxytyrosol.....	19
2.4.3.1. Absorption.....	20
2.4.3.2. Distribution.....	20
2.4.4. Métabolisme.....	20
2.4.5. Elimination.....	21
2.4.6. Toxicité.....	22
III. Les plaquettes sanguines	23
3.1. Origine et structure	23
3.2. Intégrine α IIb β 3-Fibrinogène et activation plaquettaire	26

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale I : Caractérisation des margines	28
1. Matériel et méthodes	28
1.1. Les margines utilisées	28
1.2. Caractérisation des margines.....	28
1.2.1. Détermination de la teneur en matière sèche	28
1.2.2. Détermination de la teneur en matières grasses	29
1.2.3. Détermination de la teneur en azote total	29
1.2.4. Détermination de la teneur en glucides totaux	30
1.2.5. Extraction et détermination de la teneur en polyphénols	30
1.2.6. HPLC (« High-Performance Liquid Chromatography ») des margines brutes et de l'extrait phénolique	32
2. Résultats et discussion	33
2.1. Le pH	34
2.2. Teneur en matière sèche.....	34
2.3. Teneur en matière grasse	34
2.4. Teneur en glucides totaux	35
2.5. Teneur en protéines	35
2.6. Teneur en polyphénols	35
2.7. Résultats de l'analyse du profil chromatographique de l'extrait phénolique des margines	36
Partie expérimentale II : Effets des margines et des polyphénols extraits des margines sur les dyslipidémies	40
1. Effets des margines sur des paramètres métaboliques chez le rat Wistar soumis à régime cafeteria après 13 semaines de traitement.....	40
1.1. Matériel et méthodes	40
1.1.1. Choix des animaux	40
1.1.2. Les régimes alimentaires utilisés	42
1.1.3. Histologie	43
1.1.4. Analyse statistique.....	44
1.2. Résultats	44
1.2.1. Effets des margines sur le poids corporel	44
1.2.2. Effets des margines sur le bilan lipidique et sur la glycémie	45
1.2.3. Effets des margines sur quelques paramètres indicateurs des fonctions hépatique et rénale	47
1.2.4. Contrôle histologique	50
1.2.4.1. Contrôle hépatique	50
1.2.4.2. Contrôle rénal	52
2. Effets des margines et de l'extrait phénolique des margines sur des paramètres métaboliques chez le rat Wistar soumis à un régime cafeteria après 12 semaines de traitement.....	53
2.1. Matériel et méthodes.....	53
2.1.1. Préparation des animaux et administration des margines	53

2.1.2. Administration de l'extrait phénolique	53
2.2. Résultats	54
2.2.1. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur le poids corporel.....	54
2.2.2. Effets des margines et des polyphénols sur le bilan lipidique et sur la la glycémie	55
2.2.3. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur quelques paramètres indicateurs des fonctions hépatique et rénale.....	59
3. Effets des margines sur quelques paramètres sanguins chez le rat Wistar soumis à un régime cafeteria après 14 semaines de traitement.....	62
3.1. Matériel et méthodes.....	62
3.2. Résultats	62
4. Evaluer l'effet du régime cafeteria pendant 20 semaines sur la fonction hépatique.....	65
4.1. Matériel et méthodes.....	65
4.1.1. Animaux	65
4.1.2. Anesthésie, dissection et prélèvement sanguin chez le rat.....	65
4.2. Résultats	65
4.2.1. Poids des rats avant et à la fin de l'expérimentation.....	65
4.2.2. Effets du régime cafétéria sur le taux des transaminases.....	66
5. Résultats et discussion	67
Partie expérimentale III : Effets de l'extrait phénolique des margines sur l'activation plaquettaire	75
1. Matériel et méthodes	75
1.1. Isoler les plaquettes	75
1.2. Tests d'activation des plaquettes par un agoniste : l'épinéphrine (adrénaline).....	77
1.3. Caractérisation de l'extrait phénolique utilisé.....	78
1.4. Tester un extrait phénolique des margines sur l'activation plaquettaire induite par l'adrénaline	78
2. Résultats et discussion	78
2.1. Effets de l'adrénaline sur l'activation plaquettaire	78
2.2. Caractérisation de l'extrait phénolique utilisé	80
2.3. Effets de l'extrait phénolique des margines sur l'activation plaquettaire induite par l'adrénaline.....	81
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	86
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	88
ANNEXES	
ARTICLE	

RESUME

Les activités biologiques comme les effets hypolipidémique et hypoglycémique des composés phénoliques des margines ont été largement étudiées. Cependant, la bioactivité des margines brutes n'a pas encore été démontrée *in vivo*. Le présent travail a consisté dans un premier temps à évaluer l'effet de l'administration orale des margines et de leur extrait phénolique sur les troubles métaboliques induits par le régime alimentaire « le régime cafétéria » chez le rat. La deuxième partie de notre étude concerne l'éventuel effet toxique des margines sur les fonctions rénale et hépatique. Aussi, notre travail a consisté à tester l'extrait phénolique des margines sur l'activité plaquettaire et plus exactement sur l'agrégation des plaquettes causée par un agoniste qui est l'adrénaline, une étude réalisée *in vitro*. Nos résultats ont montré que pour une période de traitement de plusieurs semaines, le régime cafétéria induisait une augmentation continue du poids corporel associée à une perturbation des paramètres lipidiques plasmatiques. Les analyses biochimiques ont montré que ce régime a induit une augmentation significative des taux de glucose, des triglycérides et de cholestérol total par rapport aux individus témoins. L'incorporation des margines dans l'eau de boisson et l'administration par gavage de l'extrait phénolique n'ont pas eu d'effets significatifs sur le poids corporel. Les margines contrairement à l'extrait phénolique, ont induit une baisse significative du glucose ($P < 0,05$). Les margines et l'extrait phénolique ont induit une baisse significative des taux des triglycérides et de cholestérol total. Le taux des HDL-Cholestérol a augmenté significativement pour les margines ce qui n'est pas le cas pour l'extrait phénolique. Concernant l'étude de toxicité, l'analyse d'un certain nombre de paramètres sanguins indicateurs des deux fonctions hépatique et rénale nous montre que l'extrait phénolique et surtout les margines brutes n'ont pas d'effets toxiques. L'histologie hépatique chez les rats nourris au régime cafeteria a révélé la présence de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes. Dans les groupes supplémentés de margines, le tissu hépatique a montré une structure presque similaire au groupe témoin. Ces résultats suggèrent que les margines apportent de réels avantages pour la santé en modulant certains paramètres biologiques tels que les paramètres lipidiques et protègent les tissus et plus particulièrement le tissu hépatique. Nos résultats concernant l'effet de l'extrait phénolique sur l'agrégation plaquettaire n'étaient pas concluants car l'effet inhibiteur rapporté par la bibliographie n'a pas été observé.

Mots clé : Régime Cafétéria. Rats Wistar. Margines. Extrait phénolique. Paramètres sanguins. Plaquettes sanguines.

SUMMARY

Biological activities such as hypolipidemic and hypoglycemic effects of phenolic compounds of olive mill wastewater (OMWW) have been broadly studied. However, the bioactivity of raw OMWW has not been demonstrated *in vivo* so far. First of all, this present work consists of evaluating the effect of oral administration of OMWW and its phenolic extract on the metabolic disorders induced by the "cafeteria diet" in the rat. The second part of our study concerns the possible toxic effect of OMWW on renal and hepatic function. Our *in vitro* work also consists of testing the phenolic extract on the platelet activity and specifically on the platelet aggregation caused by an agonist called adrenaline. The results showed that for a several weeks treatment period, cafeteria diet leads to a continuous increase in body weight associated with disruption in plasma lipid parameters. Biochemical analyzes showed that this diet conducts to a significant increase in glucose, triglyceride and total cholesterol levels compared with control individuals. Incorporation of OMWW into drinking water and oral administration of the phenolic extract did not have a significant effect on body weight. Unlike OMWW the phenolic extract, induced a significant decrease in glucose level ($P < 0.05$). OMWW and phenolic extract induced a significant decrease in triglyceride and total cholesterol levels. The level of HDL-cholesterol has increased significantly by OMWW, which is not the case of the phenolic extract. Regarding the toxicity study, the analysis of a number of indicator blood parameters of both hepatic and renal functions shows that the phenolic extract and especially the raw OMWW have no toxic effects. Hepatic histology in cafeteria-fed rats revealed the presence of lipid vacuoles in the cytoplasm of hepatocytes. In groups supplemented with OMWW, the liver tissue showed an almost similar structure with the control group. These results suggest that OMWW provide real health benefits by modulating some biological parameters such as lipid parameters and protect the tissues and more particularly the liver tissue. Our results regarding the effect of phenolic extract on platelet aggregation were inconclusive because the reported inhibitory effect in the literature was not observed.

Key words: Cafeteria diet. Rats Wistar. OMWW. Phenolic extract. Blood parameters. Platelets

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

AG	acides gras
apoB	apolipoprotéine
AVC	accidents vasculaires cérébraux
CCMH	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CETP	« Cholesteryl Ester Transfer Protein »
CHC	carcinome hépatocellulaire
C.O.I.	Conseil Oléicole International
DL50	une dose létale médiane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRDPA	Direction de la régulation de la production agricole
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA)
FAO	“Food and Agriculture Organization of the United Nations”
Fg	Fibrinogène
FW	Facteur de Von Willebrand
GLUT 2	perméase au glucose
HE	hématoxyline-éosine
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	“High-Performance Liquid Chromatography”
HT	hydroxytyrosol
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée
Kcal	Kilo Calorie
LCAT	“Lecithin Cholesterol Acyl Transferase”
LP	lipoprotéine
LRP	« LDL-Receptor Related Protein »
LRT	lipoprotéines riches en triglycérides
MTP	« Microsomal Tranfer Protein »
NAFLD	« Non Alcoholic Fatty Liver Disease » la stéatose hépatique non alcoolique
NASH	« non- alcoholic steatohepatitis »
NFS	numération formule sanguine
PDGF	“platelet derived growth factor”
PF4	“platelet factor 4”
PLTP	« Phospholipid Transfer Protein”
Ppt	polyphénols totaux
PRP	plasma riche en plaquettes
RC	régime cafeteria
RCM	Rats cafeteria traités avec les margines
RCP	Rats cafeteria traités avec l’extrait phénolique
RCT	Rats cafeteria témoins
RN	Rats normaux
SCO	système caniculaire ouvert
SGLT-1	« Symporter glucose/Sodium -1”, Co- trasporteur glucose /Sodium
SR-B1	“Scavenger Receptor class B type1”
SREBP-1c / FAS	« Sterol regulatory element-binding proteins 1c / Fatty acid synthase”
STD	système tubulaire dense
T	Tyrosol
TA	tissu adipeux
TG	triglycérides
TCMH	Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
TGO	glutamyl-oxaloacétate-transférase
TGP	glutamyl-pyruvate-transaminase
TxA2	Thromboxane A2
VGM	volume globulaire moyen
VPM	volume Plaquettaire Moyen.

GLOSSAIRE

Dyslipidémie : une dyslipidémie se définit par une élévation du cholestérol plasmatique, des triglycérides (TG) ou par un taux de cholestérol HDL bas, anomalies contribuant à l'apparition de plusieurs pathologies telle que l'athérosclérose.

Créatinine : la créatinine est un déchet provenant de la dégradation d'une substance présente dans les muscles et jouant un rôle dans la contraction musculaire : la créatine. La créatinine est ensuite éliminée dans les urines par filtration au niveau des reins. Dans certains cas, la capacité des reins à éliminer les déchets tels que la créatinine peut diminuer : on parle d'insuffisance rénale. Les déchets s'accumulent alors dans le sang et le résultat du dosage de la créatinine augmente.

Urée : L'urée représente environ 90 % de l'azote urinaire total chez l'adulte. Elle est produite en grande partie par le foie et une faible partie par les reins. Le taux d'urée dépend à la fois de la fonction rénale, des apports alimentaires protéiques, de la destruction des protéines de l'organisme, de l'âge et de l'état d'hydratation de la personne. Le dosage de l'urée est prescrit pour évaluer la fonction rénale et notamment lorsqu'une insuffisance rénale est suspectée.

Acide urique : l'acide urique est un déchet de l'organisme. Plus précisément, il est le produit final de la dégradation de molécules appelées les acides nucléiques et les purines. Ces dernières se retrouvent notamment dans l'alimentation. Un dosage sanguin (on parle d'uricémie) et/ou un dosage urinaire de l'acide urique sert à évaluer le bon fonctionnement des reins.

Bilirubine totale : La bilirubine est un pigment de couleur jaune, issu de la dégradation de l'hémoglobine. Elle est le principal colorant de la bile. Elle est produite dans les cellules de la rate et de la moelle osseuse, et est ensuite transportée dans la circulation sanguine par l'albumine pour rejoindre le foie. Une fois présente dans le foie, elle est conjuguée à l'acide gluconique et devient soluble dans l'eau. Dans les intestins, la bilirubine conjuguée donne la couleur. Une analyse sanguine de la bilirubine révèle des affections hépatiques.

Transaminases : les transaminases sont des enzymes présentes à l'intérieur des cellules, en particulier au niveau du foie et des muscles. Elles interviennent dans une multitude de réactions biologiques. On distingue deux types de transaminases: les ASAT (aspartate aminotransférases), surtout présente dans le foie, les muscles, le cœur, les reins, le cerveau et le pancréas. Les ALAT (alanine aminotransférases), relativement spécifiques du foie. Le dosage de ces enzymes est utilisé pour détecter un problème au niveau du foie : leur augmentation dans le sang est due à une libération anormale par des cellules hépatiques endommagées, par exemple en raison d'une hépatite, d'une intoxication alcoolique ou médicamenteuse, etc.

Les protéines totales : l'albumine produite par le foie et les globulines, principalement les anticorps (gammaglobulines) sont les principales fractions de protéines retrouvées dans le sang. Le taux de protéines totales dans le sang fournit une indication générale concernant l'état d'hydratation, le statut nutritionnel ou encore le bon fonctionnement de certains organes importants comme le foie, les reins ou la moelle osseuse.

La NFS : numération- formula- sanguine, est utilisée comme test général de dépistage pour déterminer un état de santé général, il consiste à rechercher des troubles tels que l'anémie, l'infection, ou de nombreuses autres maladies. Il s'agit en fait d'un ensemble de tests qui analyse les différents composants du sang et comprend les éléments suivants :

- **La numération des globules rouges (GR):** c'est la détermination du nombre réel de globules rouges par volume de sang. L'augmentation et la diminution de ce paramètre peuvent signaler des conditions anormales.

- **La mesure de l'hémoglobine** détermine la quantité de protéines de transport d'oxygène dans le sang.

- **L'hématocrite** mesure le volume occupé par les globules rouges dans le sang. Il est rendu en pourcentage (0 à 100) ou en proportion (0 à 1).

- **Le volume moyen plaquettaire (VMP)** est un paramètre calculé reflétant le volume moyen de vos plaquettes. Les plaquettes jeunes sont plus grosses, et une augmentation du VMP se produit lorsque qu'il y a l'augmentation du nombre de plaquettes produites. Le VMP informe votre médecin sur la production de plaquettes dans votre moelle osseuse.

- **Le volume globulaire moyen (VGM)** est une mesure du volume moyen de vos globules rouges. Le VGM est élevé lorsque vos globules rouges sont plus grands (macrocytaires) que la normale, par exemple dans l'anémie causée par une carence en vitamine B12. Lorsque le VGM est diminué, vos globules rouges sont plus petits (microcytaires) que la normale, comme par exemple en cas de carence en fer ou de thalassémie.

- **La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)** est un calcul de la quantité d'hémoglobine dans vos globules rouges. Comme les globules rouges macrocytaires sont plus volumineux que les GR normaux ou microcytaires, ils ont également tendance à avoir des valeurs plus élevées de TCMH.

- **La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)** est un calcul de la concentration en hémoglobine dans les globules rouges. La diminution de la CCMH (hypochromie) est observée dans des conditions où le taux d'hémoglobine est anormalement bas dans globules rouges, comme dans l'anémie ferriprive et la thalassémie.

Athérotrombose : l'athérotrombose est une maladie qui touche les artères. Lorsque ces dernières présentent des dépôts de graisse sous forme de plaques, il arrive qu'un caillot (bouchon fait de plaquettes sanguines) se forme sur une de ces plaques. On appelle ce bouchon un thrombus. Ce bouchon diminue ou bloque totalement le flux de sang et d'oxygène dans ces vaisseaux, entraînant un manque d'oxygénation des cellules en aval: on parle d'ischémie . Celle-ci peut entraîner la mort de cellules, c'est alors l'infarctus, qui peut survenir à différents endroits dans l'organisme.

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1. Les grandes étapes de l'absorption des lipides alimentaires par les entérocytes (BEASLAS et <i>al.</i> , 2012)	04
Figure 2. Métabolisme des lipoprotéines chez l'Homme (VERGES, 2007)	06
Figure 3. Dépôts ectopiques de tissu adipeux et liens avec les différentes pathologies (FAUCHER et POITOU, 2015)	08
Figure 4. Production des margines par les pays producteurs d'huile d'olive (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012)	11
Figure 5. Structures des polyphénols majeurs des margines	15
Figure 6. L'oleuropéine et ses dérivés après hydrolyse enzymatique par la β -glucosidase et l'estérase (KHOUFI et <i>al.</i> , 2011)	17
Figure 7. Effets biologiques de l'Hydroxytyrosol (ROBLES-ALMAZAN et <i>al.</i> , 2017)	19
Figure 8. Les différentes voies du métabolisme de l'hydroxytyrosol <i>in vivo</i> (TRIPOLI et <i>al.</i> , 2005)	21
Figure 9. Ultratructure d'une plaquette en microscopie électronique (STEVENS et LOWE, 1997)	23
Figure 10. Changement de forme des plaquettes lors de leur activation (WANG et <i>al.</i> , 2012)	25
Figure 11. : Structure et activation de l'intégrine α IIB β 3 (YUAN et <i>al.</i> , 2006; ANONYME 1 : BRYCKAERT, 2013)	27
Figure 12. Les différentes étapes de l'extraction des polyphénols totaux	31
Figure 13. Chromatogramme HPLC à 280 nm de l'extrait phénolique	37
Figure 14. HPLC à 280 nm des margines brutes	37
Figure 15. Disposition des rats dans les cages	40
Figure 16. Rat en surpoids à droite (régime cafétéria), rat avec un poids normal à gauche (régime standard)	42
Figure 17. Produits alimentaires locaux constituant le régime cafeteria	43

Figure 18. Effets des margines sur le poids corporel après 13 semaines de traitement.	45
Figure 19. Effets des margines sur le bilan lipidique et sur la glycémie après 13 semaines de traitement.	47
Figure 20. Effets des margines sur quelques paramètres indicateurs des deux fonctions hépatique et rénale après 13 semaines de traitement avec les margines.	49
Figure 21. Coupes histologiques du foie de différents groupes d'animaux	51
Figure 22. Coupes histologiques des reins de différents groupes d'animaux.	52
Figure 23. Effet des margines sur le poids corporel après 12 semaines de traitement	54
Figure 24. Effet de l'extrait phénolique sur le poids corporel après 12 semaines de traitement.	55
Figure 25. Effets des margines sur le bilan lipidique et sur la glycémie après 12 semaines de traitement	57
Figure 26. Effets de l'extrait phénolique sur le bilan lipidique et sur la glycémie après 12 semaines de traitement	58
Figure 27. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur les paramètres sanguins indicateurs des fonctions hépatique et rénale après 12 semaines de traitement.	61
Figure 28. Effets des margines sur quelques paramètres sanguins après 14 semaines de traitement.	64
Figure 29. Effet du régime cafeteria sur le poids corporel après 20 semaines de traitement.	66
Figure 30. Taux des transaminases (TGO et TGP) après 20 semaines de régime cafeteria	66
Figure 31. Diagramme résumant les étapes d'isolement des plaquettes à partir de sang humain	76
Figure 32. : HPLC à 280 nm de l'extrait phénolique des margines testé sur les plaquettes.	80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Valeurs des minéraux et métaux lourds déterminées sur les margines issues des deux systèmes d'extraction de l'huile d'olive (C.O.I. 2008)	13
Tableau II. Concentration de l'Hydroxytyrosol dans différents produits (selon ROBLES-ALMAZAN et <i>al.</i> , 2017)	17
Tableau III. Principaux récepteurs d'adhésion présents à la surface de la plaquette et leurs ligands respectifs (BROOS et <i>al.</i> , 2011 ; WANG et <i>al.</i> , 2012)	24
Tableau IV. Variations des gradients de concentration des deux phases mobiles pendant le cycle d'analyse de 50 minutes	33
Tableau V. Caractérisation des margines provenant d'une huilerie moderne (le système de centrifugation à trois phases)	33
Tableau VI. Concentration des composés phénoliques identifiés dans l'extrait phénolique des margines (SENANI-OUJARBI et <i>al.</i> , 2018).	38
Tableau VII. Comparaison entre les deux régimes alimentaires (standard et cafeteria)	43
Tableau VIII. Effets du régime cafeteria sur le poids corporel , les dyslipidémie et la glycémie	67
Tableau IX. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur le poids corporel, les dyslipidémies et la glycémie.	68
Tableau X. Effets du régime cafeteria sur les paramètres indicateurs des fonctions hépatique et rénale.	71
Tableau XI. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur les paramètres indicateurs des fonctions hépatique et rénale.	72
Tableau XII. Effets des margines sur quelques paramètres sanguins.	73
Tableau XIII. Effet de l'adrénaline sur l'activation plaquettaire (Test 1)	78
Tableau XIV. Effet de l'adrénaline sur l'activation plaquettaire (Test 2)	79
Tableau XV. Effets de l'extrait phénolique sur l'activation plaquettaire (Test 3)	81
Tableau XVI. Effet de l'extrait phénolique sur l'activation plaquettaire (Test 4)	81
Tableau XVII. Effets de l'adrénaline et de l'extrait phénolique sur l'activation des plaquettes	82

Les dyslipidémies qui caractérisent plusieurs pathologies telles que l'obésité et le syndrome métabolique se sont accentuées ces dernières années avec le développement de l'industrie alimentaire, de la technologie ...etc. Ainsi, les recherches médicales contre les effets dévastateurs de ces troubles métaboliques ne cessent de proposer de nouvelles approches thérapeutiques et surtout médicamenteuses. Ces dernières, ont prouvé leurs efficacités malgré leurs nombreux effets secondaires (GATTA-CHERIFI, 2016). Cependant l'utilisation des molécules naturelles représente une priorité majeure dans les recherches médicales. Les polyphénols sont connus depuis longtemps comme antioxydants à plusieurs effets thérapeutiques. Leur utilisation contre les troubles métaboliques de l'obésité comme les dyslipidémies et l'hyperglycémie a été le centre d'intérêt de plusieurs recherches (LEE *et al*, 2008 ; BASU *et al*, 2009 ; UCHIYAMA *et al*, 2011 ; LECERF 2012).

Le régime méditerranéen est connu depuis longtemps pour ses effets bénéfiques sur la santé et sur la longévité grâce aux différents polyphénols apportés notamment par le vin rouge et l'huile d'olive. L'extraction de l'huile d'olive souvent produit 20 % d'huile, 30 % de grignons et 50 % de margines (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2006). L'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'oleuropéine sont les majeurs composants phénoliques des produits de l'olivier (olive, huile, margines, grignons et feuilles) et leur rôle contre les dyslipidémies a été intensément exploité ces dernières années (JEMAI *et al.*, 2008a ,2008b ; FKI *et al.*, 2005, 2007) .

Le coefficient de partition (huile/eau) de la majorité des phénols de l'olive est en faveur de la phase aqueuse, il est de 6×10^{-4} à 1,5. L'olive est très riche en composants phénoliques, mais uniquement 1 à 2 % de la totalité des phénols passe dans l'huile, cependant la majorité se trouve dans les margines (environ 53 %) et dans les grignons (environ 45 %) (RODIS *et al.*, 2002). Cette richesse en polyphénols des sous-produits oléicoles comme les margines peut être exploitée à des fins thérapeutiques sans recours aux méthodes onéreuses d'extractions de ces molécules, sachant que l'utilisation des margines *in vivo* chez certaines espèces est très rare et ou seules quelques travaux ont été rapportés dans la littérature (ANONYME 3), en effet, l'utilisation des sous-produits de l'olivier *in vivo* et surtout les grignons s'est limitée à leur incorporation dans l'alimentation du bétail (MOLINA et AGUILLERA, 1991; MARTIN-GARCIA *et al.*, 2003; ZAIDI *et al.*, 2009).

La valorisation de ces déchets oléicoles *in vivo* en les utilisant directement à l'état brute, notamment si leur effet toxique sur l'organisme est insignifiant est le but de notre étude qui se résume en ces points :

- simuler une obésité chez le rats Wistar en optant pour le régime « cafeteria », un régime inducteur de troubles métaboliques (dyslipidémie et hyperglycémie) ;
- administration orale des margines et de l'extrait phénolique des margines et observer leurs effets sur les troubles métaboliques induits par le régime cafeteria ;
- évaluer les éventuels effets toxiques des margines et de l'extrait phénolique en examinant différents paramètres sanguins (Créatinine, Urée, acide urique, bilirubine totale, transaminases et les protéines totales) indicateurs des fonctions hépatique et rénale et aussi d'autres paramètres sanguins (le nombre de globule rouges, l'hématocrite, le volume globulaire moyen (VGM), le taux d'hémoglobine, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et le volume plaquettaire moyen (VPM)) ;
- contrôles histologiques du foie et des reins, études complémentaires aux précédentes.

En plus des dyslipidémies, l'hyperactivation plaquettaire tient également un rôle prépondérant dans les pathologies cardiovasculaires (FITZGERALD, 1997) et plus particulièrement dans l'athérotrombose. Cette dernière est très fréquente, affectant l'ensemble du réseau artériel (cérébral, coronarien et périphérique) dont les risques de morbidité et de mortalité sont élevés. Cette pathologie est caractérisée par une rupture de la plaque atherosclérotique soudaine, imprévisible, entraînant une activation plaquettaire et une formation de thrombus (caillot sanguin). Plusieurs agents antiplaquettaires sont utilisés pour prévenir l'occlusion des vaisseaux et inhiber la progression de cette maladie *via* la diminution de la production de facteurs plaquettaires pro-athérogéniques (ENNOURI, 2010). Les polyphénols peuvent en faire partie de cette classe d'agents antiplaquettaires. En effet, plusieurs travaux soulignent les effets inhibiteurs des polyphénols en général (BONECHI et *al.*, 2016) et plus particulièrement ceux de l'olivier sur l'agrégation des plaquettes sanguines (DELL'AGLI et *al.*, 2008; GONZALEZ-CORREA et *al.*, 2009; PETRONI et *al.*, 1995) et c'est dans ce contexte que nous avons entrepris des expérimentations sur cet élément figuré du sang. En effet nous avons testé *in vitro* une simple et nouvelle approche pour révéler une agrégation plaquettaire et nous l'avons utilisé pour tester les effets de l'extrait phénolique à partir des margines sur l'activation plaquettaire.

I. Les lipides dans l'organisme

1.1. Les lipides dans l'organisme

Les lipides dans l'organisme sont sous forme d'acides gras (AG), de triglycérides (TG), des phospholipides et du cholestérol. Ces lipides sont transportés dans le secteur vasculaire sous forme de lipoprotéines (LP). Les TG constituent l'essentiel des réserves énergétiques de l'organisme : plus de 10 kg chez un adulte, soit environ 100 000 Kcal localisées principalement dans le tissu adipeux (TA). Leur hydrolyse fournit des AG véhiculés par l'albumine qui sont utilisables pour la synthèse d'ATP par tous les tissus non strictement glucodépendants. La mobilisation des AG à partir du TA est contrôlée par le glucagon et les catécholamines qui la stimulent, et par l'insuline qui l'inhibe (LECERF, 2008).

La double couche de phospholipides et de protéines composants la membrane cellulaire est un des éléments variables qui modulent les propriétés des membranes. Les phospholipides dont la nature est remodelée en fonction des apports alimentaires en AG, notamment en fonction de la part des oméga 6 et des oméga 3, participent aux mouvements trans- et intramembranaires, contribuent à l'identité antigénique cellulaire et favorisent la formation de vésicules de transport. La fluidité membranaire est proportionnelle au degré d'insaturation, la rigidité est liée à la teneur en sphingomyéline alors que le cholestérol joue un rôle tampon et d'équilibre entre fluidité et rigidité (KARLESKIND et WOLFF, 1992).

Les lipides ont un rôle de médiateur et agissent comme des molécules d'information à l'intérieur même de la cellule où ils naissent, et autour d'elle sur un mode paracrine et endocrine. Ils activent de nombreuses voies de signalisation cellulaire et modulent directement ou indirectement de nombreux gènes. Ainsi, les eicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique sous l'effet d'une lipo-oxygénase et d'une cyclo-oxygénase, sont à l'origine de prostacyclines, de leucotriènes et de thromboxanes qui interviennent sur les voies de l'inflammation et de la thrombose. Les stérols sont à l'origine des hormones stéroïdes surrénaliennes, gonadiques et de la vitamine D. Ces médiateurs agissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (KARLESKIND et WOLFF, 1992).

1.2. Absorption des lipides

Les lipides alimentaires qui sont principalement des TG sont brassés dans le chyme gastrique avant de parvenir dans le duodénum où ils sont émulsifiés par les sels biliaires et hydrolysés par les enzymes pancréatiques. Les produits de la digestion (monoglycérides, AG, cholestérol,

phospholipides) sont absorbés par les entérocytes où ils sont synthétisés en TG, phospholipides et en cholestérol estérifié. Les chylomicrons produits par les entérocytes, dont le cœur est constitué par des TG (85-90 %) et un peu d'esters de cholestérol, et dont la couche périphérique contient des phospholipides, du cholestérol libre et des apoprotéines (apoB48), sont de grosses molécules drainées par les lymphatiques avant d'être déversés dans le sang veineux (Figure 1). L'association des composants lipidiques (triglycérides, esters de cholestérol, phospholipides) à l'apoB48 est réalisée par la MTP (« Microsomal Transfer Protein ») (BEASLAS et *al.*, 2012).

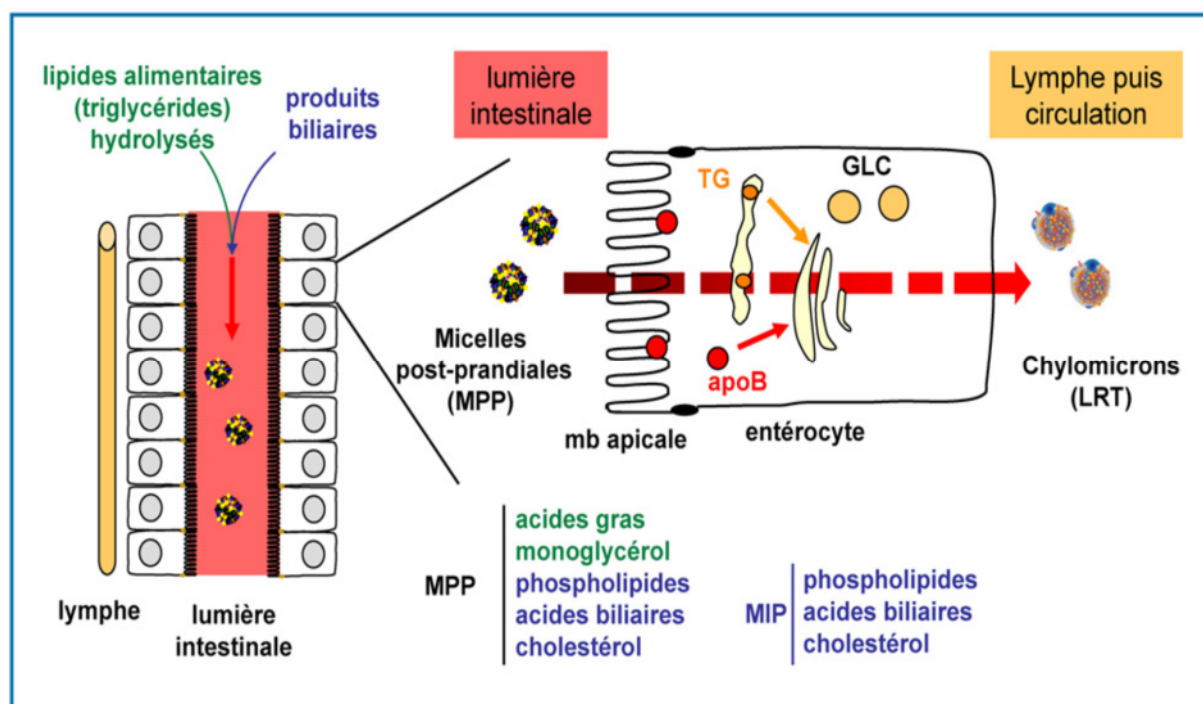


Figure 1. Les grandes étapes de l'absorption des lipides alimentaires par les entérocytes (BEASLAS et *al.*, 2012). Les lipides alimentaires solubilisés en micelles par les sels biliaires sont dégradés par les enzymes pancréatiques. Après leur diffusion à travers la membrane apicale des entérocytes, ils sont reconstitués en lipides complexes pour être intégrés dans de grosses lipoprotéines, les chylomicrons. Ces derniers gagnent le sang après avoir emprunté les chylifères. apoB: apolipoprotéine B. TG: triglycérides, LRT: lipoprotéines riches en TG, GLC: gouttelettes lipidiques cytosoliques, mb: membrane, MIP: micelles interprandiales, MPP: micelles post-prandiales.

1.3. Métabolisme des lipoprotéines

Dans le plasma, les triglycérides des chylomicrons sont rapidement hydrolysés sous l'effet d'une enzyme, la lipoprotéine lipase, donnant naissance à des particules résiduelles appauvries en triglycérides et enrichies en cholestérol appelées chylomicrons remnants (Figure 2). Ces dernières sont captées par le foie principalement à l'aide du récepteur LRP (« LDL-Receptor

Related Protein »). Les AG libérés sont utilisés comme substrat énergétique par les cellules musculaires et pour la synthèse des TG par les cellules adipeuses. Au niveau du foie, les AG et le cholestérol sont utilisés pour re synthétiser des lipoprotéines de type VLDL (55 à 65 % de TG) avec l'apoB-100 comme charpente. Dans la circulation, les triglycérides des VLDL sont hydrolysés sous l'action de la lipoprotéine lipase. Au cours de cette hydrolyse progressive, une partie de la surface des VLDL (comprenant des phospholipides et des apolipoprotéines C et E) est transférée aux HDL. Cette cascade métabolique donne naissance aux IDL, lipoprotéines de plus petite taille et moins riches en triglycérides. Ces dernières vont soit être captées par le foie par l'intermédiaire des récepteurs B/E, voire des récepteurs LRP, soit subir la poursuite de l'hydrolyse (lipase hépatique) des triglycérides aboutissant ainsi à la formation des LDL (65 à 70 % du cholestérol). La fixation des LDL se fait par l'intermédiaire de l'apolipoprotéine B-100, sur des récepteurs B/E spécifiques localisés sur les hépatocytes (70 %) et sur les autres cellules de l'organisme (30 %). Les HDL sont secrétées par le foie sous forme de particules discoïdales (HDL naissantes), pauvres en cholestérol. Dans la circulation les HDL reçoivent des apolipoprotéines (A, C et E) et des phospholipides issus de l'hydrolyse des chylomicrons et des VLDL. Les HDL vont capter du cholestérol libre au niveau des différentes cellules de l'organisme. Le transfert du cholestérol intracellulaire vers les particules HDL fait intervenir un transporteur spécifique ABCA1 (ATP binding cassette transporteur A1). Les particules HDL en se chargeant en cholestérol vont ainsi progressivement augmenter de taille donnant naissance aux HDL3, puis au HDL2 (HDL de grande taille). Au sein des HDL, la LCAT (Lecithin Cholesterol Acyl Transferase) transforme le cholestérol libre en cholestérol estérifié qui migre au centre de la lipoprotéine. Les HDL2 chargées en cholestérol estérifié vont être captées au niveau du foie par l'intermédiaire d'un récepteur SR-B1 (« Scavenger Receptor, class B type1 »).

Le métabolisme des lipoprotéines est sous l'influence de protéines de transfert des lipides telles que la CETP (« Cholesteryl Ester Transfer Protein ») et la PLTP (« Phospholipid Transfer Protein »). La CETP facilite le transfert des triglycérides des VLDL vers les LDL et HDL, et celui du cholestérol estérifié des HDL et LDL vers les VLDL. La PLTP favorise les transferts de phospholipides mais aussi du cholestérol libre et de l' α -tocophérol entre les lipoprotéines. La PLTP intervient également dans la détermination de la taille des particules HDL (VERGES, 2007).

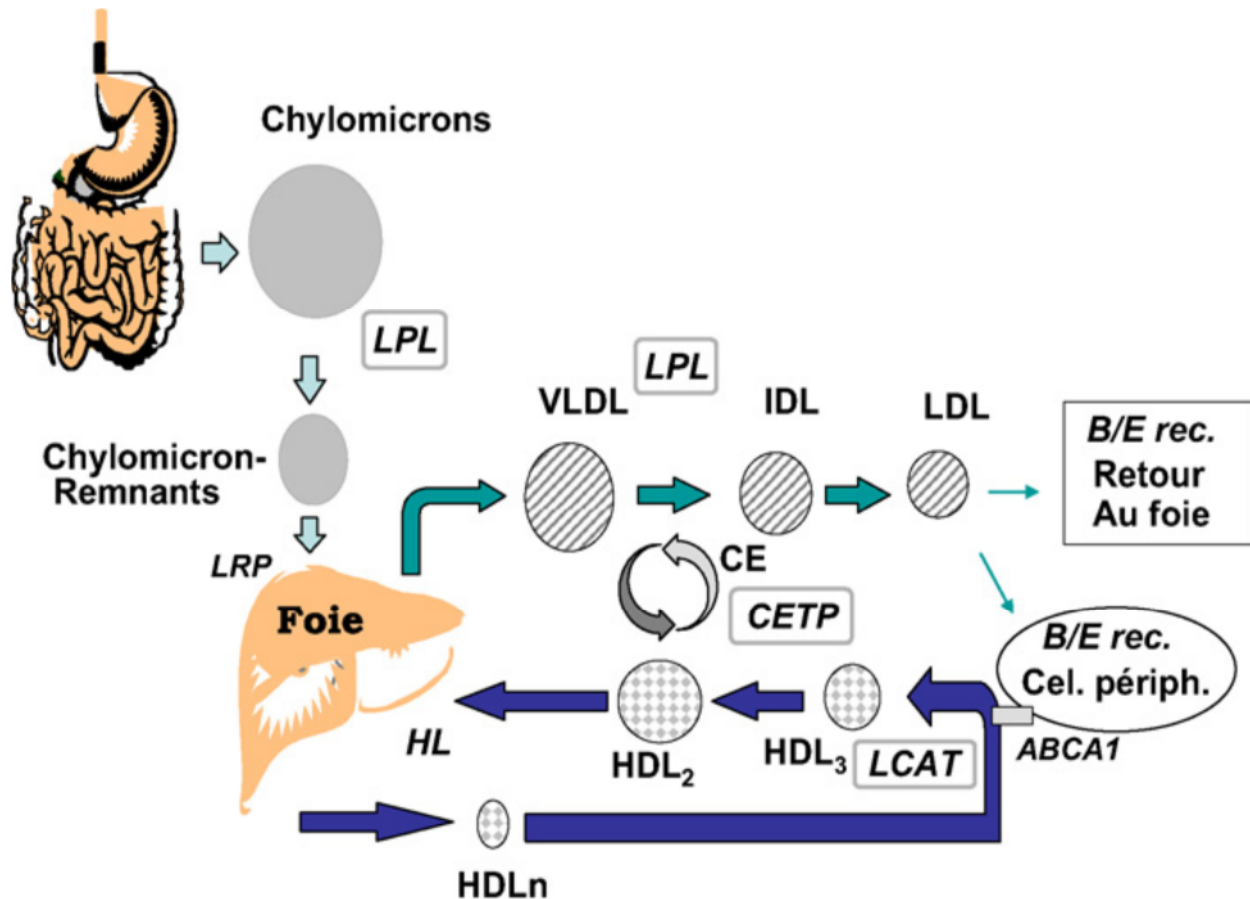


Figure 2. Métabolisme des lipoprotéines chez l'Homme (VERGES, 2007). VLDL: « Very Low Density Lipoprotein »; IDL: « Intermediate Density Lipoprotein », LDL: « Low Density Lipoprotein »; HDL: « High Density Lipoprotein »; LPL: lipoprotéine lipase; HL: hépatique lipase; CETP: « Cholesteryl ester Transfer protein »; LCAT: « lecithin-cholesterol acyl transferase »; AGL: acides gras libres; LRP: « LDL-receptor related protein »; B/E rec.: récepteur B/E (LDL récepteur); ABCA1: « ATP binding cassette transporteur A1 ».

1.4. Lipides et obésité

L'obésité est un problème majeur de santé publique de par sa fréquence et ses complications. Les lipides par rapport aux glucides contribuent fortement à positiver la balance énergétique et ainsi favoriser la lipogenèse. En effet, les lipides ne contribuent que pour 37 à 39 % aux apports énergétiques (contre 45 à 55 % pour les glucides) bien qu'ils fournissent, au gramme, plus de calories que les glucides (9 VS 4). Aussi la forme de stockage de l'énergie chez les mammifères se fait quasi exclusivement sous forme de triglycérides au niveau du tissu adipeux et ceci de façon expansible (plus de 100 000 kcal). Les voies métaboliques que les lipides empruntent sont davantage orientées vers le stockage que vers l'oxydation, alors que le stockage des

glucides, sous forme de glycogène, est très limité (1000 kcal). En effet, de nombreuses études menées par SCHRAUWEN *et al.* (1997), PRENTICE ET DUNN (1998) et HALL *et al.* (2007) ont montré que la surconsommation de lipides induit une faible oxydation des lipides, et donc conduit au stockage, alors qu'une suralimentation glucidique équivalente (en énergie) induit une forte oxydation glucidique (mais elle réduit l'oxydation des lipides). Ainsi, les résultats d'une étude récente rapportée par GATTA-CHERIFI (2016) ont montré qu'à nombres de calories égales, la restriction en lipides permet une perte de poids plus importante que la restriction en hydrates de carbone. Cette étude rigoureuse va donc à l'encontre des affirmations populaires qui prônent une restriction massive en sucres.

Toutefois, les études expérimentales, épidémiologiques et cliniques montrent que les lipides ne sont pas des facteurs exclusifs et ne sont ni nécessaires ni suffisants pour induire une obésité. Le gain de poids est lié au fait d'avoir de façon régulière des apports énergétiques supérieurs aux dépenses : si les lipides peuvent y contribuer, les calories ingérées (et la densité énergétique) et dépensées globalement important plus, ainsi que la susceptibilité individuelle (liée à des facteurs génétiques). Dans la genèse de l'obésité l'apport lipidique total peut jouer un rôle important mais il n'est pas la cause de l'épidémie d'obésité, qui est multifactorielle (LECERF, 2008).

L'obésité est associée à un ensemble de désordres métaboliques qui menacent le pronostic fonctionnel et vital du sujet obèse (Figure 3). En effet, une dyslipidémie avec une anomalie de la glycémie (insulino-résistance) associée à une hypertension (une constellation d'anomalies appelée syndrome métabolique) sont les importants facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'infarctus du myocarde, les coronaropathies ainsi que les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (GARRISON *et al.*, 1996 ; KURTH *et al.*, 2002 ; VAN GAAL *et al.*, 2006 ; WORMSER *et al.*, 2011 ; CORCOS, 2012).

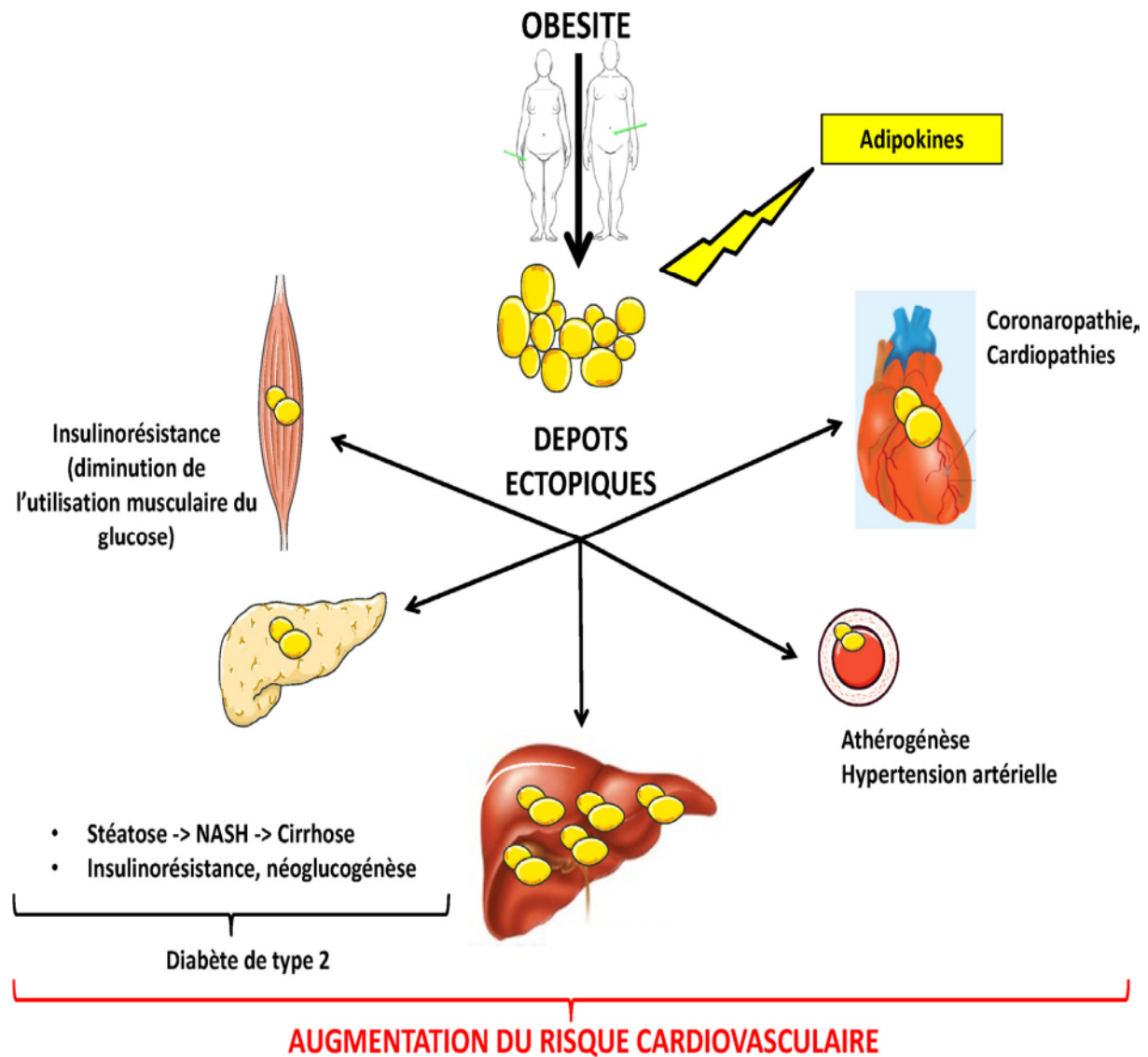


Figure 3. Dépôts ectopiques de tissu adipeux et liens avec les différentes pathologies (FAUCHER et POITOU, 2016) NASH : stéato-hépatite non alcoolique.

Ainsi sur 97 études prospectives, LU et *al.* (2014) estiment que la moitié de l'excès de risque de pathologies coronariennes et les trois quarts de l'excès de risque d'AVC sont liés à un indice de masse corporel (IMC) élevé et dans ces cas la perturbation de trois facteurs métaboliques est observée : pression artérielle élevée, dyslipidémie et anomalie de la glycémie. Ces résultats sont en faveur d'une prise en charge optimale des facteurs de risque métaboliques chez les sujets en surpoids, ce qui permettrait significativement de réduire leur risque cardiovasculaire. Généralement, le profil lipidique des obèses est hautement athérogène. Il se distingue par une variété d'anomalies lipidiques dominées par une élévation de l'apolipoprotéine B mais aussi du

LDL cholestérol, du cholestérol total et des triglycérides avec une hypo-HDLémie (TEMESSEK et *al.*, 2013; MOTAIB et *al.*, 2013; SFAR et *al.*, 2014, BERRICHE et *al.*, 2015).

1.5. La stéatose hépatique et l'obésité

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est la principale cause de dysfonctionnement hépatique dans les pays développés et est étroitement liée aux composants du syndrome métabolique tels comme obésité, dyslipidémie et diabète de type 2 (TONJES et *al.*, 2010). L'accumulation excessive des triglycérides (TG) dans les hépatocytes est la caractéristique de NAFLD. Le spectre des NAFLD va de la stéatose hépatique à la stéatohépatite non alcoolique (NASH), la fibrose hépatique, la cirrhose du foie et éventuellement le carcinome hépatocellulaire (CHC) (LOOMBA et SANYAL, 2013). Les mécanismes précis de NAFLD restent mal compris. « L'hypothèse multiple » est actuellement la théorie la plus reconnue pour expliquer le développement et la progression de la maladie, la dérégulation du métabolisme lipidique étant impliquée dans le premier rang (ERICKSON, 2009). Il a été estimé que 30% de la teneur en TG dans la NAFLD provenaient de la lipogenèse de novo (lipogenèse à partir du glucose), suggérant l'importance de cette voie dans l'étiologie de la NAFLD (DONNELLY et *al.*, 2005 ; POSTIC et GIRARD, 2008). SCHWIMMER et *al.* (2006) rapportent que la prévalence de la NAFLD est de 9,6 % chez les personnes de poids normal et de 38 % chez les obèses.

Définie anatomiquement par une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes, elle se singularise par une infiltration inflammatoire et par une évolution fibrosante indépendante de la consommation d'alcool, pouvant conduire à une authentique cirrhose et évoluant à un hépatocarcinome. Le diagnostic est évoqué en présence d'une hépatomégalie stéatosique (à l'échographie), ou d'une augmentation modérée des enzymes hépatiques. L'évolution de la fibrose vers la cirrhose est imprévisible. La physiopathologie de cette complication potentiellement grave est encore discutée (SCHLIENGER, 2010). Les AGL (acides gras libres) mis en circulation par la lipolyse exogène du tissu adipeux viscéral sous l'effet, notamment, de l'insulinorésistance, sont des déterminants importants de la stéatose. Il s'y ajoute une sécrétion excessive des VLDL riches en triglycérides et une réduction de l'activité de la lipoprotéine lipase responsable d'une recapture hépatique des triglycérides contenus dans les remnants de lipoprotéine (SCHLIENGER, 2010).

1.6. L'obésité expérimentale

Plusieurs types de régimes expérimentaux inducteurs d'obésité nutritionnelle ont été décrits chez les animaux. Ainsi, BARZILAI et ROSSETTI (1995) et SCHEMMEL *et al.* (1970), rapportent qu'une alimentation hyperlipidique, c'est-à-dire constituée de plus de 20% de lipides, contre seulement 4 à 5% dans un régime standard, peut également conduire à l'installation d'une obésité chez les rats.

Le régime cafeteria (RC) appelé aussi régime hyperlipidique hypercalorique est un modèle alimentaire responsable de l'hyperphagie induisant ainsi l'augmentation du stockage des graisses chez les animaux de laboratoire (TORDOFF, 2002). Ce modèle de régime a l'avantage d'être comparables, au moins dans ses caractéristiques de base (auto sélection, apport énergétique excessif), aux régimes à haute densité énergétique inducteurs d'obésité chez l'Homme (ROMERO *et al.*, 2006). L'apport en lipides est fortement augmenté avec ce régime, tandis que d'autres nutriments sont consommés dans des proportions à peine différentes des contrôles. En effet, la plupart des RC sont hyper lipidiques (PRATS *et al.*, 1989), et leurs effets sont plus marqués chez les mâles (COATMELLECC-TAGLIONI *et al.*, 2003), non protégés par les œstrogènes, et plus susceptibles d'être affectés par les glucocorticoïdes (BOUCLAOUS *et al.*, 2003 ; CARSIA *et al.*, 2008).

En plus des régimes expérimentaux il existe différentes souches d'animaux expérimentales génétiquement obèses comme : les souris ob/ob, qui sont des souris homozygotes déficientes pour le gène de la leptine et les souris db/db, qui présentent une mutation du récepteur à la leptine (obèses et également diabétiques), aussi les rats Zucker obèses (fa/fa), qui sont homozygotes récessifs pour le gène de récepteurs à la leptine (DELATTRE *et al.*, 2003).

II. Les margines

2.1. Production des margines et de l'huile d'olive

Les margines appelées aussi l'eau de végétation sont obtenues lors de l'extraction de l'huile d'olive. Elles sont constituées de l'eau contenue dans le fruit et de celle ajoutée au cours du broyage et des étapes de trituration (FIORENTINO et *al.*, 2003). L'extraction de l'huile d'olive souvent produit 20 % d'huile, 30% de grignons et 50% de margines (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2006). Le système de presse traditionnelle produit un volume de margine de l'ordre de 0,4 à 0,5 m³ / 1000 kg d'olives traitées qui peut aller de 1,5 jusqu'à 2 m³/1000 kg avec le système continu (système à 3 phases) (PARASKEVA et DIAMADOPOULOS, 2006).

Le volume de ces effluents est en constante progression. En 2003, la FAO a estimé que la production d'huile d'olive dans le monde a atteint 250 000 tonnes par an, ce qui est équivalent à 3 750 000 litres d'eau de végétation. Dans le bassin méditerranéen (Espagne, Italie, Grèce, Portugal, Tunisie, Syrie, Turquie, Maroc), les quantités de margines produites varient entre 10 million (NIAOUNAKIS et HALVADAKIS, 2006) et 30 millions m³ par an (Figure4) (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012).

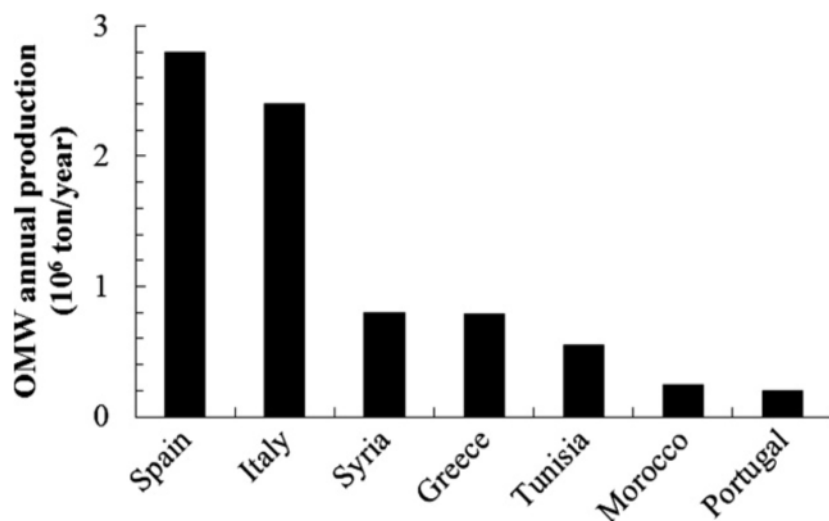


Figure 4. Production des margines par les pays producteurs d'huile d'olive (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012).

Le volume de ces efflux évolue en parallèle avec la production de l'huile d'olive. En effet, le verger oléicole mondial s'étend sur une superficie de près de 11 millions d'hectares localisé essentiellement en Europe (Espagne, Italie et Grèce) avec 50 % du verger mondial et en Afrique avec 30 % situé majoritairement dans les pays du Maghreb (Tunisie, Maroc et l'Algérie) (ANONYME 1, 2014). Le bassin méditerranéen est le cœur productif et commercial de l'huile d'olive avec près de 95 % des oliviers mondiaux qui se concentrent sur 3 millions d'exploitations. En effet l'huile d'olive est enracinée dans la culture alimentaire méditerranéenne depuis plusieurs siècles. Le pourtour méditerranéen demeure le premier producteur et consommateur d'huile d'olive avec une concentration de la production en Espagne suivie de l'Italie, la Grèce, la Syrie, la Turquie, la Tunisie, le Maroc, le Portugal et l'Algérie. La production d'huile d'olive en Algérie est estimée à 2,22 % de la production mondiale (C.O.I, 2014). En effet le climat de l'Algérie est adapté à la culture de l'olivier. La superficie du verger oléicole au cours de la campagne 2015/2016 ; selon les chiffres provisoires de la direction de la régulation de la production agricole (DRDPA), s'élève à 471.657 ha. La surface oléicole est répartie sur trois régions : le centre (54,3 %) ; l'Est (28,3 %) et l'Ouest (17 %). Selon les données de la C.O.I la plus grande région oléicole algérienne est située au centre nord du pays et particulièrement en Kabylie avec 58,4 % de la surface oléicole totale (LOUADJ et GIUFFRE (2010) cité par NADOUD (2015)). Les variétés d'oliviers cultivées en Algérie sont la variété population chamlal (90 %), la variété population azaradj et la variété population lemli (10 %) (MANSOUR-BENAMAR, 2013). Il existe à l'échelle nationale 1705 huileries, dont 85 % sont des huileries traditionnelles et 10 % des huileries modernes, et 45 unités de conditionnement d'olives de table selon les données du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural et de la pêche (ANONYME 2, 2016).

2.2. Les systèmes d'extraction d'huile d'olive

Les systèmes d'extraction d'huile d'olive sont différents. Le « système à 3 phases » utilise une grande quantité d'eau chaude pour diluer la pâte, ce qui cause une réduction de la quantité d'antioxydants dans l'huile d'olive et une production d'un volume considérable de margines. Ce système (et à moindre degré le système traditionnel) est très répandu dans plusieurs pays producteurs d'huile d'olive tels que l'Italie, la Grèce, le Maroc, la Tunisie, l'Algérie ...etc. Ces dernières années, un nouveau processus appelé « système à 2 phases » est utilisé (notamment en Espagne), il sépare la phase huileuse de l'olive sans rajout de l'eau et sans production de margines. Les grignons qui en résultent sont très humides, en effet leur composition en eau est de 65% à 70% (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012).

2.3. Composition des margines

Les margines présentent une couleur rose-brun intense ou noire, avec une forte odeur d'olive, un aspect trouble, une conductivité élevée et un pH qui varie entre 3 et 6. La composition des margines a été révélée par plusieurs études et comporte approximativement 83 à 94% d'eau, 4 à 16% de matières organiques et 0,4 à 2,5% de substances minérales (RAMOS-CORMENZANA, 1986 ; RANALLI, 1991). Selon NIAOUNAKIS et HALVADAKIS (2006), 60% de la matière organique sont des sucres réducteurs. Quant à la matière inorganique, le potassium est y prédominant. Le tableau I montre les différents minéraux présents dans les margines. La composition quantitative et qualitative des margines dépend du système d'extraction (la quantité d'eau rajoutée, la durée de broyage et de malaxation ...etc.), du stade de maturation des olives, de la durée et les conditions de stockage de fruit, des conditions climatiques et de la variété de l'olivier (OBIED et *al.*, 2005 ; JIMENEZ et *al.*, 2014).

Tableau I. Valeurs des minéraux et métaux lourds déterminées sur les margines issues des deux systèmes d'extraction de l'huile d'olive (C.O.I. 2008).

Elément (mg/l)	Procédé d'extraction de l'huile	
	Pression (système traditionnel)	Centrifugation (système à 3 phases)
Sodium	38- 285	18-124
Potassium	1500- 5000	630- 2500
Calcium	58- 408	47- 200
Magnésium	90- 336	60- 180
Fer	16,40- 86,40	8,80- 31,50
Cuivre	1,10- 4,75	1,16- 3,42
Zinc	1,60 - 6,50	1,42- 4,48
Manganèse	2,16 - 8,90	0,87- 5,20
Nickel	0,44- 1,58	0,29- 1,44
Cobalt	0,18- 0,96	0,12- 0,48
Plomb	0,40- 1,58	0,35- 0,72

La fraction organique des margines a une composition très complexe et hétérogène. Différents composés de nature et de concentration sont présents.

2.3.1. Les glucides, les composés azotés et les vitamines

Les composés lignocellulosiques et les pectines jouent un rôle important dans la texture des olives ; ils représentent respectivement environ 3 % et 6 % du poids de la pulpe fraîche. Outre, la cellulose et la pectine issues de la pulpe d'olives (FERNANDEZ DIAZ, 1983), plusieurs autres sucres simples sont présents : raffinose, mannose, saccharose, glucose, arabinose et xylose. La fraction azotée est principalement représentée par des protéines avec un pourcentage variant entre 1,2 et 2,4 %. Presque tous les acides aminés sont présents dans les margines. Les plus abondants sont les acides aspartique et glutamique, la proline et la glycine. En ce qui concerne les vitamines, plusieurs ont été identifiées dans les margines notamment les vitamines du groupe B (124 mg/kg) (SALVEMINI, 1985), la vitamine E (tocophérol) et les caroténoïdes, précurseurs de la vitamine A (AGGOUN et *al.*, 2016).

2.3.2. Les huiles et les acides organiques

La proportion des acides organiques présente dans les margines varie entre 0,5 et 1,5 %. Les principaux acides organiques rencontrés sont les acides fumarique, glycérique, lactique, malique et malonique (SALVEMINI, 1985). La concentration d'huile résiduaire dans les margines est très variable selon le processus d'extraction utilisé. Elle varie entre 0,02 et 1 % (FIESTAS ROS DE URSINOS, 1981). L'acide oléique est l'acide gras le plus abondant (65 %) (RANALLI, 1991).

2.3.3. Les composés phénoliques

Le coefficient de partition (eau/huile) de la majorité des phénols de l'olive est en faveur de la phase aqueuse, il est de 6×10^{-4} à 1,5. L'olive est très riche en composants phénoliques, mais uniquement 1 à 2 % de la totalité des phénols passe dans l'huile, cependant la majorité se trouve dans les margines (environ 53 %) et dans les grignons (environ 45 %) (RODIS et *al.*, 2002; DI GIOVACCHINO et *al.*, 2002). DE LEONARDIS et *al.* (2007), rapportent que près de 50 mg de polyphénols totaux peuvent être extraits (par l'acétate d'éthyle) à partir de 100 g de margines. A présent, plus de 50 composés phénoliques ont été identifiés (OBIED et *al.*, 2005). Leur structure est très variable et leur quantité varie entre 0,5 à 24g/L (LA SCALIA et *al.*, 2017).

2.3.3.1. Les monomères aromatiques

Plusieurs acides phénoliques ont été identifiés :

- L'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'oleuropéine (Figure 5), représentent les composés phénoliques majeurs des margines (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012). En effet, les travaux de CARDINALI et *al.* (2010) montrent que l'hydroxytyrosol représente 10 à 20 % de la totalité des phénols dans les margines.

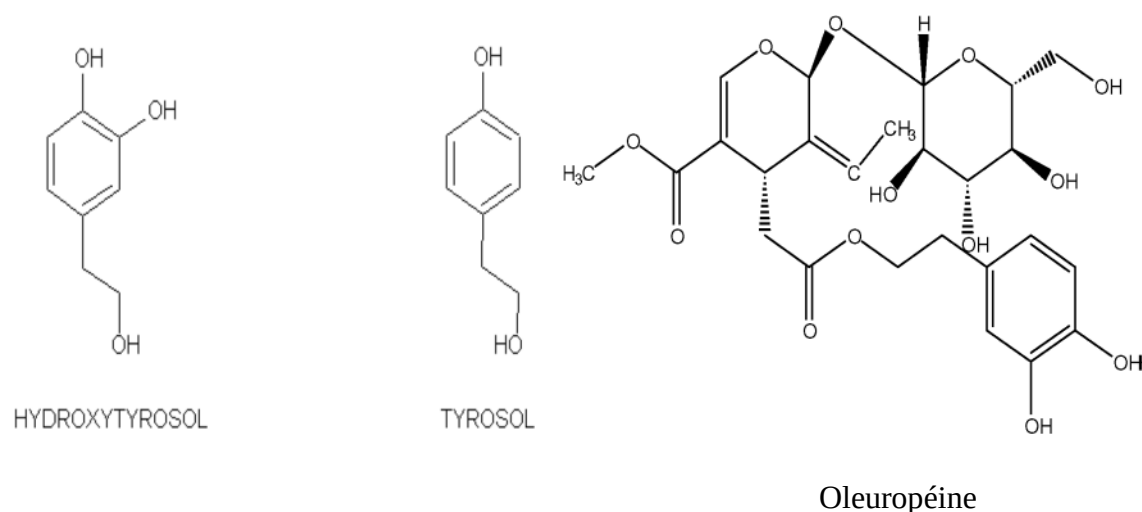


Figure 5. Structures des polyphénols majeurs des margines

- Acide caféique, acide coumarique, acide protocatéchique et acide vanillique (VAZEQUEZ et *al.*, 1974). Acide gallique (BIANCO et UCCELLA, 2000). Acide 4-hydroxyphénylacétique, acide syringique et acide hydroxybenzoïque (CICHELLI et SOLINAS, 1984). Acide vératrique et acide 3, 4,5-triméthoxybenzoïque (BALICE et CERA, 1984). Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, acide chlorogénique et acide ferulique (AGGOUN et *al.*, 2016).

- Les alcools phénoliques ont été aussi cités : le 4-hydroxyphényl alcool et le 3,4-dihydroxyphényl éthanol (CICHELLI et SOLINAS, 1984 ; VAZEQUEZ et *al.*, 1974).

- D'autres composés phénoliques ont été identifiés: les verbascosides (VISIOLI et *al.*, 1995), L-caféyl- glucose, apéginine, lutéoline (WAGNER et *al.*; 1974), ligstroside (BIANCO et UCCELLA, 2000), catéchol et 4-méthyle catéchol (VISIOLI et *al.*, 1999).

2.3.3.2. Les composés phénoliques à haut poids moléculaire

Les polyphénols identifiés dans les margines sont essentiellement les anthocyanes (TANCHEV et *al.*, 1980) et les tanins. Ces derniers dont les structures sont complexes, sont conventionnellement classés en tanins hydrolysables et tanins condensés (BALICE et *al.*, 1982). En ce qui concerne la lignine, ZBAKH et EL ABBASSI (2012) rapportent que la couleur noire des margines est due à la polymérisation de celle-ci avec des composés phénoliques. HAMDI (1991), rapporte que la lignine est un hétéropolymère, formé par la polymérisation oxydative de trois monomères dérivés de l'alcool hydroxycinnamique: le 4-hydroxycinnamate, le 4-hydroxy - 3 méthoxycinnamate (coniférylate) et le 3,5 - diméthoxy -4- hydroxycinnamate (sinapylate).

2.4. L'hydroxytyrosol

L'hydroxytyrosol (HT) est un phénol amphipathique avec un poids moléculaire de 154,16 g / mol. Sa structure est un phényléthyl-alcool. Appelé aussi 3,4-dihydroxyphényléthanol (DOPET) ou 3,4- dihydroxyphénoléthanol (3,4-DHPEA) ou 4- (2-hydroxyéthyl) -1,2-benzènediol par le Système de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) (ROBLES-ALMAZAN et *al.*, 2017).

2.4.1. Formation de l'hydroxytyrosol

La concentration de l'oleuropéine peut atteindre jusqu'à 2 % du poids d'olives (WAGNER et *al.*, 1984). Dans le fruit, il est le phénol le plus abondant, il est formé de l'acide elenolique, de glucose et de l'hydroxytyrosol (SOLER-RIVAS et *al.*, 2000). L'étude de AGGOUN et *al.* (2016), montre que l'oleuropéine est le constituant majeur des margines. Cependant, d'autres travaux rapportent que durant le broyage des olives, la quantité de l'oleuropéine baisse et celle des phénols libres augmente. En effet, ROMERO et *al.* (2002) montrent que dans les fruits broyés, la quantité de l'hydroxytyrosol varie entre 1 et 3 g/100g de poids sec et que l'oleuropéine est totalement transformé. Ainsi l'hydroxytyrosol est formé suite à l'hydrolyse de l'oleuropéine pendant la maturation et le stockage du fruit mais aussi lors de l'extraction d'huile par l'action des estérases d'olives (CHAROENPRASERT et MITCHELL, 2012) (Figure 6).

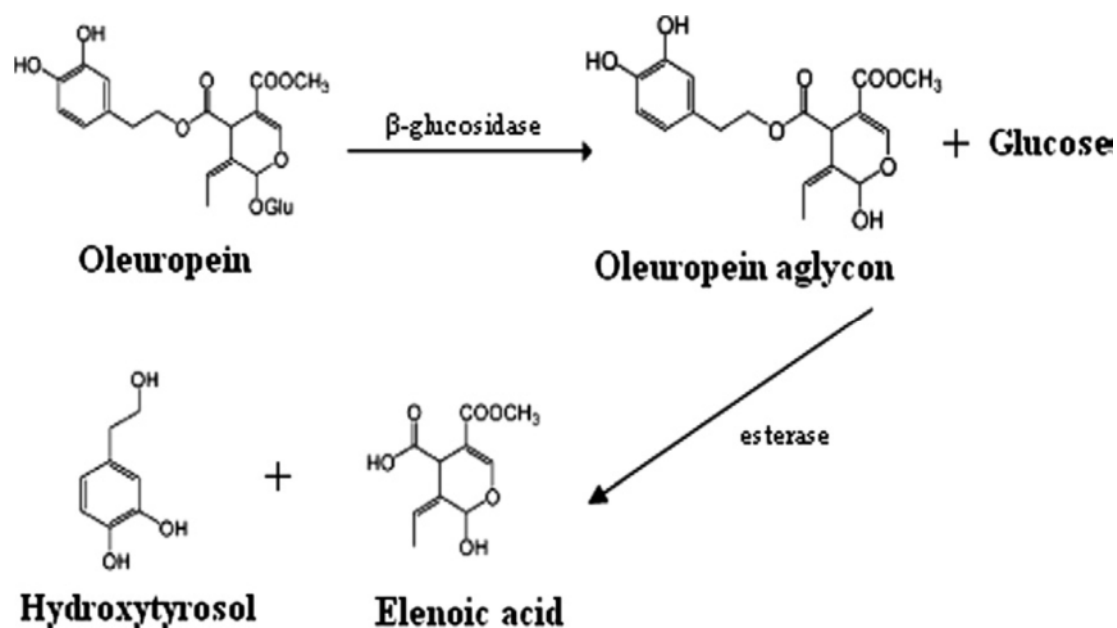


Figure 6. L'oleuropéine et ses dérivés après hydrolyse enzymatique par la β -glucosidase et l'estérase (KHOUFI et *al.*, 2011).

Le tableau II montre les concentrations d'hydroxytyrosol dans les différents produits.

Tableau II. Concentration de l'Hydroxytyrosol dans différents produits (selon ROBLES-ALMAZAN et *al.*, 2017)

Aliment	Quantité d'Hydroxytyrosol
Vin blanc	2 mg/L
Vin rouge mature	20 mg/L
Vin rouge	3 mg/L
Feuilles d'Oliviers	12 g/Kg
Huile extra vierge	20-60 mg/ Kg
Les margines (utilisées dans nos expérimentations)	255,1 mg/L

2.4.2. Effets biologiques de l'hydroxytyrosol

Les composés phénoliques majeurs des margines (hydroxytyrosol ,tyrosol et l'oleuropéine) ont un large spectre d'activités biologiques, en effet ils possèdent des fonctions anti oxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes et antivirales.

Pour l'Hydroxytyrosol, les effets antioxydants, anti-inflammatoires et antiathérogènes ont été démontrés par plusieurs travaux (BERNINI et *al.*,2013 ; GRANADOS-PRINCIPAL et *al.*, 2014, RODRIGUEZ-MORATO et *al.*, 2015). Des études supplémentaires ont également porté sur l'effet antimicrobien de l'HT (ZORIC et *al.*, 2013). Concernant ses effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire, grâce à son effet antioxydant déjà cité, l'HT prévient l'oxydation de lipoprotéine de faible densité (LDL). En conséquence, il diminue la formation de plaques d'athérome dans l'athérosclérose (GRANADOS-PRINCIPAL et *al.*, 2012; GONZALEZ-SANTIAGO et *al.*,2006; WARLETA et *al.*, 2011). Certains extraits enrichis en HT ont également réduit les niveaux plasmatiques de cholestérol total (JEMAI et *al.*, 2008; POUDYAL et *al.*, 2010) et la pression artérielle (KHAYYAL et *al.*, 2002). Les effets bénéfiques de l'HT sur la peau, l'appareil respiratoire, sur le système nerveux, contre le Syndrome métabolique et le cancer ont été également rapportés (ROBLES-ALMAZAN et *al.*,2017).

Prendre en compte toutes les données décrites ci-dessus et les effets bénéfiques de l'Hydroxytyrosol pour la santé (Figure 7), l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) depuis 2011 recommande la consommation quotidienne de 5 mg d'Hydroxytyrosol fournis par des quantités modérées de l'huile d'olive (20g) pour maintenir une alimentation équilibrée. Cette dose est suffisante pour générer des propriétés bénéfiques pour la santé en diminuant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité, en augmentant les lipoprotéines de haute densité, en maintenant une tension artérielle normale et en évitant les processus pro-inflammatoires. Bien que la dose journalière d'HT semble faible, il faut noter que, la concentration moyenne d'HT dans l'huile d'olive pourrait être si éloignée de la prescription établie par l'EFSA, et une consommation élevée d'huile serait nécessaire pour atteindre les niveaux bénéfiques recommandés de HT (ROBLES-ALMAZAN et *al.*,2017).

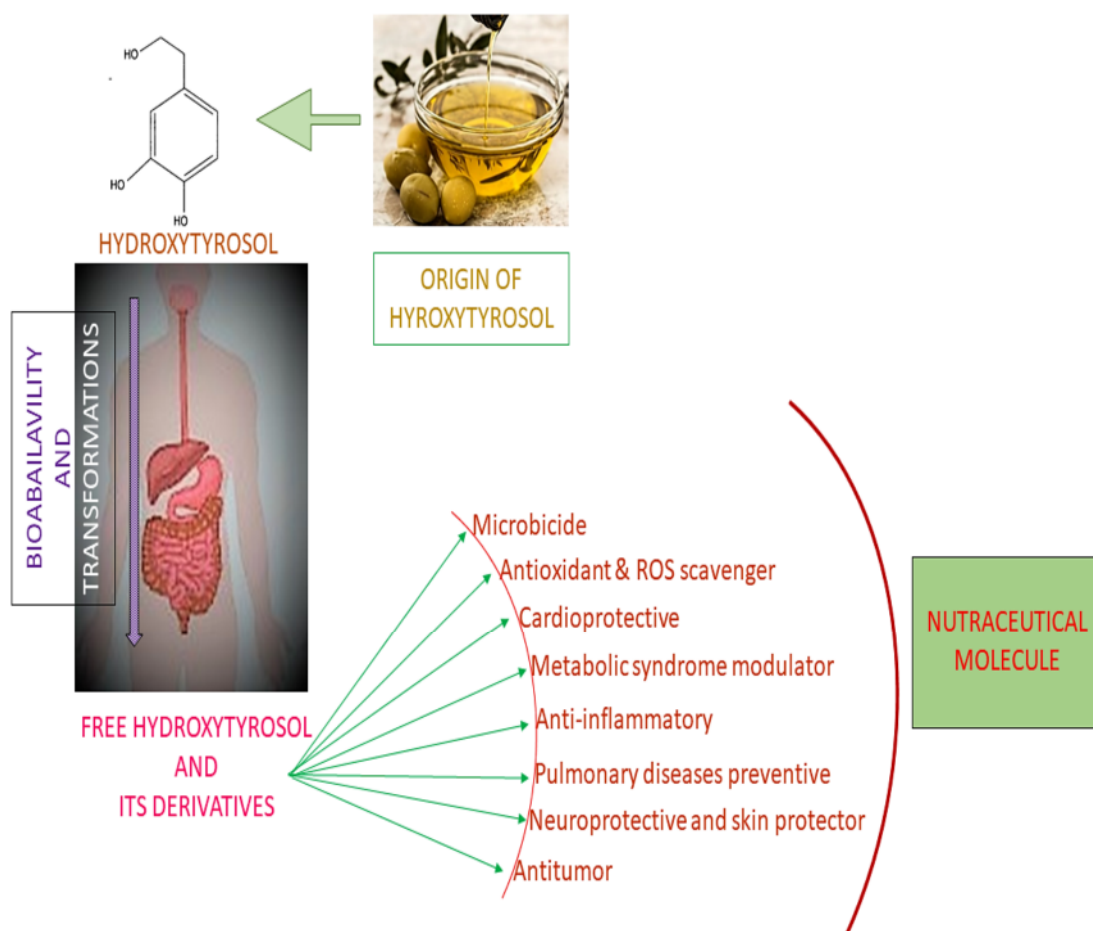


Figure 7. Effets biologiques de l'Hydroxytyrosol (ROBLES-ALMAZAN et al., 2017)

2.4.3. Biodisponibilité de l'hydroxytyrosol

DEL BOCCIO et al. (2003) et TAN et al. (2003), rapportent qu'après l'administration orale, l'oleuropéine est rapidement absorbée, la concentration maximale dans le plasma apparaît 2h après l'administration. L'hydroxytyrosol est le plus important métabolite. Il est rapidement distribué et excrété dans l'urine surtout sous la forme glucuronidés, sulfatés et en faible concentration sous forme libre. BAI et al. (1998) rapportent que sa concentration maximale apparaît 7 minutes après son administration orale. Cependant d'autres auteurs suggèrent que son apparition est entre 0,5 et 1 à 2 heures et il disparaît complètement après 4 heures (DOMINGUEZ-PERLES et al., 2017).

2.4.3.1. Absorption

Les travaux de MANNA *et al.* (2000) sur les mécanismes moléculaires du transport intestinal de l'hydroxytyrosol montrent que le [^{14}C]-hydroxytyrosol est transporté par le mécanisme de diffusion passive (diffusion simple) et son transport est bidirectionnel, contrairement à l'absorption de l'oleuropéine. En effet, Ce dernier est un glucoside, emprunterait le co-transporteur glucose/sodium du côté apical de l'entérocyte et la perméase GLUT 2 du côté basal (KAYANO *et al.*, 1990; NOMOTO *et al.*, 1998).

2.4.3.2 Distribution

A cause de son intense et rapide métabolisme, l'HT présente une demi-vie de 1 à 2 minutes (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2014 ; D'ANGELO *et al.*, 2001). Le HT et ses métabolites ont de très bonnes capacités de distribution dans les tissus tels que les muscles, les testicules, le foie et le cerveau (HT peut traverser la barrière hémato-encéphalique) et s'accumulent dans les reins et le foie (D'ANGELO *et al.*, 2001). Cette distribution étendue est responsable des propriétés bénéfiques pour la santé de l'HT (SERRA *et al.*, 2012). Le fait que l'HT soit également présente dans les tissus cérébraux, son interaction possible avec les voies dopaminergiques, suggère un rôle en tant que protecteur neuronal dopaminergique (SCHAFFER *et al.*, 2010).

2.4.4. Métabolisme

Le métabolisme intense et rapide de l'HT se déroule à l'intérieur des entérocytes et ensuite dans le foie mais également il est entrepris par la microflore intestinale. Selon MOSELE *et al.* (2014), le métabolisme de l'HT par le microbiote se produit d'abord par oxydation suivi d'une transformation en acides phénylacétiques hydroxylés. Aussi, RODRIGUEZ-MORATO *et al.* (2016), rapportent que dans le plasma, l'HT libre peut être trouvé dans une très faible concentration, quant aux métabolites ils sont surtout des produits ortho-méthyliques de l'HT (alcool homovanillique et acide), des dérivés de glucuronide et de sulfate (Figure 8).



Plusieurs études rapportent que l'analyse de l'urine révèle la présence des formes conjuguées à l'acide glucuronique (D'ANGELO et *al.*, 2001 ; TUCK et *al.*, 2001 ; ROBLES-ALMAZAN et *al.*, 2017). Cependant, d'autres métabolites de l'hydroxytyrosol ont été également trouvés tels que : l'acide homovanillique (l'acide 4-hydroxy-3-methoxy phenylacétique) et l'alcool homovanillyl (CARUSO et *al.*, 2001), l'acide 3,4-dihydroxyphenylacetic et l'acide 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (TUCK et HAYBALL, 2002). Le temps nécessaire pour l'élimination complète du corps, à la fois pour l'HT et ses métabolites est environ 6 h chez les humains (SUAREZ et *al.*, 2011, RODRIGUEZ-MORATO et *al.*, 2016) et environ 4 h chez le rat (DOMINGUEZ-PERLES et *al.*, 2017). Dans le rein, l'HT est accumulé jusqu'à son excrétion

(D'ANGELO *et al.*, 2001), où elle peut jouer un rôle néphroprotecteur grâce à ses propriétés antioxydantes (CHASHMI *et al.*, 2017). D'ANGELO *et al.* (2001) établi qu'environ 5% de l'HT total est excrété par les fèces après 5h d'injection intraveineuse (1,5 mg / kg).

2.4.6. Toxicité

A ce jour, aucune étude de toxicité n'a été réalisée pour déterminer si l'HT pouvait exercer un effet toxicologique chez l'homme. En ce sens, il existe de nombreuses études réalisées chez le rat avec différentes administrations de façons à déterminer la toxicité aiguë. Ainsi, une étude menée par CHRISTIAN *et al.* (2004) a montré que l'administration de l'HT par gavage oral chez des rats Sprague Dawley et des souris avec la dose de 1400 mg / Kg de PC n'a pas causé aucune mortalité et morbidité. Les seules altérations prouvées étaient la présence de fèces diarrhéiques chez le rat. Outre ces résultats, CHRISTIAN *et al.* (2004) ont employé une dose plus élevée chez les rats (augmentation de 5g / Kg de PC) et ils ont établi une dose létale médiane (DL50) d'environ 3,5 g / Kg de HT. L'étude d'AUNON-CALLES *et al.* (2013) ont rapporté que l'administration orale d'HT une fois par jour pendant 13 semaines à des doses de 5, 50 et 500 mg / kg / j n'a entraîné aucune altération microscopique et macroscopique de la majorité des organes, ni même la mort. Ils ont observé un gain de poids corporel, et une augmentation du poids des reins dans le groupe ayant la dose de traitement la plus élevée, sans modification de la fonctionnalité ou de la structure de l'organe. Par conséquent, ils sont arrivés à la conclusion qu'aucun effet indésirable n'a été observé à des doses de 500 mg / kg / j. Dans une autre étude, HEILMAN *et al.* (2015) ont administré à des rats Wistar femelles et mâles par gavage oral pendant 90 jours consécutifs des doses de 125, 250 et 500 mg HT / kg / jour. Aucun effet toxicologique significatif n'a été trouvé.

III. Les plaquettes sanguines

3.1. Origine et structure

Les plaquettes sont les plus petits éléments figurés du sang circulant. Elles sont anucléées et à l'état non activé, elles ont une forme discoïde (2 à 4 μm de diamètre pour 1 μm d'épaisseur). Leur rôle est de stopper la perte de sang après une lésion vasculaire (rôle dans l'hémostase). Elles se forment dans la moelle osseuse rouge par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes. Ces grosses cellules médullaires d'environ 30 μm de diamètre proviennent de cellules totipotentes qui donnent naissance aux érythrocytes et aux leucocytes. Chaque mégacaryocyte produit environ un millier de plaquettes (BEHNKE et FORER, 1998). Les plaquettes sont dépourvues d'ADN mais contiennent des ARNm provenant des mégacaryocytes (NEWMAN et *al.*, 1988) ainsi que la machinerie nécessaire à la traduction (KIEFFER et *al.*, 1987).

L'analyse en microscopie électronique permet de distinguer 3 régions principales : la membrane plasmique, le cytosquelette et les organelles. L'ultra structure de la plaquette au repos est représentée dans la figure 9.

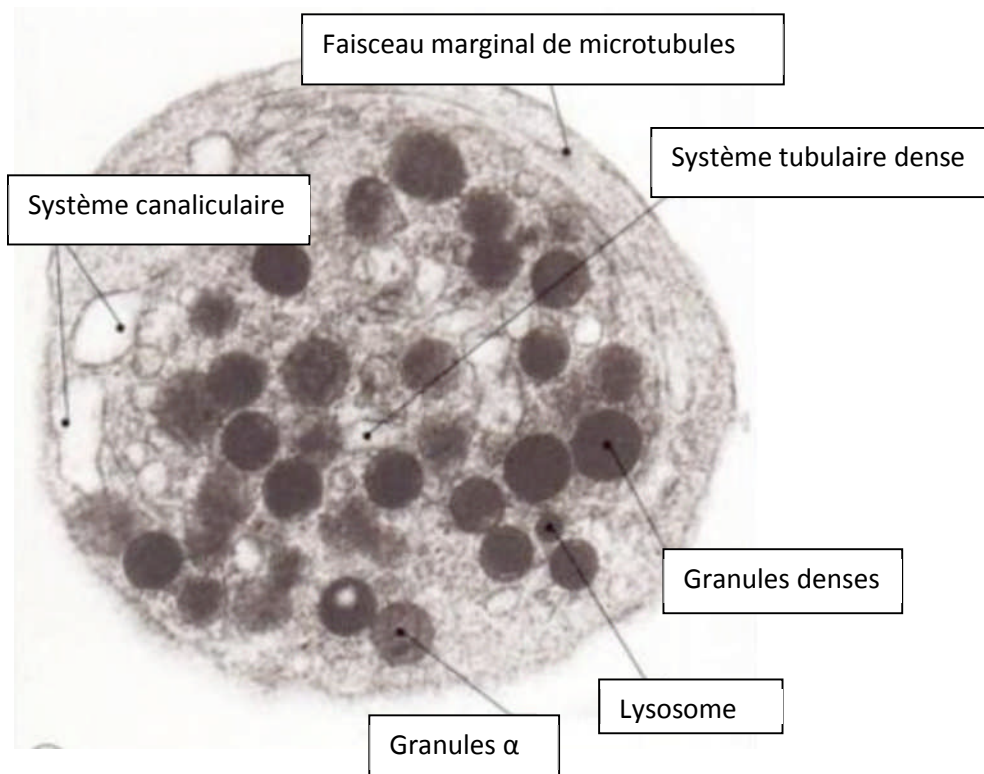


Figure 9. Ultrastucture d'une plaquette en microscopie électronique
(STEVENS et LOWE, 1997)

Environ 2/3 des plaquettes circulent dans le sang à l'état inactivé, sous forme discoïde, à raison de 150 à 400 x 1000/ mm³ de sang chez une personne saine. Leur durée de vie dans la circulation sanguine est de 8 à 10 jours chez l'Homme. Le 1/3 restant est séquestré de manière réversible dans la rate. Les plaquettes vieilles sont phagocytées par le système monocytaire macrophagique localisé principalement dans la rate (BROOS et *al.*, 2011; WANG et *al.*, 2012). Les plaquettes les plus jeunes sont les plus réactives chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires (SCHNEIDER et *al.*, 2008 ; THATTALIYATH et *al.*, 2005).

Les plaquettes possèdent un important réseau membranaire : l'un connecté avec le milieu extracellulaire par de profondes invaginations, le système caniculaire ouvert (SCO), et l'autre uniquement intracellulaire, le système tubulaire dense (STD). Le SCO permet l'endocytose de substances plasmatiques et suite à l'activation plaquettaire favorise la libération du contenu des granules. Le SCO représente une source de membranes utilisable lors du changement de forme des plaquettes. Le système tubulaire dense est l'équivalent du réticulum endoplasmique lisse dans les autres types cellulaires. Il contient les réserves de calcium ainsi que les enzymes impliquées dans la synthèse de prostaglandines (BONEU et CAZENAVE, 1997).

La membrane plaquettaire comporte plusieurs protéines d'adhésion, dont les principales sont présentées dans le tableau III :

Tableau III. Principaux récepteurs d'adhésion présents à la surface de la plaquette et leurs ligands respectifs (BROOS et *al.*, 2011 ; WANG et *al.*, 2012).

Principaux Récepteurs plaquettaires	Ligands
Récepteur GPIb-V-IX	FW (Facteur de von Willebrand)
Intégrine α IIb β 3 (récepteur GPIIbIIIa)	Fibrinogène, FW
Intégrine α 2 β 1 (récepteur GPIaIIa)	Collagène
GPVI	Collagène

Sous la membrane plasmique, s'étend le cytosquelette constitué de microfilaments d'actine et d'un anneau périphérique de microtubules qui maintiennent les plaquettes au repos sous forme

discoïde. Lors de leur activation, les réarrangements de ces réseaux permettent les phénomènes de l'activation plaquettaire : la concentration des organites, l'émission de prolongements cytoplasmiques (pseudopodes) et la dégranulation. La plaquette prend alors une forme sphérique avec projection de pseudopodes (Figure 10). Le changement de forme des plaquettes augmente considérablement sa surface externe, ce qui facilite les contacts avec les cellules environnantes et les molécules de la matrice extracellulaire (BROOS *et al.*, 2011 ; WANG *et al.*, 2012).



Figure 10 : Changement de forme des plaquettes lors de leur activation (WANG *et al.*, 2012)

Les plaquettes renferment dans leur cytoplasme peu de mitochondries, de nombreux grains de glycogène et plusieurs types de granules (les granules denses et granules alpha ; granules de stockage spécifiques des plaquettes) ainsi que des lysosomes. Lors d'une activation forte, les granules sécrètent leur contenu par un mécanisme d'exocytose.

Les granules alpha sont les plus abondants, puisqu'on en dénombre entre 20 et 200 par plaquette chez l'Homme. C'est le principal réservoir intracellulaire des protéines libérées lors de l'activation plaquettaire. Le contenu est très hétérogène entre chaque granule (environ 280 protéines différentes), et comprend notamment des protéines spécifiques des plaquettes (platelet factor 4 ou PF4), des glycoprotéines d'adhésion (fibrinogène; facteur von Willebrand WF; fibronectine), des facteurs de coagulation (facteurs V, XI, XIII), des facteurs de croissance (platelet derived growth factor ou PDGF; vascular endothelial growth factor ou VEGF), la P-sélectine, la thrombospondine et la glycoprotéine membranaire $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Ces différentes protéines sont libérées dans la circulation sanguine mais participent également à la modification de la composition de la membrane plaquettaire avec, par exemple, l'expression de la P-sélectine

ou de la $\alpha\text{IIb}\beta 3$ à sa surface, permettant l'interaction avec d'autres cellules (BROOS et *al.*, 2011; WANG et *al.*, 2012).

Les granules denses sont de plus petite taille que les granules α et moins nombreuses (2-10/plaquette humaine). Ils sont appelés ainsi car ils apparaissent en noir au microscope électronique après coloration. Elles contiennent surtout de l'ADP, de l'ATP, de la sérotonine, du Ca^{2+} , du Mg^{2+} et du pyrophosphate. 60% de l'ADP total de la plaquette est stocké dans les granules. Enfin les lysosomes contiennent des hydrolases acides, des protéases, des sérines peptidases, des cathepsines, des collagénases ou bien encore des phosphatases et jouent un rôle important dans la lyse des thrombi (BROOS et *al.*, 2011 ; WANG et *al.*, 2012).

3.2. Intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Fibrinogène et activation plaquettaire

L'activation plaquettaire *in vivo* est déclenchée suite à une interaction de l'ensemble de ses récepteurs avec leurs différents ligands correspondants, ces derniers peuvent appartenir à la structure vasculaire, des protéines adhésives (exemple : collagène, FW) comme ils peuvent être des agonistes plaquettaires solubles (exemple : thrombine, adrénaline, thromboxane A2 : TxA_2 , ADP ...etc) et l'agrégation plaquettaire proprement dite fait intervenir spécialement l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ qui lie les autres plaquettes par des ponts de fibrinogène. Ainsi une signalisation « *inside-out* » active l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$, celle-ci une fois activée lie le fibrinogène. L'agrégation plaquettaire est alors déclenchée par la formation des ponts de fibrinogène. L'interaction intégrine- $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -fibrinogène initie la voie de signalisation « *outside-in* » pour renforcer l'activation plaquettaire par sécrétion des granules plaquettaire et induire ainsi la stabilisation du thrombus.

L'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa ou CD41/CD61) est une glycoprotéine et un hétérodimère transmembranaire composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β reliées par des ponts disulfure (BLOCKMANS et *al.*, 1995; BACHELOT et *al.*, 1995). Il est le récepteur plaquettaire le plus abondant, il est exprimée spécifiquement dans la lignée mégacaryocytaire. Chaque plaquette en contient environ 80 000 copies en surface ainsi que 30 000 exemplaires supplémentaires sur les membranes du SCO et des granules α , qui sont exposés après activation (WAGNER et *al.*, 1996). Les sous-unités αIIb et $\beta 3$ ont de longs domaines extracellulaires, ainsi que de courts domaines transmembranaires et cytoplasmiques. Ces domaines sont très conservés entre l'Homme et la souris. Présente à l'état constitutif sur les plaquettes au repos

dans une conformation inactivée, le $\alpha\text{IIb}\beta_3$ n'a alors pas d'affinité pour ses ligands (le WF et le fibrinogène).

La liaison du fibrinogène à la $\alpha\text{IIb}\beta_3$, dépendante du calcium, s'effectue grâce à deux séquences RGDS (arginine-glycine-acide aspartique-sérine) situées sur chaque sous-unité de la glycoprotéine (PERUTELLI et MORI, 1992). Comme le fibrinogène est une molécule symétrique, l'agrégation est possible grâce à la formation de ponts fibrinogène entre molécules $\alpha\text{IIb}\beta_3$ des plaquettes adjacentes. Le changement de conformation de l'intégrine, qui passe d'une forme repliée, où les chaînes α et β sont liées par un « pont salin », à une forme dépliée où la taline, une protéine du cytosquelette, sépare les 2 chaînes, permettant ainsi à l'intégrine de se lier à son ligand (Figure 11) (BEGLOVA *et al.*, 2002 ; SHATTIL et NEWMAN, 2004). L'importance physiologique de l' $\alpha\text{IIb}\beta_3$ est attestée par une maladie hémorragique, la thrombasthénie de Glanzmann, qui résulte de l'absence ou la non fonctionnalité de ce récepteur et se caractérise par l'incapacité des plaquettes à agréger (NURDEN, 2006). De plus, l' $\alpha\text{IIb}\beta_3$ est la cible d'une classe de médicaments anti-thrombotiques très efficaces, qui sont utilisés principalement en situation aigüe, par exemple lors d'un infarctus du myocarde (YOUSUF et BHATT, 2011).

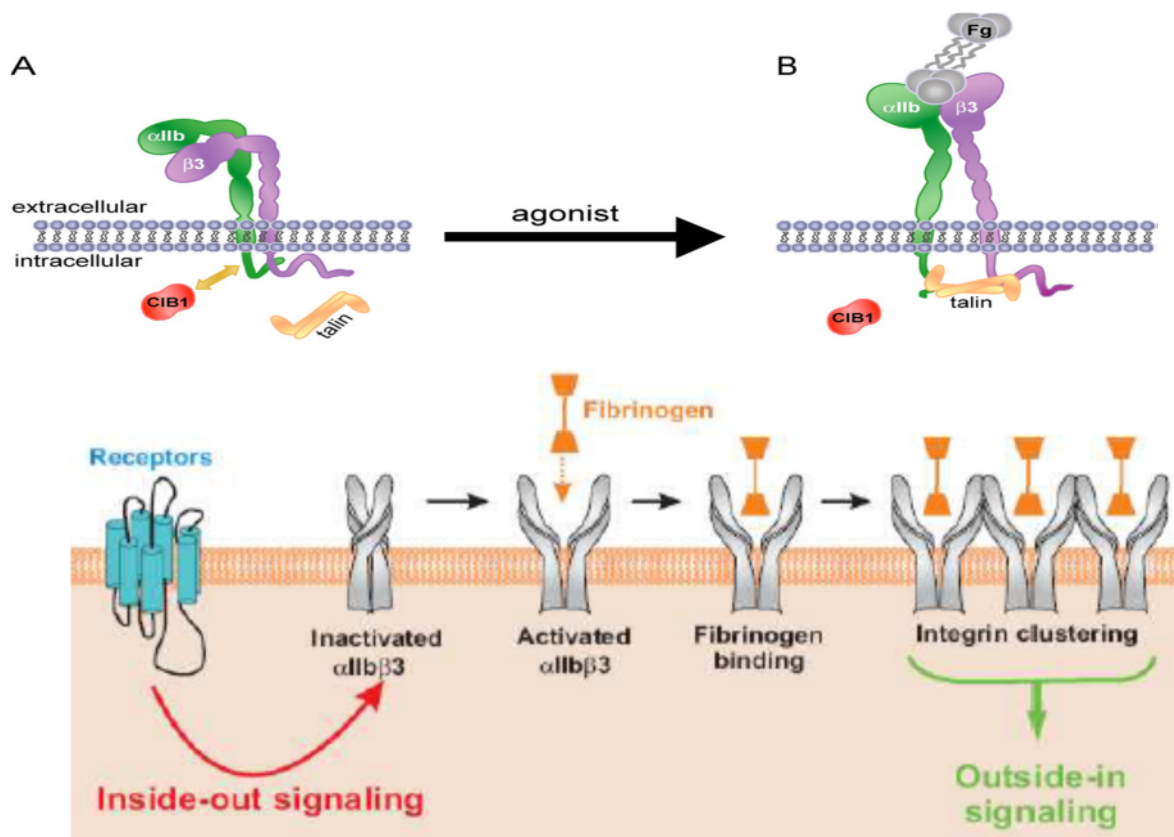


Figure 11. Structure et activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (YUAN *et al.*, 2006).

Fg : fibrinogène.

Partie expérimentale I : Caractérisation des margines

1. Matériel et méthodes

1.1. Les margines utilisées

Les margines utilisées dans nos expérimentations proviennent d'une huilerie moderne de trituration d'olives par centrifugation à trois phases, située dans la région de Ait-Bouaddou (Les Ouadhias, Tizi-Ouzou), pendant la campagne oléicole 2012/2013. Les échantillons sont fraîchement prélevés à partir d'un bassin de stockage des margines, ils sont transportés dans des flacons de 2 litres pour les utilisations ultérieures, ils ont été conservés à l'abri de la lumière à -20 °C. Les margines n'ont pas subi de centrifugation, cependant une décantation a été réalisée afin d'éliminer le maximum de matière grasse.

1.2. Caractérisation des margines

Les expérimentations concernant la caractérisation des margines (sauf pour la matière sèche) ont été réalisées au niveau du laboratoire des Bioprocédés, Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie.

1.2.1. Détermination de la teneur en matière sèche

L'expérimentation est réalisée au niveau du laboratoire de LABAB (Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou).

La matière sèche (MS) est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques, en solution ou en suspension, contenues dans les margines (Aissam, 2003). Elle est déterminée selon le protocole suivant : 20 ml de margines sont déposées dans une capsule en porcelaine préalablement pesée. Cette dernière est placée dans une étuve à 105 °C jusqu'à obtention d'une masse constante. Après refroidissement, la capsule est pesée de nouveau avec son contenu et la teneur en matières sèches est calculée par la formule suivante :

$$[MS] \text{ (g/l)} = (P_1 - P_0) \frac{1000}{VE}$$

MS : teneur en matières sèches

P_0 : poids de la capsule vide

P_1 : poids de la capsule et des margines après séchage

VE : volume de margine

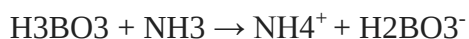
1.2.2. Détermination de la teneur en matières grasses

Les matières grasses (MG) ou lipides constituent un groupe hétérogène, dont la propriété commune est d'être non soluble dans l'eau et soluble dans des solvants organiques. Elles sont constituées principalement de triglycérides (TG) qui sont des triesters de glycérol et d'acides gras saturés, mono insaturés ou polyinsaturés. La teneur en matières grasses des margines a été estimée par un dosage gravimétrique selon le protocole suivant : dans une ampoule à décanter un volume de 50 ml (V) de margines acidifiées (pH 2, HCl 5N) est mélangé avec un volume équivalent d'hexane (50 ml), les deux phases se séparent par décantation, la phase aqueuse est récupérée dans un bêcher et la phase du solvant dans un ballon préalablement lavé, séché et pesé (P1). L'extraction est renouvelée 2 fois sur le même volume de margines jusqu'à élimination totale des graisses ; le solvant est évaporé à l'aide d'un rota vapeur (Büchi Rotavapor R-200) à une température de 40°C. Le ballon contenant le résidu est pesé (P2) après évaporation et après refroidissement. La teneur en matières grasses est exprimée par la formule suivante :

$$[MG] \text{ (g/L)} = (P2-P1) \times 1000/V$$

1.2.3. Détermination de la teneur en azote total

L'azote total a été déterminé selon la méthode de Kjeldahl décrite par SCHINNER *et al.* (1996). La première étape consiste en la minéralisation de l'échantillon par digestion acide (acide sulfurique) en présence d'un catalyseur (sélénium) pendant 2 heures à 400 ° C avec une unité de digestion (Bioblock Scientific 10401). L'azote organique est converti en sulfate d'ammonium (NH₄)₂ SO₄. En distillant le sulfate d'ammonium avec un excès de NaOH concentré (5N), l'ammoniac (NH₃) est libéré et transporté par le courant de vapeur d'eau. L'ammoniac est ainsi recueilli dans une solution d'acide borique (H₃BO₃ : 2%) par l'équation de la réaction suivante :



La solution résultante est ensuite titrée avec de l'acide chlorhydrique (HCl : 0,01 M). Ce dernier réagit avec le borate d'ammonium [NH₄⁺ + H₂BO₃⁻] donnant du chlorure d'ammonium (NH₄⁺ Cl⁻) et de l'acide borique non dissocié (H₃BO₃) selon l'équation de la réaction suivante :



Ainsi, pour une masse (m en grammes) de l'échantillon et un volume (v en ml) de HCl (0,01 M) utilisé pour le titrage des ions ammonium, le pourcentage d'azote total est donné par la formule : $\% N (g) = 0,014 \times 4v / m$ (SCHINNER et *al.*, 1996).

1.2.4. Détermination de la teneur en glucides totaux

La méthode utilisée est celle décrite par DUBOIS et *al.* (1951). Les glucides simples, oligosaccharides, polysaccharides et leurs dérivés réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune-orange. La réaction est sensible, et la coloration reste stable pendant plusieurs heures. L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 490 nm. La concentration des glucides totaux est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage d'une solution de glucose (annexe 1, Figure 1).

Le dosage est effectué dans une plaque à 96 puits. Une quantité de margines (30 μ l) et une gamme étalon de Glucose 5 / 10/ 20/ 40/ 80/ 120 μ g/ml sont mélangées avec 150 μ l d'acide sulfurique (H₂SO₄), le tout est incubé à 50°C pendant 15 min. Une quantité de phénol (30 μ l 5%) est ajoutée et le tout est incubé à 5 min à température ambiante. La lecture de l'absorbance à 490 nm est effectuée à l'aide d'un lecteur de plaques (Thermo Scientific).

1.2.5. Extraction et détermination de la teneur en polyphénols

Le protocole d'extraction des polyphénols totaux à partir des margines est basé sur la méthode décrite par DE MARCO et *al.*(2007) modifiée ; dont les principales étapes sont résumées dans la figure 11. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle. En effet, ALLOUCHE et *al.* (2004) ont montré que le taux d'extraction des polyphénols totaux et plus particulièrement de l'hydroxytyrosol est plus élevé avec l'acétate d'éthyle qu'avec les autres solvants. Cette étape est précédée par une acidification à pH 2 avec l'HCl (HCl 5N, la température des margines est à 25°C). Le milieu acide favorise la précipitation des protéines et la rupture des liaisons établies entre les composés phénoliques aux composants des parois cellulaires ainsi que l'hydrolyse des phénols complexes en phénols simples (CECCON et *al.*, 2001; LESAGE-MEESSEN et *al.*,2001). Aussi, OBIED et *al.*(2005) et DE MARCO et *al.*(2007) ont montré que la quantité des polyphénols totaux dans les margines acidifiées est plus élevée que dans les margines brutes. Une étape de délipidation avec l'hexane a été effectuée dans le but d'éliminer le maximum de matière grasse présente dans les margines.

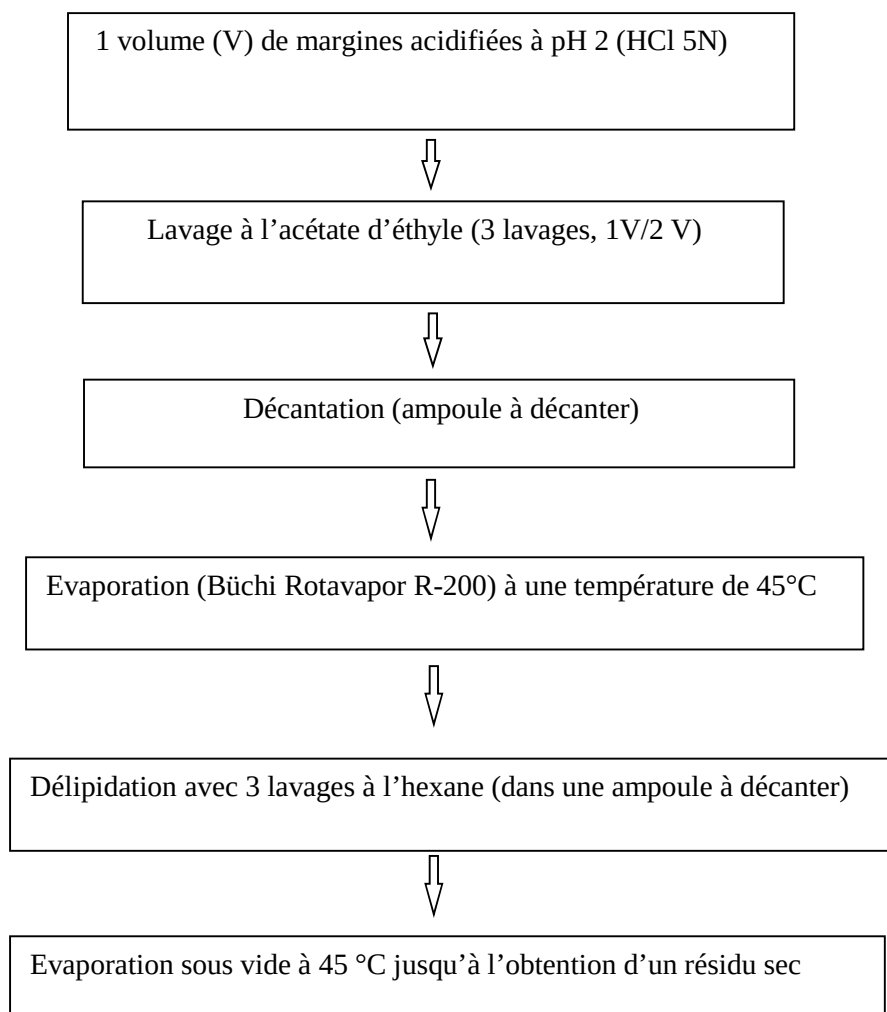


Figure 12. Les différentes étapes de l'extraction des polyphénols totaux (méthode modifiée de DE MARCO et *al.*, 2007).

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu décrite en 1965 par SINGLETON et ROSSI. Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). En présence de phénols, le réactif est réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (RIBEREAU-GAYON, 1968). La coloration produite, ayant un maximum d'absorption à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans l'échantillon étudié. Le protocole du dosage des phénols totaux est effectué dans des plaques à 96 puits. La réaction consiste à mélanger 25 μL de chaque dilution de l'échantillon étudié avec 50 μL d'eau ultra pure et 25 μL du réactif de Folin-Ciocalteu (LOBA Chemie). Après 5 min à température ambiante (à l'obscurité), 125 μL d'une solution de

carbonate de sodium Na_2CO_3 (7.5%) est ajouté (Scharlau chimie SA). Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 90 min. La Lecture de la densité optique à 765 nm (avec un Lecteur de plaque Thermo Scientific) a été effectuée contre un blanc (solvant sans échantillon) préparé dans les mêmes conditions. Une courbe d'étalonnage a été préparée par l'acide gallique comme standard dans la marge de concentration 0-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figure 2, annexe 1). Les résultats sont ainsi exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EqAG /g d'extrait). Pour une meilleure détermination du taux des phénols totaux de chaque extrait, au moins trois répétitions ont été appliquées et l'écart type fut calculé.

1.2.6. HPLC (« High-Performance Liquid Chromatography ») des margines brutes et de l'extrait phénolique

La chaîne HPLC utilisée est de type « Agilent technologies série 1260 », une HPLC en phase inverse. Elle comprend une pompe binaire, un détecteur UV à barrette de diodes, un injecteur automatique et un compartiment thermostaté ($T^\circ = 35^\circ$) pour la colonne. La séparation est réalisée sur une colonne C18 (250 mm de longueur x 4,6 mm de diamètre x 3.5 μm comme taille des particules). La détection est effectuée à 280 nm. Les composés phénoliques présents dans les margines brutes et dans l'extrait de margines ont été identifiés par comparaison à des standards commerciaux (Acide gallique, Acide parahydroxyphenyl acétique (p-HPA), le dihydroxy HPA (3,4-DHPA), le tyrosol, hydroxytyrosol, acide vanillique, acide p-coumarique, acide cafféique et oleuropéine) et par vérification de leurs spectres d'absorption (absorbance en fonction de la longueur d'onde) correspondants.

La phase mobile utilisée est composée de deux solutions : 0,1% acide acétique dans l'eau (A) et 100% acétonitrile (B) avec un débit de 0,5 ml/min. Le cycle d'analyse s'étend sur 50 minutes avec un gradient qui varie comme illustré dans le tableau suivant :

Tableau IV. Variations des gradients de concentration des deux phases mobiles pendant le cycle d'analyse de 50 minutes.

Temps (min)	Phase mobile (A) (% v/v)	Phase mobile (B) (% v/v)
0-15	90%-60%	10%-40%
15- 35	60%-0%	40%-100%
35-38	0%	100%
38-42	0%-90%	100%-10%
42-50	90%	10%

2. Résultats et discussion

Les résultats de la caractérisation des margines sont regroupés dans le tableau V

Tableau V. Caractérisation des margines provenant d'une huilerie moderne (le système de centrifugation à trois phases).

PARAMETRE	MARGINES
pH (à 20° C)	4,65
Matière sèche (g/L)	50,5 ± 1,32
Glucides totaux (g/L)	5,16 ± 0,56
Lipides (g/L)	0,6 ± 0,04
Protéines (Azote total) g/L	2,78 (0,0431)
Valeur énergétique (Kcal/KJ) / L de margines	37,16 / 155,47
Polyphénols totaux dans l'extrait phénolique des margines (g/L)	1,02 ± 0,07
Polyphénols totaux dans les margines brutes (g/L)	2,59 ± 0,18
Hydroxytyrosol dans les margines brutes (mg/ml)	0,255

2.1. Le pH

La valeur enregistrée est de 4,65 (à 20 °C). La valeur de pH 4,88 est également trouvée dans des margines d'une autre région de Kabylie (SENANI-OULARBI et *al.*, 2018). Elle se situe dans la limite de la fourchette de l'intervalle de (4,7 – 5,7) cité par ZBAKH et EL ABBASI (2012). Ces résultats montrent que les margines étudiées sont des effluents acides. L'acidité des margines selon la littérature est peut être due à la présence des acides organiques comme les acides phénoliques (HAMDI, 1991) et les acides gras comme l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique (AMARAL et *al.*, 2008 ; ASFI et *al.*, 2012).

2.2. Teneur en matière sèche

La teneur moyenne en matière sèche pour les margines que nous avons utilisé est de l'ordre de $[50,5 \pm 1,32]$ g/L, ce qui est très inférieur à une valeur trouvée dans les margines de la région de Beni douala et qui est de 118,5 g/L de margines (SENANI-OULARBI et *al.*, 2018). Cette valeur est proche de celle trouvée par DANELLAKIS et *al.* (2011) pour des margines issues d'une huilerie située à Patras (Grèce) qui est de $[64,68 \pm 1,03]$ g/L et par rapport à celle trouvée par ACHAK et *al.* (2008) qui est de $[56,75 \pm 2,51]$ g/L. Les variations de la teneur en matière sèche peuvent être dues à des paramètres climatiques et géologiques, au stade de maturation de l'olive mais essentiellement à la quantité d'eau rajoutée au cours des procédés d'extraction de l'huile (EL-ABBASSI et *al.*, 2011).

2.3. Teneur en matière grasse

La teneur moyenne en matière grasse résiduelle présente dans les margines étudiées est de l'ordre de $[0,6 \pm 0,04]$ g/L. La valeur trouvée dans les margines d'une autre région de la Kabylie est de 1,32 g/L (SENANI-OULARBI et *al.*, 2018). La décantation effectuée sur les margines utilisées expliquerait la faible teneur en matière grasse. Cependant, ces deux valeurs de la région de Tizi Ouzou restent très inférieures à celle trouvée par BILKA et *al.* (2009) en utilisant la méthode gravimétrique pour des margines issues d'une huilerie moderne à trois phases localisée à Patras (Grèce) qui est de l'ordre de $[10,78 \pm 1,39]$ g/L. En général le taux de lipides dans les margines varie de 0,03 % à 4,25 % (DERMECHE et *al.*, 2013). La différence dans la teneur en matière grasse est en relation avec la qualité, le degré de maturation des olives et le mode de trituration (AMARAL et *al.*, 2008).

2.4. Teneur en glucides totaux

La teneur moyenne en glucides totaux présente dans les margines utilisées est de l'ordre de $[5,16 \pm 0,56]$ g/L. Celle trouvée dans les margines de la région de Beni Douala est plus supérieure, elle est de 13,50 g/L (SENANI-OULARBI et *al.*, 2018). Celle rapportée par LEULMI (2011) pour les margines issues d'une huilerie située dans la région de Jijel (Algérie) est aussi supérieure, elle est de 39,91 g/L. La teneur en sucre totaux de nos margines est située dans l'intervalle cité par ZBAKH et EL ABBASSI (2012) qui est de 1,3 à 8,79 g/L. La faible teneur enregistrée dans nos margines est probablement dû à la présence d'une fermentation pendant le stockage (HAMDI, 1991). Dans notre laboratoire, l'étude menée par NADOUR et *al.* (2015) sur des margines locales de Tizi-Ouzou (Kabylie) a confirmé la présence des constituants de la paroi cellulaire de l'olive comme les pectines, les hémicellulose et la cellulose, mais également des monosaccharides dont le glucose est le dominant. D'autres oses neutres et acides ont été identifiés comme : le rhamnose, le galactose, l'arabinose, le mannose, le xylose et l'acide galacturonique. L'acide glucuronique et le fucose apparaissent comme des monosaccharides mineurs.

2.5. Teneur en protéines

La teneur en Azote totale obtenus dans nos margines est de l'ordre de 0,431 g/L, ce qui correspond à environ 2,78 g/L de protéines (les protéines contiennent environ 15,5 % d'azote). La teneur en protéines des margines utilisées est supérieure à celle trouvée par SENANI-OULARBI et *al.* (2018), qui est de 1,24 g/L, cependant, très proche de celle rapportée par ASFI et *al.* (2012) pour les margines issues de Kalamata une ville située au sud de la Grèce et qui est de l'ordre de $[2,67 \pm 0,75]$ g/L. Des valeurs plus faibles ont également été rapportées comme celle trouvée par LOPES et *al.* (2009) pour les margines portugaises qui est de l'ordre de 0,30 g/L.

2.6. Teneur en polyphénols

Le résultat des dosages des polyphénols totaux dans l'extrait phénolique est de $[109,4 \pm 7,9]$ mg EAG/g extrait (EAG : équivalent d'acide gallique) ce qui correspond à $[1,02 \pm 0,07]$ g/L de margines. Le dosage des polyphénols directement dans les margines a été également effectué et la valeur trouvée est de $[2,59 \pm 0,18]$ g/L. L'extraction a été effectuée avec de l'acétate d'éthyle, ce solvant permet en général l'extraction de petites molécules plus polaires et non pas les polyphénols totaux ce qui expliquerait un contenu en polyphénols dans les margines supérieur à celui présent dans l'extrait phénolique.

La valeur trouvée dans l'extrait phénolique qui est $[1,02 \pm 0,07]$ g/L de margines est très inférieure à celle trouvée par SENANI-OULARBI et *al.* (2018) qui est de 6,27 g/L de margines. Aussi, des valeurs supérieures de l'ordre de $[4 \pm 0,6]$ g/L ont été trouvées par EL-ABBASSI et *al.* (2011) pour les margines de la région de Marrakech (Maroc) et avec le même procédé d'extraction. Egaleme nt pour DE MARCO et *al.* (2007) qui rapportent une valeur de 2,5 g/L pour les margines de la province Benevento (Italie). Cette variation de la teneur en polyphénols dépend de plusieurs facteurs qui sont : les conditions climatiques et géographiques (ZIOGAS et *al.*, 2010), l'état physiologique et l'âge de la plante (DELEONARDIS et *al.*, 2008), la variété de l'olivier, les conditions de culture et le degré de maturation des olives (FIESTAS ROS DE URSINOS et BORJA, 1992 ; ZIOGAS et *al.*, 2010). En général, la teneur en polyphénols, varie entre 0,63 % à 5,45 % (ZBAKH et EL ABBASSI, 2012 ; DERMECHE et *al.*, 2013).

2.7. Résultats de l'analyse du profil chromatographique de l'extrait phénolique des margines

La HPLC réalisée sur nos margines brutes et sur l'extrait phénolique a permis de mettre en évidence juste deux composés phénoliques qui sont l'hydroxytyrosol et le tyrosol (Figure 13 et 14). Le chromatogramme ne montre pas la rétention des autres composés des margines et de l'extrait phénolique, probablement ils sont présents en très faible taux.

HPLC réalisée sur l'extrait phénolique des margines

1 mg d'extrait phénolique /ml (900 μ L éthanol + 100 μ L eau).

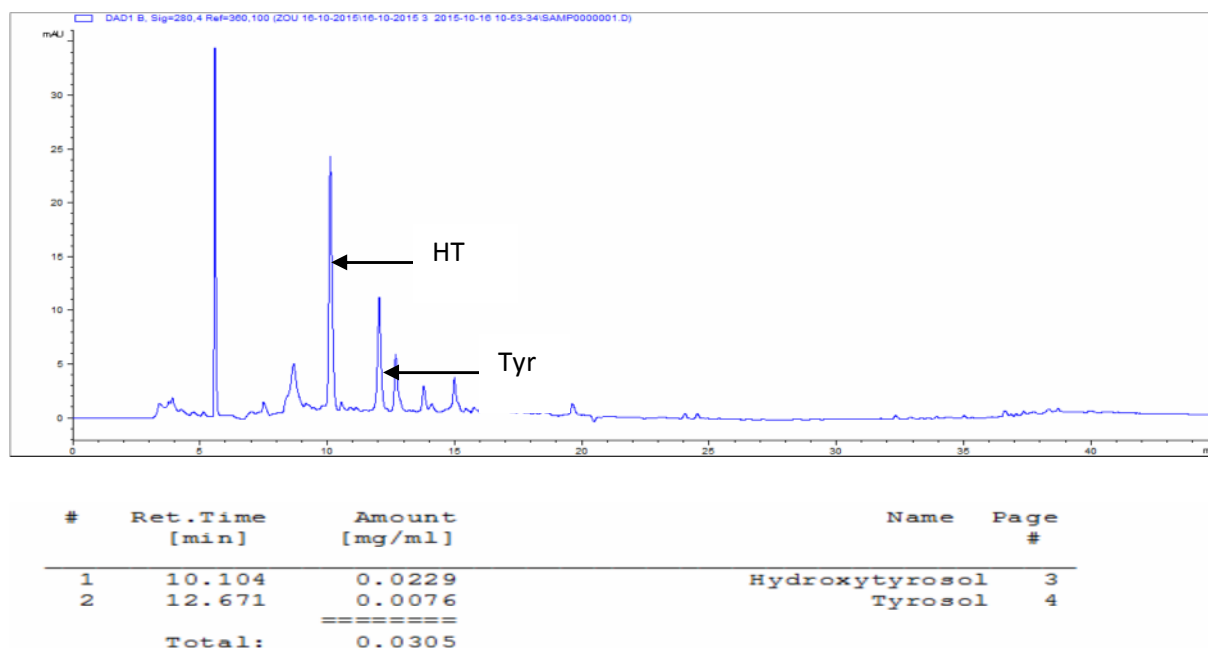


Figure 13. Chromatogramme HPLC à 280 nm de l'extrait phénolique. Débit : 0,5 ml/min. Le temps de rétention de l'Hydroxytyrosol est de 10.104 min. Le temps de rétention de tyrosol est de 12.671 min. HT : Hydroxytyrosol , Tyr : Tyrosol.

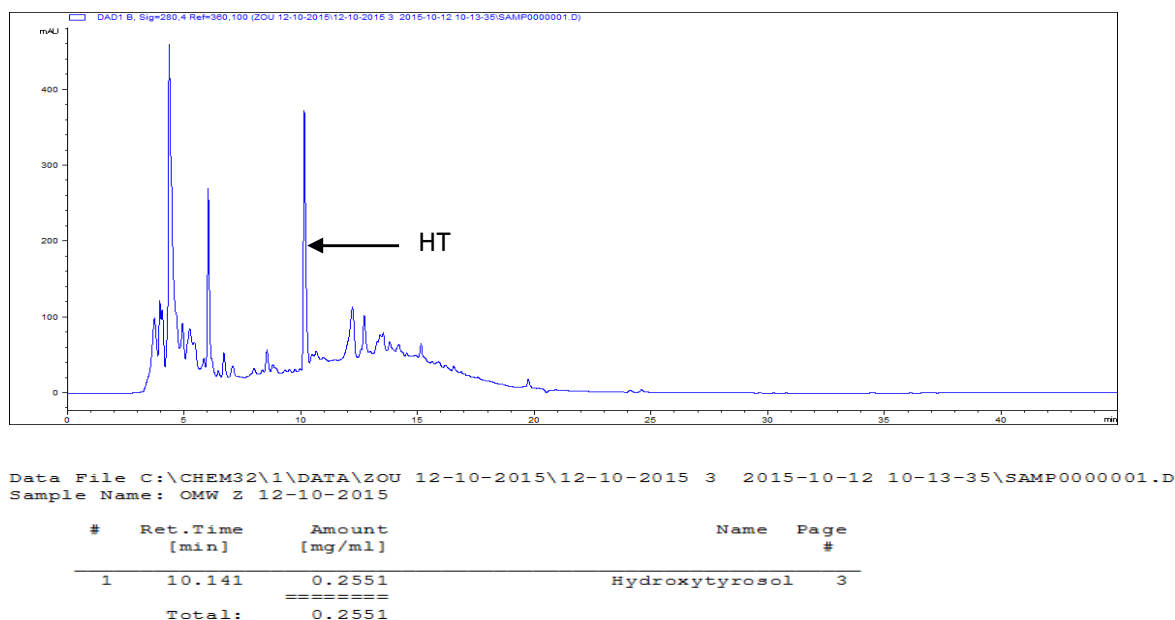
HPLC réalisée sur des margines brutes (1 ml de margines)

Figure 14. HPLC à 280 nm des margines brutes. Débit : 0,5 ml/min. Le Temps de rétention de l'Hydroxytyrosol est de 10.141 min. HT : Hydroxytyrosol.

La teneur en Hydroxytyrosol trouvée dans nos margines à travers sa concentration dans l'extrait phénolique est de 215, 26 mg/L de margines, et celle de tyrosol est de 71,44 mg /L de margines (Figure 16). La valeur de l'hydroxytyrosol trouvée directement dans les margines brutes est de 255, 1 mg/L de margines (Figure 17). Ces deux valeurs de l'hydroxytyrosol sont très proches. La composition phénolique établie au niveau de notre laboratoire LABAB des margines d'une autre région de la Kabylie (Beni Douala) est représentée dans le tableau VI.

Tableau VI. Concentration des composés phénoliques identifiés dans l'extrait phénolique des margines (SENANI-OULARBI et *al.*, 2018).

Composés phénoliques	Concentration (g en EAG*/L de margines)
Acide gallique	0,399
Hydroxytyrosol	3,402
Tyrosol	0,300
Acide <i>p</i> - coumarique	0,600
Acide protocatechique	0,900
Oleuropéine	0,054
Acide vanillique	0,099
Acide caféique	0,075
Polyphénols totaux	6,27

ELABBASSI et *al.*(2012) ont identifiés six pics par HPLC UV à 280 nm : l'acide gallique, l'hydroxytyrosol-4- β -glucoside, l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l' oleuropéine aglycone. La valeur de l'hydroxytyrosol et du tyrosol rapporté par ELABBASSI et *al.*(2012) et de 3,76 g/L et 2,49 g/L respectivement. La teneur en polyphénols totaux (ppt) égale à $6,11 \pm 0,2$ g/L de margines pour les margines marocaines issues d'une huilerie moderne à trois phases et avec le même protocole d'extraction. Aussi l'étude de DE MARCO et *al.* (2007) sur les margines issus d'une huilerie moderne à trois phases de la

province de Benevento (Italy) et avec le même protocole d'extraction a montré une composition de 1,224 g /L de margines pour l'hydroxytyrosol et de 0,208 g /L de margines pour le tyrosol. Les concentrations de l'hydroxytyrosol et du tyrosol rapportées par toutes ces études restent très supérieures à celle trouvée dans notre étude.

Partie expérimentale II : Effets des margines et des polyphénols extraits des margines sur les dyslipidémies

1. Effets des margines sur des paramètres métaboliques chez le rat Wistar soumis à un régime cafeteria après 13 semaines de traitement

1.1. Matériel et méthodes

1.1.1. Choix et préparation des animaux

Nous avons utilisé dans cette expérimentation 30 rats blancs ou albinos [espèce : *Rattus norvegicus*, variété : *Wistar*] ayant un poids initial entre 218 et 250 g. Les rats sont issus de l'institut Pasteur (Alger) et déposés au niveau d'un laboratoire situé au niveau de la faculté de Médecine (ISM de L'UMMTO). Ils sont maintenus à cet endroit dans les conditions favorables à une température de 20 à 25°C et une luminosité de 12h. Afin d'éviter les variabilités inter-sexe, toutes nos expérimentations sont réalisées sur des rats Wistar mâles. Les rats sont séparés et répartis en 4 lots (3 rats par cage, figure 15) suivant le régime consommé :

- Lot 1 (n= 6) : régime standard + eau de robinet, rats normaux (RN)
- Lot 2 (n= 9) : régime standard + margines diluées dans l'eau, rats normaux traités avec les margines (RNM)
- Lot 3 (n=6) : régime cafeteria + eau de robinet, rats cafeteria témoins (RCT)
- Lot 4 (n=9) : régime cafeteria + margines diluées dans l'eau, rats cafeteria traités avec les margines (RCM).



Figure 15. Disposition des rats dans les cages

La durée de l'expérimentation est de 13 semaines, la quantité de margines administrée est de 1 ml de margines diluée dans 10 ml d'eau (1/11), ce qui correspond à 50,5 mg de matière sèche /11 ml d'eau. Cette eau est mise à la disposition des animaux dans des biberons couverts (à l'abri de la lumière).

Pour évaluer la quantité approximative des margines consommée quotidiennement par chaque animal, nous avons établi le tableau suivant qui indiquent la consommation d'eau quotidienne pour chaque animal pendant 11 jours successifs (T° ambiante 20 à 25 °C) (annexe 1).

	Jour 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Moyenne ± S.E.M
Quantité d'eau consommée (ml /24 h)	36,66	33,33	28,33	26,66	28,33	26,66	30	28,33	35	26,66	31,66	30,14 ± 3,53

En se basant sur la quantité des margines diluée dans l'eau de boisson (1/11), et la quantité d'eau consommée en 24 h (environ 30 ml, annexe 1), la quantité des margines consommée par chaque animal est d'environ 2,72 ml / 24 h (évaluation approximative).

Le poids des rats est noté chaque semaine. A la fin de l'expérimentation les animaux sont décapités après une période de jeûne de 8 h, le sang est recueilli dans des tubes secs pour les dosages des paramètres métaboliques. Pour l'évaluation des dyslipidémies, les dosages concernent le cholestérol total, les triglycérides, les HDL-cholestérol et la glycémie. Pour l'évaluation de la toxicité des margines sur des organes tels que le foie et les reins, des dosages sanguins de différents paramètres indicateurs des fonctions de ces deux organes ont été effectués. Ces paramètres sont les taux d'urée, l'acide urique, la créatinine, la bilirubine totale, les protéines totales et les transaminases (TGO : glutamyl-oxaloacétate-transférase et TGP : glutamyl-pyruvate-transaminase). Les dosages sont réalisés le jour même après le sacrifice et l'appareil utilisé est un automate d'analyse biochimique Abbot Architect Ci 4100 (annexe 3). Pour compléter l'étude sur l'éventuel toxicité des margines, les organes (foie et reins) sont prélevés rapidement et mis dans du formol (10 %) pour la réalisation des coupes histologiques.

1.1.2. Les régimes alimentaires utilisés

Le régime standard administré à nos animaux est fabriqué par « SARL, la production locale » (Aliment du Bétail en Tourteau Agglomères, Bouzaréah, Alger). Le régime standard est sous forme de granulés complets constitué d'un mélange de produits céréaliers broyés comme l'avoine, le riz, le blé ainsi que le maïs.

Le régime cafeteria est utilisé dans toutes nos expérimentations car il est inducteur d'obésité chez les animaux de laboratoire (Figure 16). Il est composé de 50% de régime standard et de 50% d'un mélange de : pâté – biscuits secs – fromage – chips – cacahuète – chocolat respectivement dans les proportions : 2 : 2 : 2 : 1 : 1 : 1 (DARIMONT *et al.*, 2004). Ces produits alimentaires qui constituent ce mélange hyperlipidique hypercalorique sont de fabrication locale, ils sont présentés dans la figure 17.

Les animaux soumis au régime cafeteria : chaque rat reçoit quotidiennement environ 30 g de régime cafeteria et 30 g de régime standard.

Les animaux soumis au régime standard : chaque rat reçoit quotidiennement 60 g de régime standard.



Figure 16. Rat en surpoids à droite (régime cafétéria), rat avec un poids normal à gauche (régime standard)



Figure 17. Produits alimentaires locaux constituant le régime cafeteria

La caractérisation du régime standard est effectuée dans le laboratoire OVOLAB (Tizi Ouzou) selon les procédés industriels. La caractérisation du régime cafeteria s'appuie sur les données figurées sur les produits (tableau VII, annexe 2).

Tableau VII. Comparaison entre les deux régimes alimentaires (standard et cafeteria)

	Régime standard (100 g)	Régime cafeteria (100 g)
Lipides	4,53 g	24,34 g
Glucides	2 g	13,86 g
Protéines	19 g	10,18 g
Valeur énergétique	124,77 Kcal (521, 53 KJ)	315,22 Kcal (1317,61 KJ)

1.1.3. Histologie

Les coupes histologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire d'Anatomie -Pathologie, CHU Nedir Mohamed, Tizi ousou. Les techniques d'histologie pour microscopie photonique requièrent plusieurs étapes successives : la fixation, l'inclusion, les coupes, les colorations puis le montage.

La fixation : le prélèvement d'organes doit être immédiat après la mort de l'animal, les organes sont découpés en petits morceaux et sont directement mis dans du formol (formaldéhyde à 10%).

L'inclusion : pour éliminer toute trace de fixateur, les organes subissent une déshydratation par des passages dans des bains d'alcool (éthanol) de degré croissant (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, puis enfin 100°). Les organes sont ensuite débarrassés de leur éthanol par des bains d'un solvant miscible à la paraffine (le xylène ou le toluène), cette étape est appelée clarification (ou éclaircissement). Une fois totalement imprégnés, les organes sont placés dans de la paraffine fondue (portée à 56/58°C), la chaleur provoque l'évaporation du solvant (et sa dissolution dans la paraffine), les espaces ainsi libérés sont remplis par la paraffine. Puis la paraffine est placée dans de petits moules, à température ambiante, ce qui provoque son durcissement et donc la rigidification des fragments d'organes prélevés. On procède alors au démoulage : on obtient des fragments d'organes inclus dans des blocs de paraffine.

Les coupes de 5 μm sont réalisées avec un microtome, les coupes sont étalées et collées (par chauffage) sur des lames de verre. Avant les colorations des tissus, la paraffine doit être éliminée, on procède donc au déparaffinage, qui consiste à passer les lames dans des bains de toluène ou du xylène afin de dissoudre la paraffine. On effectue ensuite une réhydratation par passage des lames dans des bains d'alcool de degré décroissant (de 100° à 70°, voire 50/40°).

Le montage des lames : les lames sont déshydratées grâce à des bains en toluène, puis on colle des lamelles de verre par-dessus (avec la résine synthétique). La coloration est effectuée à l'hématoxyline-éosine (HE).

1.1.4. Analyse statistique

Toutes les données de notre travail ont été exprimées en tant que moyennes $\pm$ écart-types. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA à un facteur, suivi par le test de Tukey- Kramer pour les comparaisons multiples des moyennes. Le niveau de probabilité a été fixé à $p < 0,05$ comme statistiquement significatif. Le logiciel utilisé est Minitab 18.

1.2. Résultats

1.2.1. Effets des margines sur le poids corporel

Après 13 semaines (figure 18), le régime cafeteria a induit une augmentation significative du poids corporel (RN $343 \pm 30,8$ g vs RCT $408,8 \pm 36$ g), soit une augmentation de 19,18 %.

L'incorporation des margines dans l'eau de boisson n'a pas induit de variations significatives chez les rats normaux (RN $343 \pm 30,8$ g vs RNM $330,2 \pm 16,84$ g) et aussi chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $408,8 \pm 36$ g vs RCM $394,5 \pm 14,46$ g).

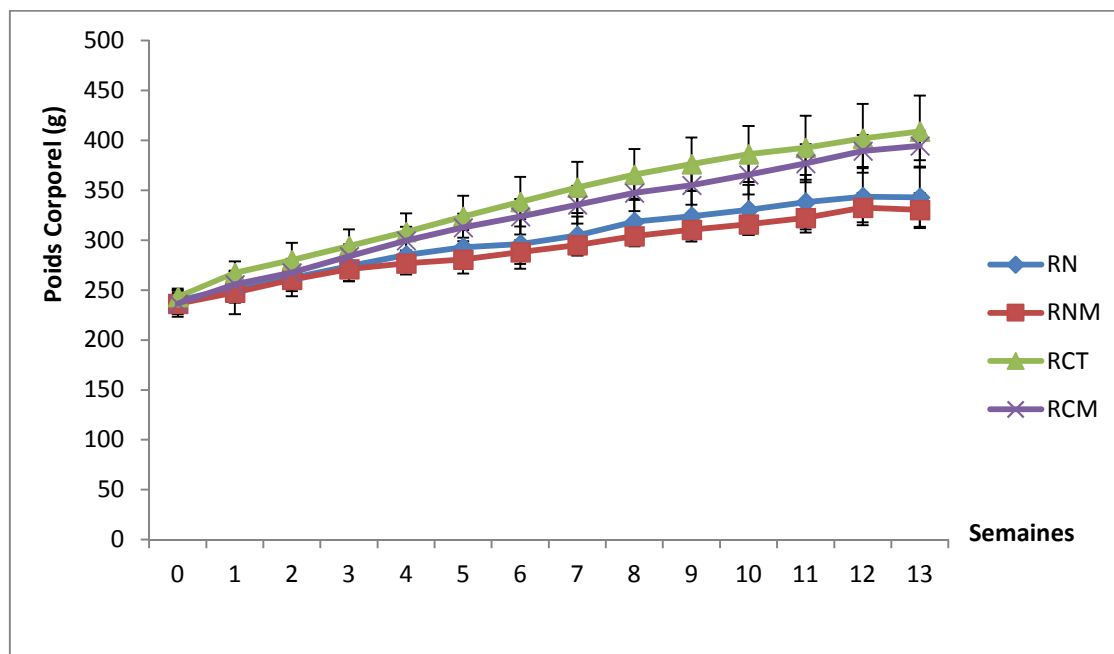


Figure 18. Effets des margines sur le poids corporel après 13 semaines de traitement.

RN : rats normaux , RNM : rats normaux traités avec les margines (1ml/11 ml d'eau), RCT : rats cafeteria témoins, RCM : rats cafeteria traités avec les margines (1 ml/11 ml d'eau).

1.2.2. Effets des margines sur le bilan lipidique et sur la glycémie

Cholestérol total

Après 13 semaines de traitement (figure 19), le régime cafeteria n'a pas eu d'effet sur le taux du cholestérol total (RN $1,096 \pm 0,151$ g/L vs RCT $1,064 \pm 0,114$ g/L). Cependant, l'incorporation des margines dans l'eau de boisson a baissé le taux de ce paramètre d'une façon significative aussi bien chez les rats normaux (RN $1,096 \pm 0,151$ g/L vs RNM $0,883 \pm 0,075$ g/L) que chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $1,064 \pm 0,114$ g/L vs RCM $0,862 \pm 0,061$ g/L), soit une baisse de 19,43 % et de 18,98 % respectivement.

Triglycérides

Contrairement au taux du cholestérol total, le taux des triglycérides a augmenté d'une façon significative après 13 semaines de régime cafeteria (RN $0,8 \pm 0,188$ g/L vs RCT $2,05 \pm 0,091$ g/L), soit une augmentation de 156,25 %. L'incorporation des margines dans l'eau de boisson a induit une baisse significative du taux des triglycérides chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $2,05 \pm 0,091$ g/L vs RCM $1,445 \pm 0,243$ g/L), soit une baisse de 29,51 %, ce qui n'est pas le cas chez les rats normaux (RN $0,8 \pm 0,188$ g/L vs RNM $0,845 \pm 0,202$ g/L).

HDL-Cholestérol

Le régime cafeteria, après 13 semaines de traitement, n'a pas induit de variation significative du taux des HDL-Cholestérol (RN $0,280 \pm 0,027$ g/L vs RCT $0,273 \pm 0,045$ g/L). L'administration des margines a augmenté d'une façon significative le taux de ce paramètre chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $0,273 \pm 0,045$ g/L vs RCM $0,330 \pm 0,0352$ g/L), soit une augmentation de 20,87 %. Cependant pas de variation chez les rats normaux (RN $0,28 \pm 0,027$ g/L vs RNM $0,261 \pm 0,0203$ g/L).

Glycémie

Le régime cafeteria a induit une augmentation significative de la glycémie après 13 semaines de traitement (RN $0,760 \pm 0,049$ g/L vs RCT $1,106 \pm 0,154$ g/L), soit une augmentation de 45,52 %. L'incorporation des margines dans l'eau de boisson a induit une diminution significative de la glycémie chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $1,106 \pm 0,154$ g/L vs RCM $0,843 \pm 0,068$ g/L), soit une baisse de 23,77 %, cependant cette baisse est non significative chez les rats normaux (RN $0,76 \pm 0,049$ g/L vs RNM $0,61 \pm 0,0604$ g/L).

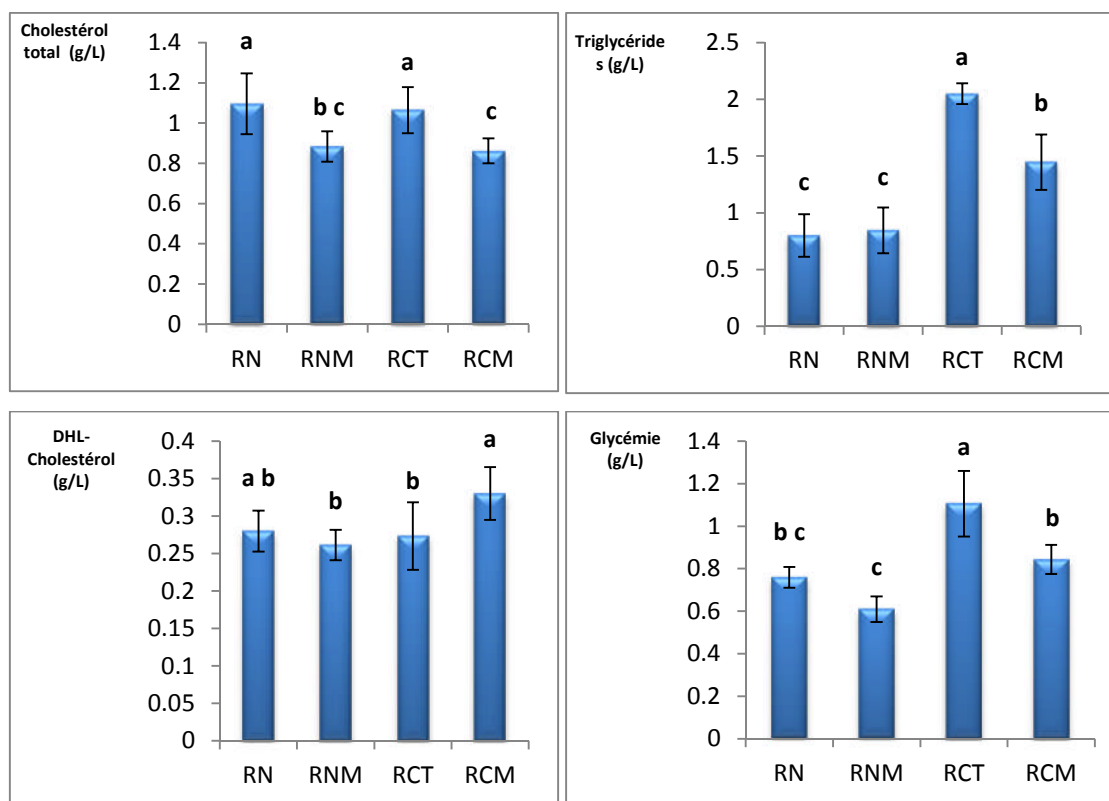


Figure 19. Effets des margines sur le bilan lipidique et sur la glycémie après 13 semaines de traitement. RN : rats normaux , RCT : rats cafeteria témoins , RNM : rats normaux traités avec les margines (1ml /11 ml d'eau), RCM : rats cafeteria traités avec les margines (1 ml/11 ml d'eau). Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ S.E.M. Les différentes lettres (a, b et c) représentent des différences significatives entre les groupes (test de Tukey- Kramer, $P < 0,05$).

1.2.3. Effets des margines sur quelques paramètres indicateurs des fonctions hépatique et rénale

Urée

Le régime cafeteria n'a pas eu d'effet sur le taux d'urée après 13 semaines de traitement (RN $0,566 \pm 0,070$ g/L vs RCT $0,478 \pm 0,078$ g/L) (figure 20). L'administration orale des margines pendant 13 semaines n'a pas affecté le taux d'urée, aussi bien chez les animaux normaux (RN $0,566 \pm 0,070$ g/L vs RNM $0,502 \pm 0,041$ g/L) que chez les animaux soumis au régime cafeteria (RCT $0,478 \pm 0,078$ g/L vs RCM $0,474 \pm 0,032$ g/L).

Créatinine

Le taux de la créatinine n'a pas subi de variation significative après 13 semaines de régime cafeteria (RN $10,6 \pm 0,894$ mg/L vs RCT $9,6 \pm 0,548$ mg/L). L'introduction des margines dans l'eau de boisson pendant 13 semaines n'a pas eu d'effet sur le taux de ce paramètre, aussi bien

chez les animaux normaux (RN $10,6 \pm 0,894$ mg/L vs RNM $9,286 \pm 1,380$ mg/L) que chez les animaux soumis au régime cafeteria (RCT $9,6 \pm 0,548$ mg/L vs RCM $9,75 \pm 0,886$ mg/L).

Bilirubine totale

Le régime cafeteria n'a eu aucun effet sur le taux de bilirubine totale après 13 semaines de traitement (RN $1,2 \pm 0,447$ mg/L vs RCT $1,4 \pm 0,548$ mg/L). L'administration orale des margines pendant 13 semaines n'a pas affecté le taux de ce paramètre sanguin aussi bien chez les animaux normaux (RN $1,2 \pm 0,447$ mg/L vs RNM $1,714 \pm 0,488$ mg/L) que chez les animaux soumis au régime cafeteria (RCT $1,4 \pm 0,548$ mg/L vs RCM $1,375 \pm 0,518$ mg/L).

Transaminase TGO

Le taux de TGO a diminué d'une façon significative après 13 semaines de régime cafeteria (RN $432,2 \pm 60,9$ UI/L vs RCT $268,4 \pm 88,5$ UI/L), soit une baisse de 37,89 %. L'introduction des margines dans l'eau de boisson pendant 13 semaines n'a pas eu d'effet sur le taux de TGO aussi bien chez les animaux normaux (RN $432,2 \pm 60,9$ UI/L vs RNM $423,6 \pm 55,4$ UI/L) que chez les animaux soumis au régime cafeteria (RCT $268,4 \pm 88,5$ UI/L vs RCM $332,6 \pm 99,6$ UI/L).

Transaminase TGP

Le taux de TGP a baissé d'une façon significative après 13 semaines de régime cafeteria (RN $140,4 \pm 31,9$ UI/L vs RCT $64,20 \pm 10,47$ UI/L), soit une diminution de 54,27 %. L'introduction des margines dans l'eau de boisson pendant 13 semaines n'a pas eu d'effet sur le taux de TGP aussi bien chez les animaux normaux (RN $140,4 \pm 31,9$ UI/L vs RNM $115,80 \pm 13,16$ UI/L) que chez les animaux soumis au régime cafeteria (RCT $64,20 \pm 10,47$ UI/L vs RCM $74,13 \pm 13,27$ UI/L).

Protéines totales

Le régime cafeteria n'a pas affecté le taux des protéines totales après 13 semaines de traitement (RN $97,20 \pm 14,20$ g/L vs RCT $90,20 \pm 6,53$ g/L). L'administration orale des margines pendant 13 semaines n'a pas d'effet sur le taux de ce paramètre sanguin, aussi bien chez les animaux normaux (RN $97,20 \pm 14,20$ g/L vs RNM $90 \pm 5,45$ g/L) que chez les animaux soumis au régime cafeteria (RCT $90,20 \pm 6,53$ g/L vs RCM $89,88 \pm 7,40$ g/L).

Acide urique

Le régime cafeteria a induit une baisse significative du taux d'acide urique (RN $29,2 \pm 1,095$ mg/L vs RCT $17,5 \pm 1,732$ mg/L) (figure 31), soit une diminution de 40,06 %. L'administration orale des margines n'a pas affecté le taux de ce paramètre aussi bien chez les animaux normaux (RN $29,2 \pm 1,095$ mg/L vs RNM $26,67 \pm 3,01$ mg/L) que chez les animaux soumis au régime cafeteria (RCT $17,5 \pm 1,732$ mg/L vs RCM $20,13 \pm 5,51$ mg/L).

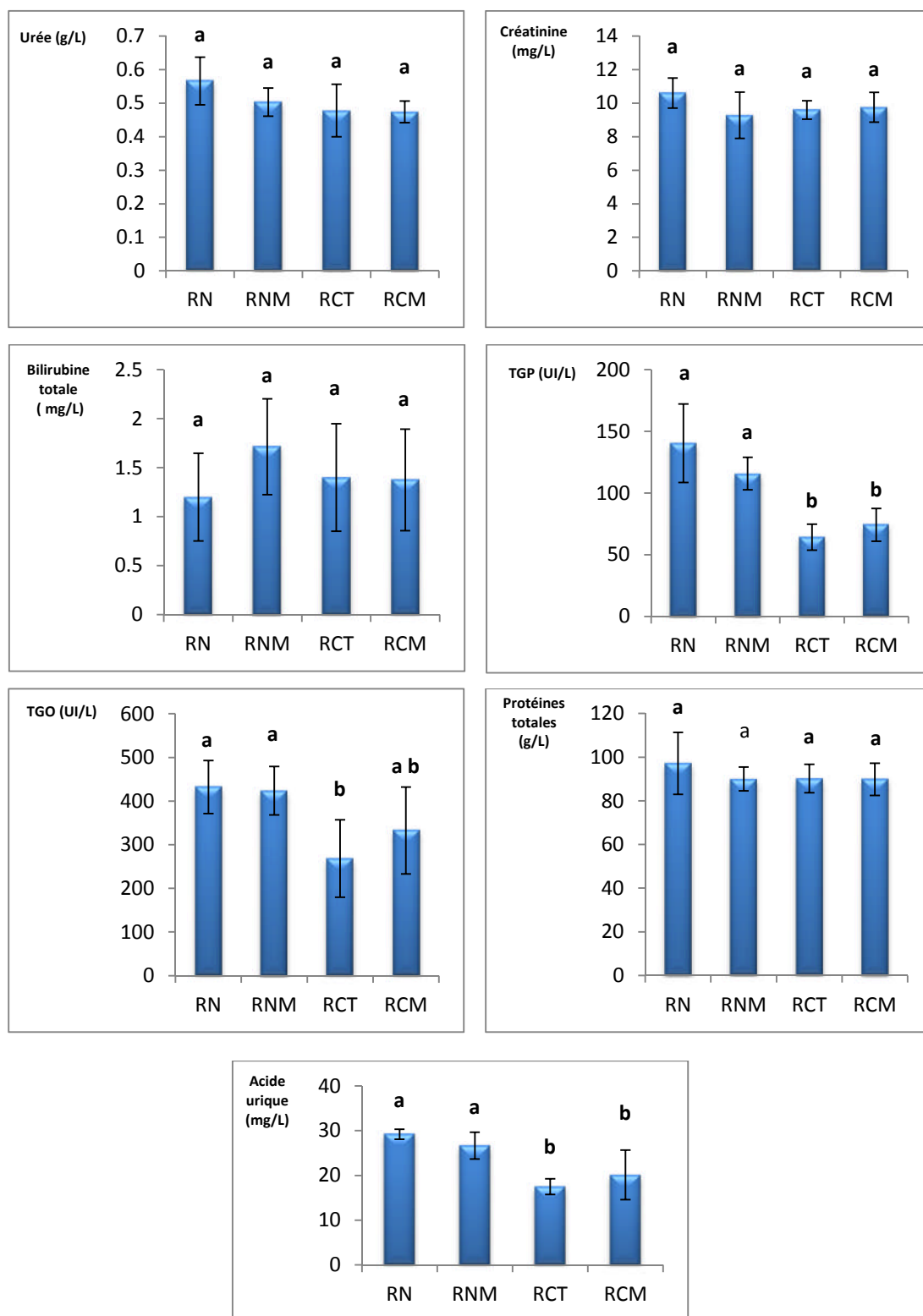


Figure 20. Effets des margines sur quelques paramètres indicateurs des deux fonctions hépatique et rénale après 13 semaines de traitement avec les margines. RN : rats normaux , RCT : rats cafeteria témoins , RNM : rats normaux traités avec les margines (1 ml/11 ml d'eau), RCM : rats cafeteria traité avec les margines (1 ml/11 ml d'eau). Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ S.E.M. Les différentes lettres (a et b) représentent des différences significatives entre les groupes (test de Tukey- Kramer, $P < 0,05$).

En se basant sur ces résultats, les margines ne semble pas affecter les deux fonctions rénale et hépatique, cependant un contrôle histologique est primordiale pour une plus grande certitude.

1.2.4. Contrôles histologiques

1.2.4.1. Contrôle hépatique

Les photomicrographies présentées dans la figure 21 nous montre aucune différence histologique entre le foie des rats normaux (RN) et les rats normaux traités avec les margines (RNM). Pour les animaux soumis au régime cafeteria (RCT), les coupes histologiques révèlent la présence de quelques vacuoles intracytoplasmiques optiquement vide qui reflètent le dépôt des triglycérides (dissouts dans le xylène). Ce sont ces vacuoles, quand elles sont très importantes qui provoquent des lésions hépatocytaires appelées stéatoses. Ces vacuoles ne sont pas observées dans les coupes appartenant aux animaux soumis au régime cafeteria (RCM).

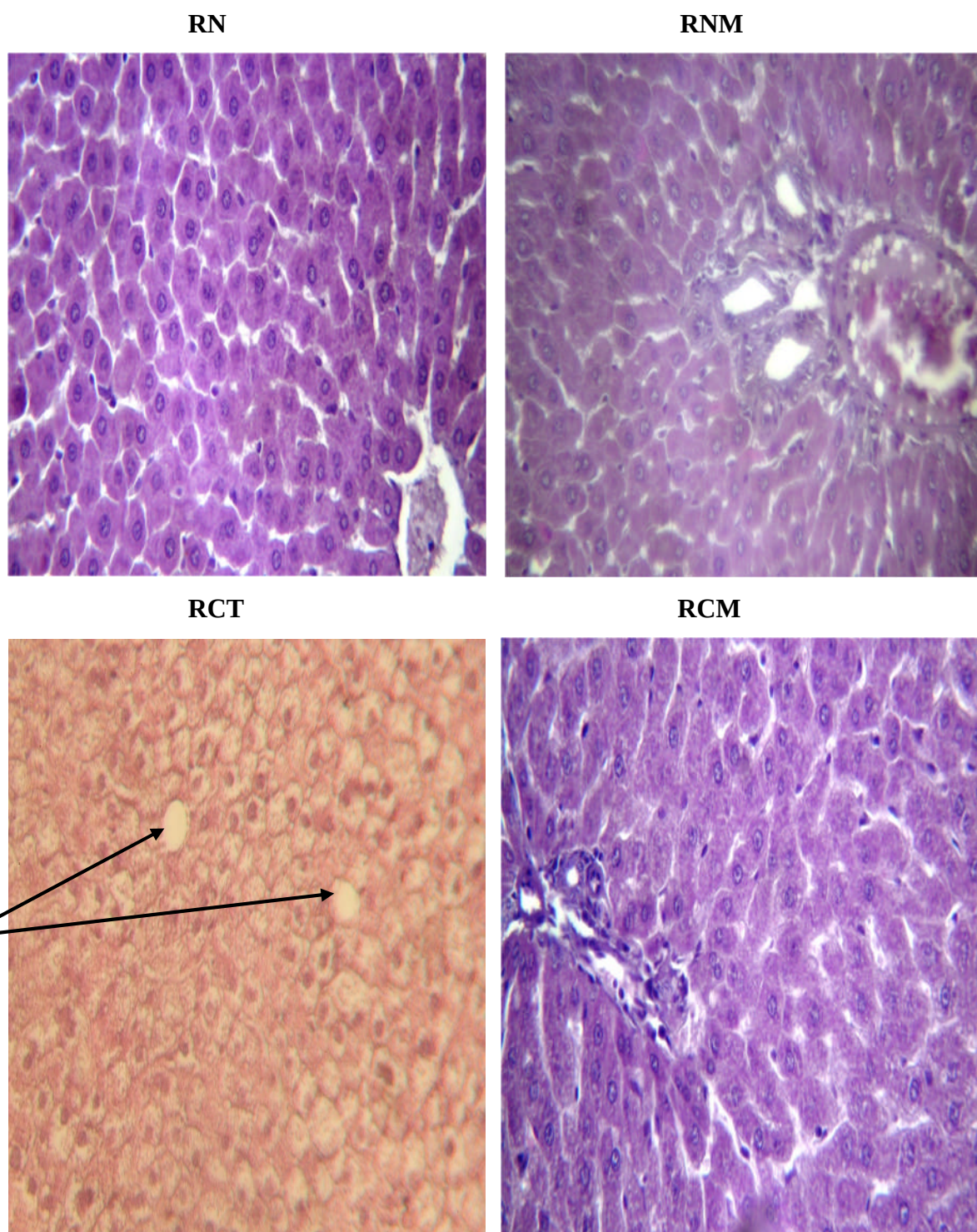


Figure 21. Coupes histologiques du foie de différents groupes d'animaux. RN : Rats normaux, RNM : rats normaux traités avec les margine, RCT : rats cafétéria témoins, RCM : rats cafétéria traités avec les margines. Coloration hématoxyne –éosine ,G $\times 400$.

1.2.4.2. Contrôle rénal

Les photomicrographies appartenant aux reins des quatre groupes d'animaux (RN, RNM, RCT et RCM) ne montrent aucune anomalie histologique telle qu'une lésion glomérulaire ou une fibrose rénale (figure 22).

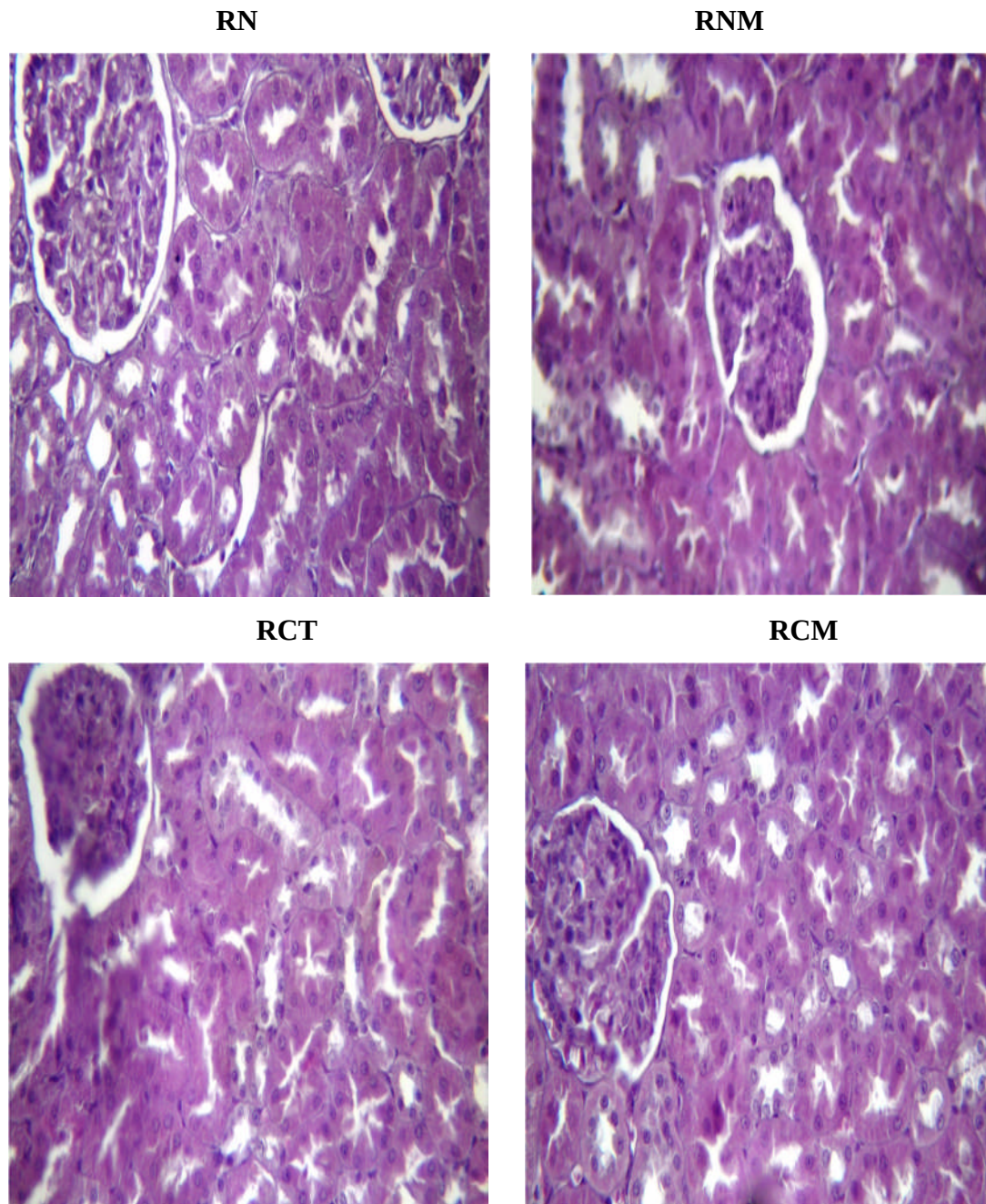


Figure 22. Coupes histologiques des reins de différents groupes d'animaux. RN : rats normaux , RCT : rats cafeteria témoin, RNM : rats normaux traités avec les margines, RCM : rats cafeteria traités avec les margines. Coloration hématoxyne-éosine ,G $\times$ 400.

2. Effets des margines et de l'extrait phénolique des margines sur des paramètres métaboliques chez le rat Wistar soumis à un régime cafeteria après 12 semaines de traitement.

2.1. Matériel et Méthodes

2.1.1. Préparation des animaux et administration des margines

Dans ce travail, nous avons utilisé 30 rats blancs ayant un poids initial de 204 ± 23 g (entre 181 g et 227 g). Ils sont répartis en 5 lots (3 rats par cage) suivant le régime alimentaire consommé.

- **Lot 1** (n= 6) : rats témoins : régime standard + eau de boisson sans margines (RN)
- **Lot 2** (n= 6) : rats témoins : régime standard + margines incorporées à l'eau de boisson (RNM)
- **Lot 3** (n=6) : rats cafeteria témoins : régime cafeteria + eau de boisson sans margines (RCT)
- **Lot 4** (n= 6) : rats cafeteria : régime cafeteria + margines incorporées à l'eau de boisson (RCM)
- **Le lot 5** (n=6) : rats cafeteria : régime cafeteria + extrait phénolique (RCP)

Les rats reçoivent quotidiennement et pendant 12 semaines soit le régime standard, soit le régime cafeteria, supplémentés ou non en margines (ou de l'extrait phénolique). Les margines vont être administrées à deux groupes de rats Wistar (le lot 2 et le lot 4) pendant 12 semaines à raison de 0,33 ml de margines /10 ml d'eau de boisson (eau de robinet), ce qui correspond à 16 mg de matière sèche /10 ml d'eau. Le poids corporel est noté chaque semaine. A la fin de l'expérimentation (12 semaines), les animaux sont décapités (après 8 heures de jeûne) et le sang est recueilli dans des tubes secs pour le dosage immédiat de divers paramètres sanguins (annexe 4).

2.1.2. Administration de l'extrait phénolique

L'extraction de l'extrait phénolique est réalisée à partir de 10 litres de margines selon le protocole décrit précédemment (figure 12). Après congélation à -80°C , l'extrait phénolique obtenu est lyophilisé puis réparti dans des tubes ependorf préalablement pesés. Les fractions des polyphénols sont conservées à une température basse (-20°C) et protégées de la lumière. Le jour de leur utilisation, elles sont solubilisées dans de l'eau distillée. La quantité de l'extrait

phénolique administrée oralement et quotidiennement à la même heure (avec une micropipette) aux rats (le lot 5) est de **10 mg/ kg** de poids corporel pendant 12 semaines.

2.2. Résultats

2.2.1. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur le poids corporel

Après 12 semaines, le régime cafeteria a induit une augmentation du poids corporel (RN 343 ± 28 g vs RCT $402,3 \pm 41,8$ g) mais elle n'est pas significative (figure 23). L'incorporation des margines soit aux rats normaux (RN 343 ± 28 g vs RNM $374,8 \pm 54,1$ g) soit aux rats soumis au régime cafeteria (RCT $402,3 \pm 41,8$ g vs RCM $408,6 \pm 33,4$ g), n'a pas eu d'effet sur le poids corporel après 12 semaines de traitement. L'incorporation de l'extrait phénolique pendant 12 semaines a induit une diminution non significative du poids corporel (RCT $402,3 \pm 41,8$ g vs $371 \pm 30,1$ g) (figure 24).

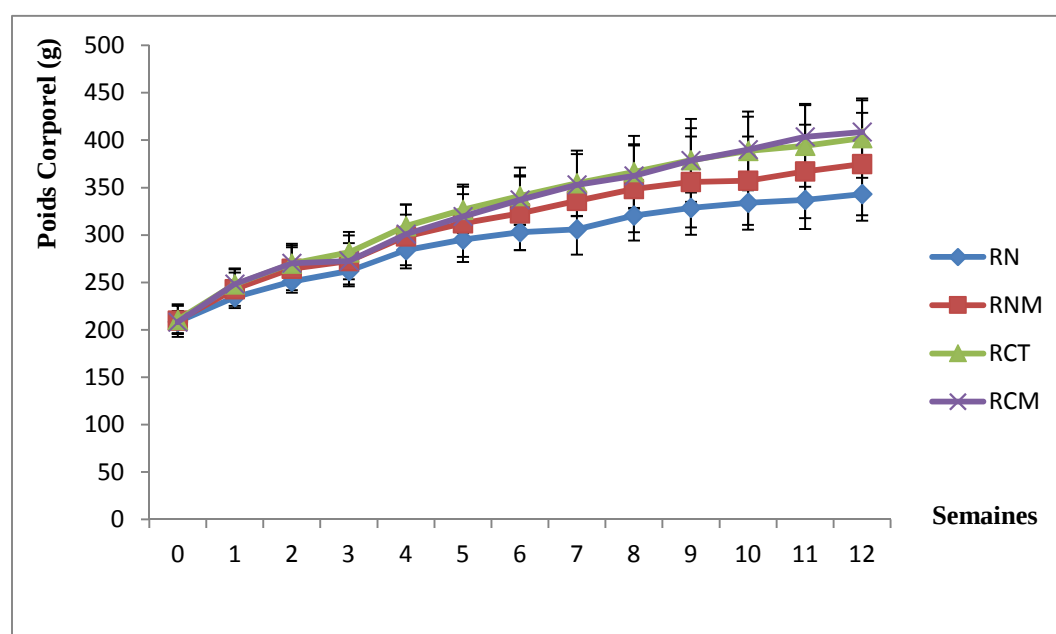


Figure 23. Effet des margines sur le poids corporel après 12 semaines de traitement. RN : rats normaux, RCT : rats cafeteria témoin, RNM : rats normaux traités avec les margines (0,33 ml/10 ml d'eau), RCM : rats cafeteria traités avec les margines (0,33 ml /10 ml d'eau).

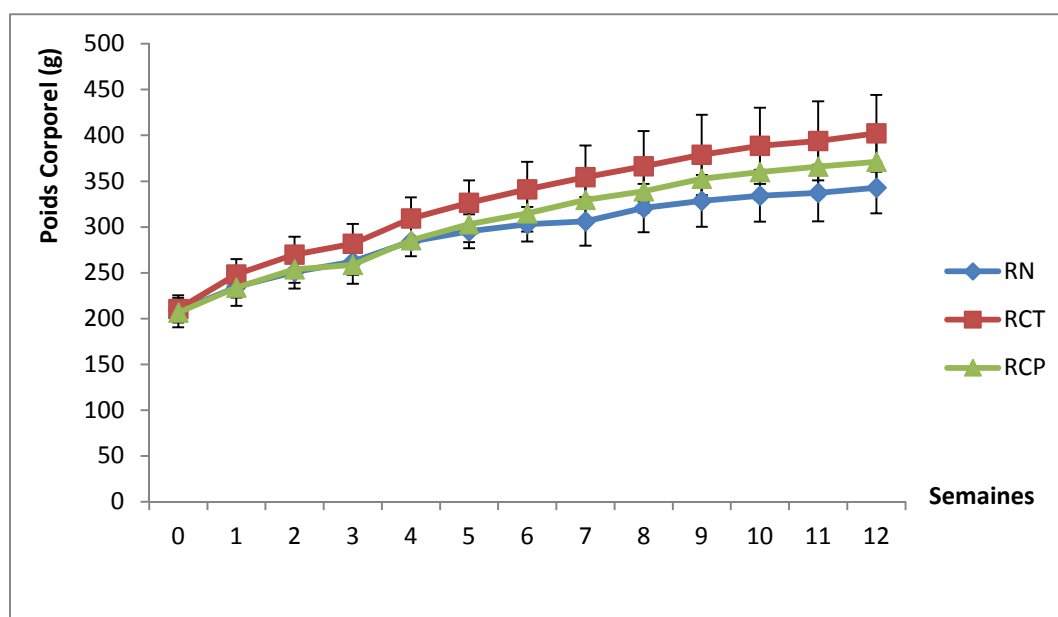


Figure 24. Effet de l'extrait phénolique sur le poids corporel après 12 semaines de traitement. RN : rats normaux, RCT : rats cafeteria témoin, RCP : rats cafeteria traités avec l'extrait phénolique (10 mg/Kg de PC).

2.2.2. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur le bilan lipidique et sur la glycémie

Cholestérol total

Après 12 semaines de traitement, le régime cafeteria a induit une augmentation significative du taux du cholestérol total (RN $0,611 \pm 0,034$ g/L vs RCT $0,736 \pm 0,054$ g/L) (figure 25), soit une augmentation de 20,45 %. Cependant, l'incorporation des margines dans l'eau de boisson n'a pas eu d'effet significatif sur ce paramètre, aussi bien pour les rats normaux (RN $0,611 \pm 0,034$ g/L vs RNM $0,568 \pm 0,041$ g/L) que pour les rats soumis au régime cafeteria (RCT $0,736 \pm 0,054$ g/L vs RCM $0,785 \pm 0,052$ g/L). L'administration de l'extrait phénolique pendant 12 semaines à des rats soumis au régime cafeteria a induit une diminution significative du taux du cholestérol total (RCT $0,736 \pm 0,054$ g/L vs RCP $0,488 \pm 0,084$ g/L), soit une baisse de 33,69 % (figure 26).

Triglycérides

Après 12 semaines de traitement, le régime cafeteria a induit une augmentation significative du taux des triglycérides (RN $0,612 \pm 0,133$ g/L vs RCT $1,148 \pm 0,286$ g/L), soit une

augmentation de 87,58 %. Cependant, l'introduction des margines dans l'eau de boisson n'a pas eu d'effet sur ce paramètre, aussi bien pour les rats normaux (RN $0,612 \pm 0,133$ g/L vs RNM $0,866 \pm 0,201$ g/L) que pour les rats soumis au régime cafeteria (RCT $1,148 \pm 0,286$ g/L vs RCM $1,332 \pm 0,358$ g/L). Le taux des triglycérides a diminué mais d'une façon non significative chez les rats soumis au régime cafeteria et traités avec l'extrait phénolique pendant 12 semaines (RCT $1,148 \pm 0,286$ g/L vs RCP $0,922 \pm 0,189$ g/L).

HDL-Cholestérol

Le régime cafeteria n'a pas eu d'impact sur le taux des HDL-Cholestérol après 12 semaines de traitement (RN $0,625 \pm 0,032$ g/L vs RCT $0,692 \pm 0,067$ g/L). Les margines introduites dans l'eau de boisson ont induit une baisse significative du taux des HDL chez les rats normaux (RN $0,625 \pm 0,032$ g/L vs RNM $0,538 \pm 0,041$ g/L), soit une baisse de 13,92 %. Cependant, pas de différence significative chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $0,692 \pm 0,067$ g/L vs RCM $0,705 \pm 0,031$ g/L). L'administration de l'extrait phénolique pendant 12 semaines à des rats soumis au régime cafeteria a induit une diminution significative du taux des HDL-cholestérol (RCT $0,692 \pm 0,067$ g/L vs RCP $0,5 \pm 0,053$ g/L), soit une baisse de 27,74 %.

Glycémie

Après 12 semaines de traitement, le régime cafeteria a induit une augmentation significative de la glycémie (RN $0,462 \pm 0,124$ g/L vs RCT $0,821 \pm 0,1$ g/L), soit une augmentation de 77,70 %. L'administration des margines aux rats soumis au régime standard (RN $0,462 \pm 0,124$ g/L vs RNM $0,655 \pm 0,131$ g/L) et aux rats soumis au régime cafeteria (RCT $0,821 \pm 0,1$ g/L vs RCM $0,948 \pm 0,172$ g/L) n'a pas eu d'effets significatifs sur la glycémie. L'administration de l'extrait phénolique pendant 12 semaines à des rats soumis au régime cafeteria n'a pas eu d'effet significatif sur la glycémie (RCT $0,821 \pm 0,1$ g/L vs RCP $0,951 \pm 0,116$ g/L).

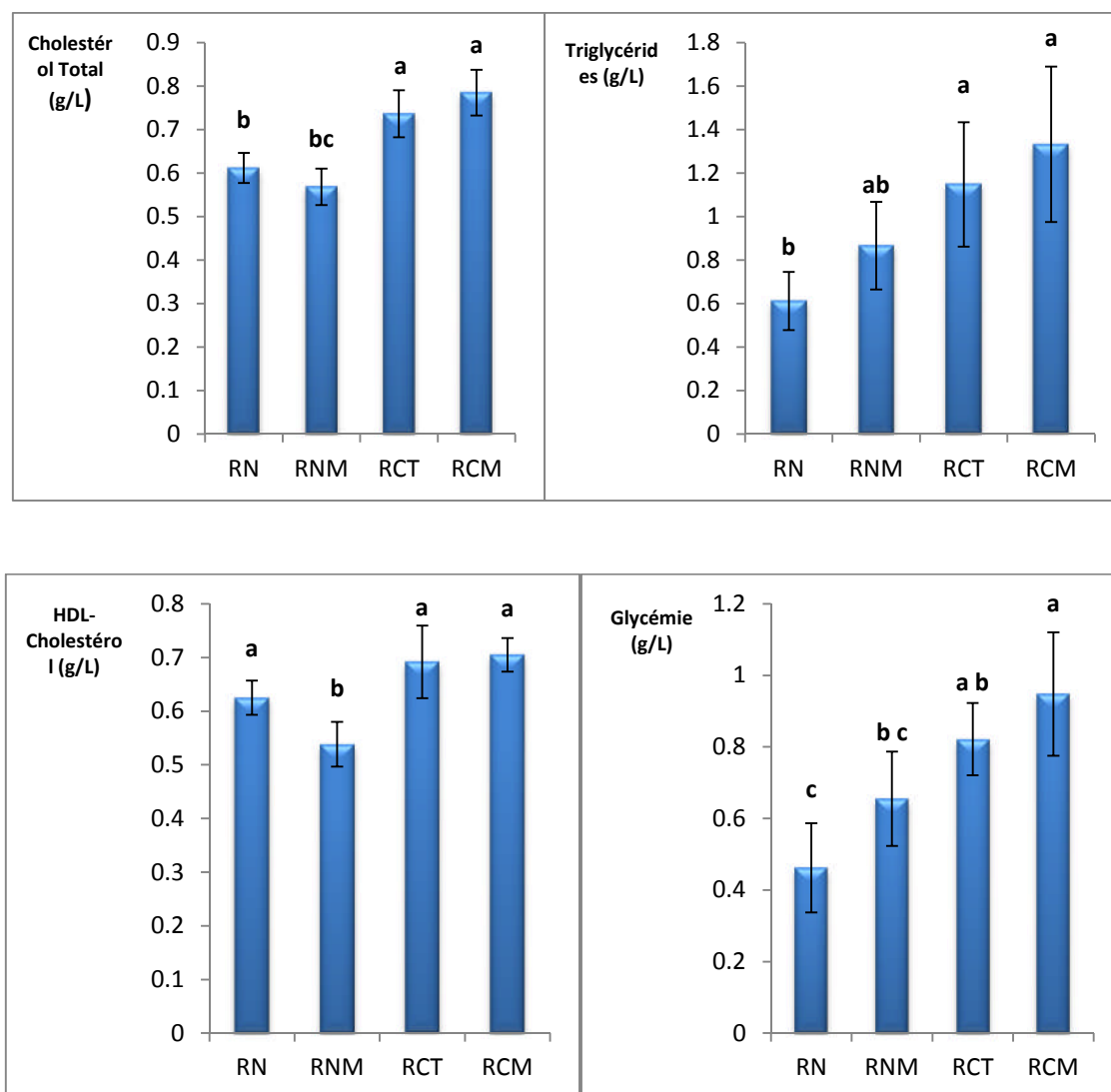


Figure 25. Effets des margines sur le bilan lipidique et sur la glycémie après 12 semaines de traitement. RN : rats normaux, RCT : rats cafeteria témoins, RNM : rats normaux traités avec les margines (0,33 ml /10 ml d'eau), RCM : rats cafeteria traités avec les margines (0,33 ml/10 ml d'eau). Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ S.E.M. Les différentes lettres (a, b,c et d) représentent des différences significatives entre les groupes (test de Tukey- Kramer, $P < 0,05$).

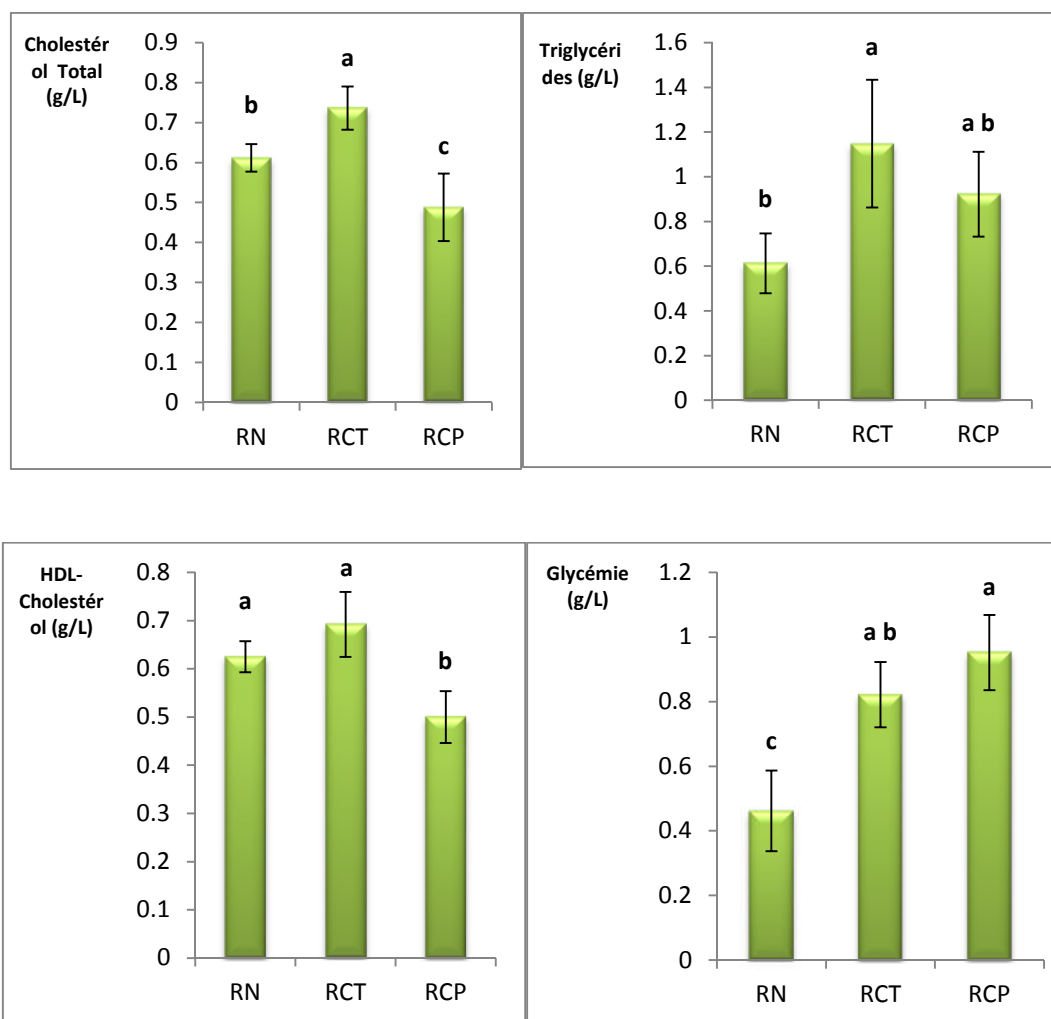


Figure 26. Effets de l'extrait phénolique sur le bilan lipidique et sur la glycémie après 12 semaines de traitement. RN : rats normaux, RCT : rats cafeteria témoins, RCP : rats cafeteria traités avec l'extrait phénolique (10 mg/Kg de PC). Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ S.E.M. Les différentes lettres (a, b, c et d) représentent des différences significatives entre les groupes (test de Tukey- Kramer, $P < 0,05$).

2.2.3. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur les paramètres indicateurs des fonctions hépatique et rénale

Urée

Après 12 semaines de traitement, le régime cafeteria n'a pas eu d'effet sur le taux d'urée (RN $0,602 \pm 0,065$ g/L vs RCT $0,560 \pm 0,079$ g/L) (figure 27). Chez les rats normaux (RN $0,602 \pm 0,065$ g/L vs RNM $0,498 \pm 0,058$ g/L) et chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $0,560 \pm 0,079$ g/L vs RCM $0,476 \pm 0,078$ g/L), l'administration des margines n'a pas induit de variations significatives. L'extrait phénolique aussi n'a pas eu d'effet sur le taux d'urée après 12 semaines de traitement (RCT $0,560 \pm 0,079$ g/L vs RCP $0,565 \pm 0,037$ g/L).

Créatinine

Le régime cafeteria n'a pas eu d'effet sur le taux de créatinine après 12 semaines de traitement (RN $10,667 \pm 1,751$ mg/L vs RCT $10,667 \pm 1,633$ mg/L). L'administration des margines n'affecte pas le taux de créatinine chez les rats normaux (RN $10,667 \pm 1,751$ mg/L vs RNM $9,667 \pm 0,816$ mg/L) et même chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $10,667 \pm 1,633$ mg/L vs RCM $10,200 \pm 1,304$ mg/L). L'administration de l'extrait phénolique pendant 12 semaines est aussi sans effet sur ce paramètre (RCT $10,667 \pm 1,633$ mg/L vs RCP $9,167 \pm 1,169$ mg/L).

Acide urique

Après 12 semaines de traitement, le régime cafeteria n'a pas eu d'effet sur le taux d'acide urique (RN $27,40 \pm 5,59$ mg/L vs RCT $32,50 \pm 5,86$ mg/L). Chez les rats normaux (RN $27,40 \pm 5,59$ mg/L vs RNM $31,60 \pm 6,58$ mg/L) et chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $32,50 \pm 5,86$ mg/L vs RCM $37,00 \pm 7,97$ mg/L), l'administration des margines n'a pas induit de variations significatives. L'extrait phénolique aussi n'a pas eu d'effet sur le taux d'acide urique après 12 semaines de traitement (RCT $32,50 \pm 5,86$ mg/L vs RCP $25,83 \pm 9,11$ mg/L).

Transaminase TGO

Le régime cafeteria n'a pas eu d'effet sur le taux de TGO après 12 semaines de traitement (RN $340,6 \pm 36,9$ UI/L vs RCT 296 ± 370 UI/L). L'administration des margines n'affecte pas le taux de TGO chez les rats normaux (RN $340,6 \pm 36,9$ UI/L vs RNM $312,33 \pm 19,54$ UI/L) et même chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT 296 ± 37 UI/L vs RCM $289,2 \pm 31,2$ UI/L). L'administration de l'extrait phénolique pendant 12 semaines est aussi sans effet sur ce paramètre (RCT 296 ± 37 UI/L vs RCP $277 \pm 34,4$ UI/L).

Transaminase TGP

Le régime cafeteria n'a pas eu d'effet sur le taux de TGP après 12 semaines de traitement (RN $134,83 \pm 16,95$ UI/L vs RCT $110,33 \pm 19,70$ UI/L). L'administration des margines n'affecte

pas le taux de TGP chez les rats normaux (RN $134,83 \pm 16,95$ UI/L vs RNM $127,67 \pm 11,72$ UI/L) et même chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $110,33 \pm 19,70$ UI/L vs RCM $114,80 \pm 16,78$ UI/L). L'administration de l'extrait phénolique pendant 12 semaines est aussi sans effet sur ce paramètre (RCT $110,33 \pm 19,70$ UI/L vs RCP $138,2 \pm 26,4$ UI/L).

Protéines totales

Pour le taux des protéines totales, 12 semaines du régime cafeteria n'ont pas eu d'effet sur sa concentration (RN $73,67 \pm 2,88$ g/L vs RCT $75 \pm 3,35$ g/L). L'administration des margines ne semble pas affecter ce paramètre chez les rats normaux (RN $73,67 \pm 2,88$ g/L vs RNM $74,17 \pm 2,71$ g/L), comme chez les rats soumis au régime cafeteria (RCT $75 \pm 3,35$ g/L vs RCM $75,6 \pm 2,074$ g/L). L'administration pendant 12 semaines de l'extrait phénolique aussi n'a pas induit de variation significative sur le taux des protéines totales (RCT $75 \pm 3,35$ g/L vs RCP $75,67 \pm 3,39$ g/L).

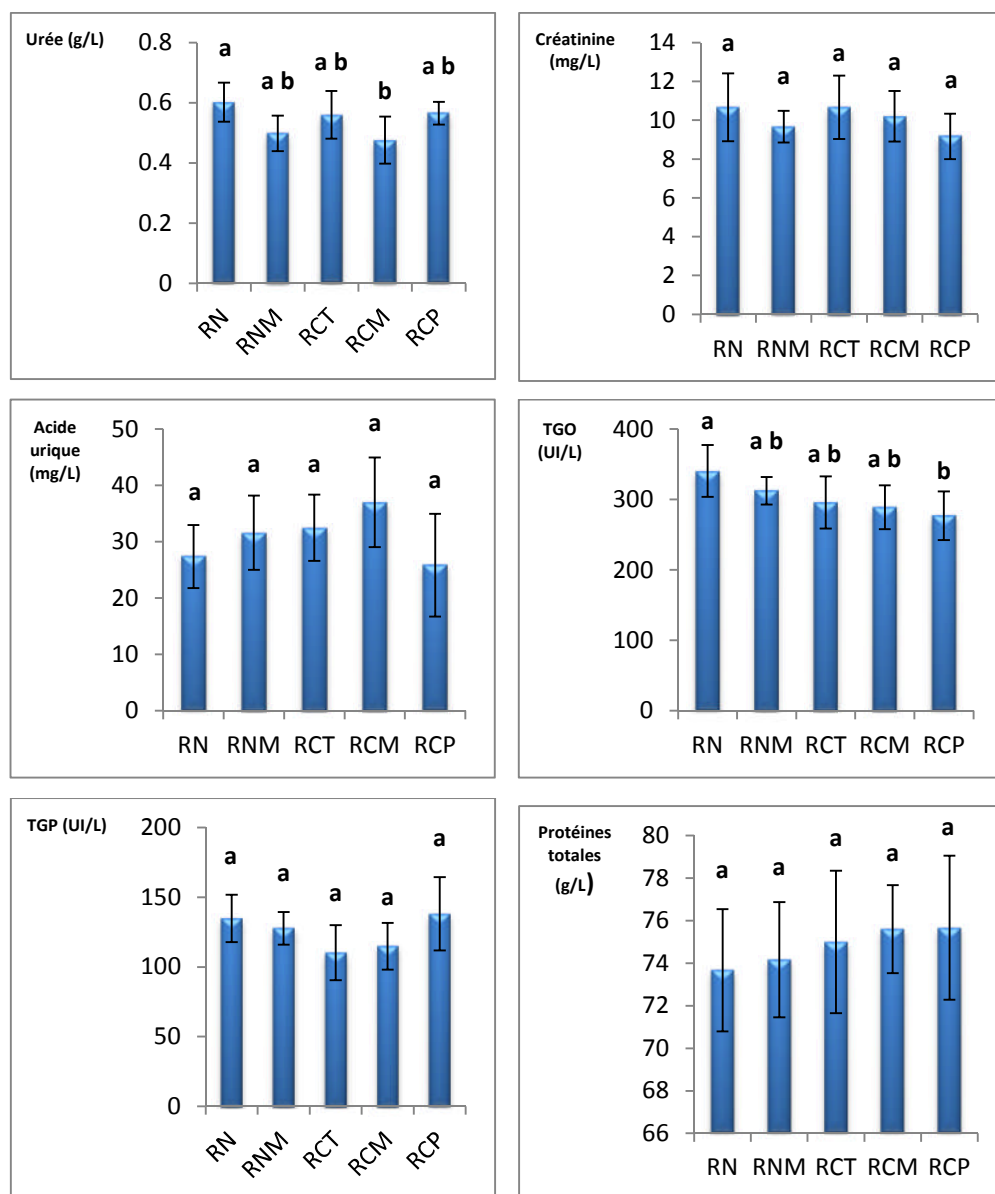


Figure 27. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur les paramètres sanguins indicateurs des fonctions hépatique et rénale après 12 semaines de traitement. RN : rats normaux, RCT : rats cafeteria témoin, RNM : rats normaux traités avec les margines (0,33 ml/10 ml d'eau), RCM : rats cafeteria traités avec les margines (0,33 ml/10 ml d'eau), RCP : rats cafeteria traités avec l'extrait phénolique (10 mg/kg de PC). Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ S.E.M. Les différentes lettres (a, b, c et d) représentent des différences significatives entre les groupes (test de Tukey- Kramer, $P < 0,05$).

3. Effets des margines sur quelques paramètres sanguins chez le rat Wistar soumis à un régime cafeteria

3.1. Matériel et Méthodes

12 rats dont le poids corporel est entre 269 g et 272 g et sont divisés en 4 lots

- Lot 1 (RN n= 3) : régime standard + eau de robinet
- Lot 2 (RNM n= 3) : régime standard + margines (diluées dans l'eau)
- Lot 3 (RCT n= 3) : régime cafétéria + eau de robinet
- Lot 4 (RCM n= 3) : régime cafétéria + margines (diluées dans l'eau)

La durée d'expérience est de 14 semaines. La quantité des margines administrée est de 1 ml diluée dans 10 ml d'eau (1/11), ce qui correspond à 50,5 mg de matière sèche /11 ml d'eau. A la fin de l'expérimentation, les animaux sont décapités et le sang est recueilli dans des tubes à EDTA (pour la numération sanguine). Le dosage de quelques paramètres sanguins concerne le nombre de globule rouges, l'hématocrite, le volume globulaire moyen (VGM), le taux d'hémoglobine, la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) et le volume plaquettaire moyen (VPM). L'appareil utilisé est un appareil à NFS (numération formule sanguine) qui est un Coulter ou automate d'hématologie « mindray , BC-300Plus » (Cytométrie de flux).

3.2. Résultats

La figure 28 représente l'effet des margines sur quelques paramètres sanguins des 4 groupes d'animaux.

Le nombre de globules rouges : pas de différence significative entre les 4 groupes d'animaux (RN : $8,887 \pm 0,532$, RNM : $9,88 \pm 0,00$, RCT : $9,55 \pm 0,373$, RCM : $8,75 \pm 1,739$) $\times 10^6/\text{mm}^3$.

L'hématocrite : pas de différence significative entre les 4 groupes d'animaux (RN : $45,933 \pm 4,290$, RNM : $52,8 \pm 0$, RCT : $54,367 \pm 0,961$, RCM : $47,8 \pm 8,485$) %.

Le VGM : le volume globulaire moyen. Il n'y a pas de différence significative entre les trois groupes d'animaux (RN : $51,7 \pm 1,825$, RNM : $51,6 \pm 1,706$, RCM : $54,933 \pm 0,833$) μ^3 . Cependant, le groupe RCT ($57,033 \pm 1,505$ μ^3) présente une augmentation significative de VGM (par rapport aux 3 autres groupes), ce qui probablement peut être attribué à une carence en vitamines B12 ou B9 qui ne sont pas apporté suffisamment par le régime cafeteria.

Le taux d'hémoglobine : pas de différence significative entre les 4 groupes d'animaux (RN : $14,933 \pm 1,286$, RNM : $16,6 \pm 0$, RCT : $16,967 \pm 0,321$, RCM : $15,350 \pm 2,758$) g/dl.

La TCMH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine. Pas de différence significative entre les 4 groupes d'animaux. (RN : $16,733 \pm 0,513$, RNM : $16,533 \pm 0,462$, RCT : $17,733 \pm 0,681$, RCM : $17,567 \pm 0,252$) g/dl.

La CCMH : la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine. Pas de différence significative entre les 4 groupes d'animaux (RN : $32,467 \pm 0,252$, RNM : $32,267 \pm 0,961$, RCT : $31,167 \pm 0,289$, RCM : $32 \pm 0,1$) g/dl.

Le VPM : le volume plaquettaire moyen. Pas de différence significative entre les 4 groupes d'animaux (RN : $6,7 \pm 0,3$, RNM : $7,66 \pm 0,907$, RCT : $7,2 \pm 0,436$, RCM : $7 \pm 0,529$) μ^3 .

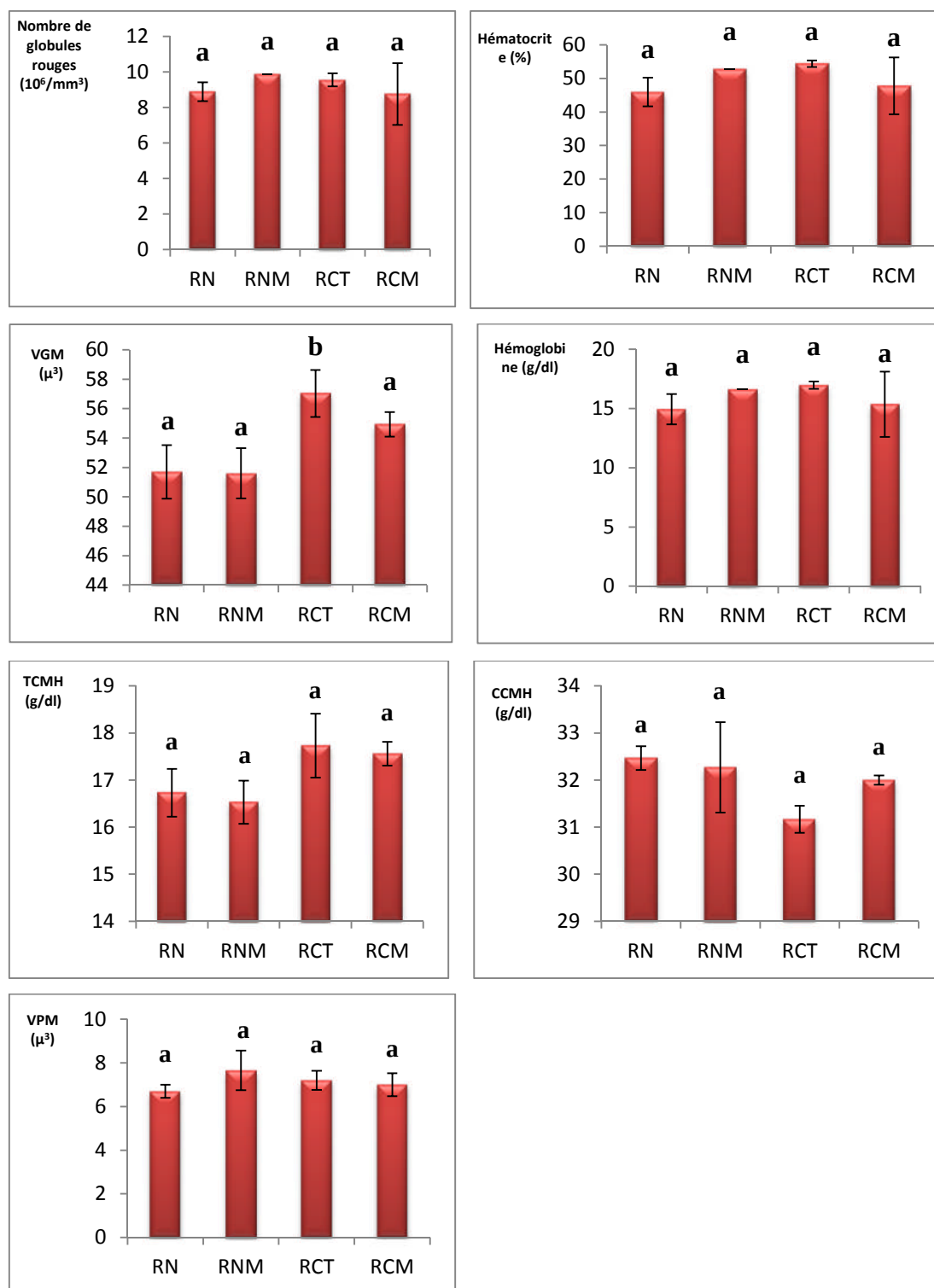


Figure 28. Effets des margines sur quelques paramètres sanguins après 14 semaines de traitement. RN : rats normaux, RCT : rats cafeteria témoins, RNM : rats normaux traités avec les margines (1ml/11 ml d'eau), RCM : rats cafeteria traités avec les margines (1 ml/11 ml d'eau). VGM : volume globulaire moyen. TCMH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine. CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine. VPM : volume plaquettaire moyen. Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ S.E.M. Les différentes lettres (a, b, c et d) représentent des différences significatives entre les groupes (test de Tukey-Kramer, $P < 0,05$).

4. Evaluer l'effet du régime cafeteria pendant 20 semaines sur la fonction hépatique

4.1. Matériel et méthodes

4.1.1. Animaux

L'expérience est réalisée sur 12 rats Wistar mâles (6 rats sont soumis à un régime standard **RN rats normaux** et 6 rats témoins soumis à un régime cafeteria **RC rats cafeteria**), la durée de traitement est de 20 semaines. Le poids des animaux au début de l'expérimentation varie entre 215 gr et 254 gr.

4.1.2. Anesthésie, dissection et Prélèvement sanguin chez le rat

Après une période de jeûne 8 heures, chaque rat est anesthésié par inhalation avec l'éther diéthylique. L'animal est placé en décubitus dorsal. Après vérification de la profondeur de l'anesthésie. Nous procédons à l'ouverture de la cavité abdominale en forme de « V », les intestins sont déplacés vers la gauche pour localiser et isoler l'aorte abdominale. Le sang est prélevé directement dans des tubes secs. Les dosages des paramètres sanguins sont effectués selon les techniques de laboratoire décrites précédemment (annexe 4). Les dosages concernent les transaminases (TGO et TGP).

4.2. Résultats

4.2.1. Poids des rats avant et à la fin de l'expérimentation

Au début de l'expérimentation (figure 29), pas de différences significatives entre le poids corporel des deux groupes d'animaux (RN : $232,66 \pm 19,75$ vs RC: $233 \pm 7,21$) g. **A la fin de l'expérimentation**, après 20 semaines de régime cafeteria, le poids corporel a augmenté d'une façon significative (RN : $362,33 \pm 28,30$ vs RC : $456,33 \pm 08,96$) g, soit une augmentation de 25,94 %.

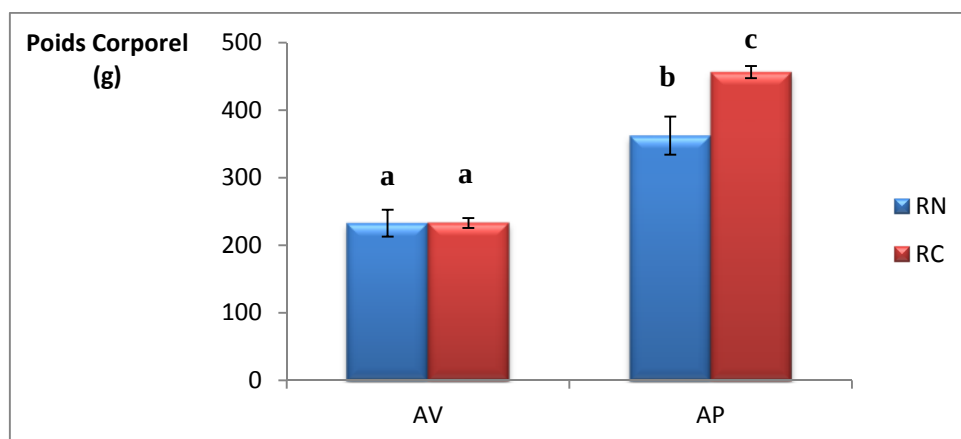


Figure 29. Effet du régime cafeteria sur le poids corporel après 20 semaines de traitement. RN : rats normaux (régime standard), RC: rats cafeteria, AV: avant l'expérimentation, AP : après l'expérimentation. Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ S.E.M. Les différentes lettres (a, b,c et d) représentent des différences significatives entre les groupes (test de Tukey- Kramer, $P < 0,05$).

4.2.2. Effets du régime cafétéria sur le taux des transaminases

Le taux des transaminases (TGO) a significativement diminué après 20 semaines de régime cafeteria (RN : $142,17 \pm 15,25$ vs RCT : $93 \pm 3,46$) UI/L (figure 30), soit une diminution de 34,58 %. Le taux de TGP a diminué d'une façon significative après 20 semaines de régime cafeteria (RN : $92,333 \pm 3,830$ vs RCT : $36,667 \pm 11,240$) UI/L, soit une diminution de 60,28 %.

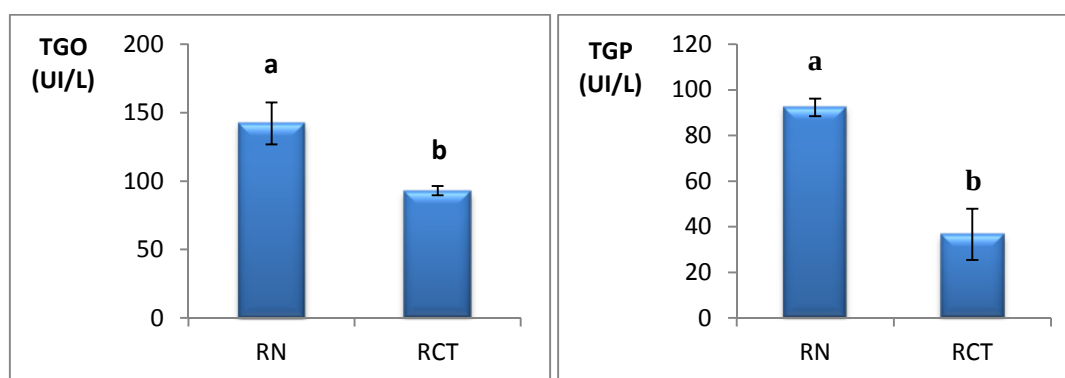


Figure 30. Taux des transaminases (TGO et TGP) après 20 semaines de régime cafeteria.

RN : rats normaux, RCT : rats cafeteria. Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ S.E.M. Les différentes lettres (a, b,c et d) représentent des différences significatives entre les groupes (test de Tukey- Kramer, $P < 0,05$).

5. Résultats et Discussion

L'ensemble des résultats des 4 expérimentations est regroupé dans cinq tableaux récapitulatifs (tableau VIII, IX, X, XI et XII).

Tableau VIII. Effets du régime cafeteria sur le poids corporel , les dyslipidémies et la glycémie.

Durée du régime cafeteria	Poids corporel	Cholestérol total	Triglycérides	HDL-cholestérol	Glycémie
13 semaines	↑ de 19,18 %.	Pas de variation significative	↑ de 156,25 %	Pas de variation significative	↑ de 45,52 %
12 semaines	Pas de variation significative	↑ de 20,45 %	↑ de 87,58 %	Pas de variation significative	↑ de 77,7 %
20 semaines	↑ de 25,94 %.	—	—	—	—

Les résultats montrent que le régime cafeteria que nous avons adopté a positivé la balance énergétique en induisant une augmentation significative du poids corporel (tableau VIII). C'est aussi un régime inducteur d'hyperglycémie et de dyslipidémie surtout pour les triglycérides, cependant la variation du taux de cholestérol reste mitigée, probablement à cause du contrôle que l'organisme exerce sur sa régulation.

Tableau IX. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur le poids corporel, les dyslipidémies et la glycémie.

Durée de Traitement	Poids corporel	Cholestérol total	Triglycérides	HDL- cholestérol	Glycémie
Margines : 12 semaines (0,33ml/10 ml d'eau)	Pas de variation significative	Pas de variation significative	Pas de variation significative	Pas de variation significative	Pas de variation significative
Margines : 13 semaines (1ml/11ml d'eau)	Pas de variation significative	↓de 18,98%	↓de 29 ,51 %	↑ de 20,87 %	↓de 23,77 %
Extrait phénolique : 12 semaines (10 mg/Kg de PC)	Pas de variation significative	↓ de 33,69 %.	Pas de variation significative	↓ de 27, 74 %	Pas de variation significative

Pour évaluer la quantité de calories apportée par les margines quotidiennement, nous avons établi le tableau suivant (annexe 1) qui indiquent la consommation d'eau quotidienne pour chaque animal pendant 11 jours successifs (T° ambiante 20 à 25 °C).

	Jour 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Moyenne ± S.E.M
Quantité d'eau consommée (ml /24 h)	36,66	33,33	28,33	26,66	28,33	26,66	30	28,33	35	26,66	31,66	30,14 ± 3,53

En se basant sur la quantité des margines diluée dans l'eau de boisson (1/11), et la quantité d'eau consommée en 24 h (30 ml), la quantité des margines consommée par chaque animal est d'environ 2,72 ml / 24 h ce qui correspond à une valeur énergétique de 101 Calories/24 h (valeur approximative), un apport énergétique assez faible qui expliquerait la non contribution des margines dans la prise du poids (tableau IX).

L'effet hypoglycémiant des margines (tableau IX) peut être attribué à l'action de son constituant phénolique majeur qui est l'Hydroxytyrosol (HT). Ainsi, si la quantité approximative des margines consommée par les animaux pendant 13 semaines est estimée à 2,72 ml / 24 h, la quantité de l'HT prise quotidiennement serait d'environ 0,69 mg/24 h.

Les travaux de HAMDEN *et al.* (2009) sur des rats Wistar, montrent l'effet hypoglycémiant de l'HT purifié à partir des margines mais avec une dose supérieure (20 mg/Kg de PC) administrée quotidiennement pendant 8 semaines. HAMDEN *et al.* (2009) rapportent également que l'HT contribuerait à l'augmentation de la sécrétion d'insuline (effet insulinothèque). Aussi, comme l'oleuropéine, l'HT augmenterait l'absorption périphérique du glucose (absorption hépatique par exemple). L'HT peut également augmenter la synthèse de certaines enzymes qui catalysent la phosphorylation du glucose telles que l'hexokinase, la pyruvate kinase et diminuer les enzymes qui catalysent la déphosphorylation du glucose-6-phosphate en glucose libre comme la glucose-6-phosphatase et la fructose-1,6-bisphosphatase. HAMDEN *et al.*, (2010) rapportent que l'HT extrait des margines pourrait inhiber l'activité des enzymes telles que la maltase, lactase et sucrase au niveau intestinal. Ces dernières sont localisées dans les entérocytes et elles catalysent la décomposition des disaccharides en sucres simples. Aussi, des travaux réalisés au niveau de notre Laboratoire (LABAB), viennent étayer nos résultats. En effet, l'administration orale des margines brutes à des souris mâles C57BL/6J aurait une action inhibitrice sur le co-transporteur Glucose/sodium dépendant (SGLT-1) au niveau du pôle apical des entérocytes. Par conséquent, les margines peuvent être considérées comme un agent thérapeutique prospectif important, principalement, pour un effet hypoglycémiant (SENANI-OUARBI *et al.*, 2017).

L'ensemble des résultats nous a révélé également un effet hypolipidémiant des margines (baisse du cholestérol total et des triglycérides et augmentation des HDL-cholestérol) après 13 semaines de traitement (tableau IX). Si la quantité des margines consommée par chaque animal est d'environ 2,72 ml / 24 h, la quantité estimée de l'extrait phénolique consommée quotidiennement est de 25,56 mg (environ 2,79 mg de polyphénols totaux). Pour l'administration de l'extrait phénolique pendant 12 semaines (10 mg/Kg de PC ce qui correspond à 2 mg d'extrait phénolique donc environ 0,218 mg de polyphénols totaux pour un animal de 200 g de PC), seule une hypocholestérolémie a été révélée (tableau IX). Une durée de traitement plus longue probablement serait indispensable pour des résultats concluants. En effet, Fki *et al.* (2007), rapportent que la même dose de l'extrait phénolique des

margines administrée (10 mg/Kg de PC) quotidiennement pendant 16 semaines à des rats Wistar soumis à un régime hypercholestérolémique, a induit non seulement une hypocholestérolémie, mais aussi une augmentation du taux des HDL-Cholestérol. Comme pour l'effet hypoglycémiant, l'effet hypolipidémiant des margines et de l'extrait phénolique peut être attribué également à l'action de l'HT, en effet les travaux de HAMDEN et *al.*, (2009) montrent clairement une baisse des taux de cholestérol total et des triglycérides et une augmentation des taux des HDL –Cholestérol chez le rat Wistar, pour une dose de 20 mg d'HT /Kg de PC administrée quotidiennement pendant 8 semaines. Les mêmes effets hypolipédémians ont été également observés après administrations orales de l'HT mais avec des doses inférieures (3 mg/Kg et 2.5 mg/Kg de poids corporel) pour une plus longue période de traitement qui est de 16 semaines (JEMAI et *al.*, 2008b; FKI et *al.* 2007). L'effet hypocholestérolémique des margines pourrait encore être attribué à l'action de l'Hydroxytyrosol, ainsi son mécanisme d'action est dû probablement à l'inhibition de l'absorption du cholestérol alimentaire dans l'intestin ou à sa production par le foie comme c'est le cas pour certains polyphénols du thé (BURSILL et ROACH, 2006). Aussi, KRZEMINSKI et *al.* (2003) rapportent que l'huile d'olive (*via* l'HT) stimulerait l'évacuation du cholestérol dans la sécrétion biliaire et dans les matières fécales. L'HT agit également sur la baisse du taux des triglycérides, en effet HAMDEN et *al.* (2010) rapportent que chez les rats diabétiques traités avec l'HT purifiée, une inhibition potentielle de l'activité lipasique intestinale a été observée. L'effet inhibiteur de l'HT sur la lipase intestinale diminue l'hydrolyse des triglycérides alimentaires en monoglycérides et en acides gras libres, ce qui entraîne une diminution de l'absorption des lipides. Les travaux rapportés par HU et *al.* (2014) montrent que l'HT améliore le profil lipidique plasmatique en abaissant les taux des LDL, de cholestérol et des triacylglycérols et en augmentant également la teneur des HDL. Aussi, selon CAO et *al.* (2014), l'HT peut normaliser l'obésité, le diabète, la dyslipidémie, l'inflammation, la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline induites par un régime riche en graisses chez les souris C57BL / 6 en diminuant la voie SREBP-1c / FAS, en diminuant le stress oxydatif, en diminuant les anomalies mitochondriales. En outre, l'HT pourrait diminuer les taux de glucose et le métabolisme lipidique présents chez les souris db / db, confirmant ainsi les effets pertinents de l'HT sur le syndrome métabolique. Plusieurs autres études viennent étayer nos résultats. Concernant l'effet bénéfique des margines sur la fonction hépatique, une étude récente menée par DAGLA et *al.* (2018) consistait à administrer quotidiennement par gavage orale de l'HT (20 mg/Kg de PC) pendant 8 semaines à des rat Wistar nourris avec un régime de haute teneur en hydrates de carbone et en gras. Les résultats de cette étude ont montré que

le foie des animaux présentait une réduction nette des acides gras polyinsaturés inducteurs de stéatose, ainsi l'HT exerce un réel pouvoir protecteur sur la fonction hépatique.

Tableau X. Effets du régime cafeteria sur les paramètres indicateurs des fonctions hépatique et rénale.

Durée du régime cafeteria	Urée	Acide urique	Créatinine	Bilirubine totale	Transaminase		Protéines totales
					TGO	TGP	
12 semaines	Pas de variation significative	Pas de variation significative	Pas de variation significative	—	Pas de variation significative	Pas de variation significative	Pas de variation significative
13 semaines	Pas de variation significative	↓ de 40,06 %	Pas de variation significative	Pas de variation significative	↓ de 37,89 %	↓ de 54,27%	Pas de variation significative
20 semaines	—	—	—	—	↓ de 34,58 %.	↓ de 60,28 %.	—

Le régime cafeteria ne semble pas affecter l'ensemble des paramètres indicateurs des fonctions rénale et hépatique sauf pour les transaminases et l'acide urique (tableau X). Au cours des différentes expérimentations, les animaux soumis au régime cafeteria (50 % du régime standard + 50 % du régime hypercalorique hyperlipidique), ont présenté une préférence exclusive pour l'alimentation riche en Calories, qui probablement présentait une faible teneur en vitamine B6, délaissant complètement le régime standard. En effet, une transaminase ou aminotransférase est une enzyme à pyridoxal phosphate de la classe des transférases, elle effectue le transfert d'un groupement -NH₂ d'un acide aminé vers un autre, permettant la synthèse de nouveaux acides aminés, non présents dans le milieu. Son coenzyme est la vitamine B₆ (phosphorylée, ce qui donnera le pyridoxal phosphate) (BAUDIN, 2019).

Tableau XI. Effets des margines et de l'extrait phénolique sur les paramètres indicateurs des fonctions hépatique et rénale.

Durée de traitement	Urée	Acide urique	Créatinine	Bilirubine	Transaminase		Protéines totales
					TGO	TGP	
Margines : 12 semaines (0,33 ml /10 ml d'eau)	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	—	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation
Margine : 13 semaines (1ml/11 ml d'eau)	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation
Extrait phénolique : 12 semaines (10 mg/Kg de PC)	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	—	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation

Tableau XII. Effets des margines sur quelques paramètres sanguins.

Durée de traitement	Nombre d'hématie	hématocrite	VGM	Taux d'hémoglobine	TGMH	CCMH	VPM
Margines : 14 semaines (1ml/11 ml d'eau)	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation	Pas de variation

Au cours des différentes expérimentations, les animaux traités avec les margines et l'extrait phénolique ont présenté une santé satisfaisante, sans problèmes de flatulence ou de diarrhée, et nous n'avons enregistré aucune mortalité. Ainsi, l'ensemble des résultats présenté dans le tableau XI, nous révèle que les margines et l'extrait phénolique ne semble pas affecter les deux fonctions hépatique et rénale. Le contrôle histologique des foies et des reins des animaux traités pendant 13 semaines avec les margines a apporté un appui supplémentaire concernant la non toxicité de cette eau de végétation et aussi probablement un effet protecteur pour le foie. En effet, suite à des analyses des transaminases, de l'urée, de la créatinine et de la bilirubine totale chez le rat Wistar, HAMDEN et *al.*(2009) rapportent l'effet protecteur de l'HT extrait des margines sur les deux fonctions hépatique et rénale (20 mg d'HT /Kg de PC administrées quotidiennement pendant 8 semaines) contre la toxicité causée par le diabète. Après 14 semaines de traitement avec les margines, l'ensemble des paramètres hématologiques sanguins présenté dans le tableau XII, ne semble pas être affecté par cette eau de végétation, ce résultat n'est qu'une confirmation supplémentaire de la non toxicité des margines, du moins pour la période de 14 semaines de traitement.

L'exploitation des effets bénéfiques des margines doivent être corrélée avec des tests de non toxicité. Nos tests se sont focalisés surtout sur des indicateurs de la fonction hépatique et rénale, ainsi que quelques paramètres hématologiques. La toxicité des margines n'est pas prouvée par nos travaux, bien au contraire cette eau de végétation aurait un effet protecteur notamment pour la fonction hépatique. Cependant la durée plus longue du traitement et la concentration de l'eau de boisson en margines peuvent avoir des effets contraires, ce qui reste

à démontrer. Si les extraits phénoliques des margines peuvent être incorporés dans l'alimentation et dans les breuvages comme l'ont suggéré ZBAKH et EL ABBASSIB (2012), il serait plus économique et probablement plus efficace d'introduire directement les margines, néanmoins il serait plus prudent de les centrifuger pour éliminer le maximum de matières organique ainsi que les différents métaux lourds qui les constitues, une délipidation par exemple par décantation est préconisée et enfin une stérilisation est conseillée pour limiter le développement des microorganismes. La qualité des phénols simple comme l'HT dans les margines peut être améliorée avec différents procédés, en effet OBIED et *al.*, (2008) rapportent que l'acidification ou une longue durée de stockage de cette eau de végétation induit son enrichissement en Hydroxytyrosol.

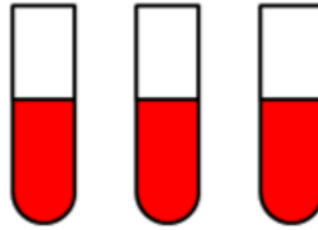
Partie expérimentale III : Effets de l'extrait phénolique sur l'activation plaquettaire

1. Matériel et méthodes

1.1. Isoler les plaquettes

Les plaquettes sont isolées selon la technique de LAGARDE *et al.* (1980), à partir du sang humain en bonne santé, à raison d'un volume de CPD (acide citrique 0,8 %, citrate trisodique 2,2 %, dextrose 2,45 %, pH 4,5) pour 9 volumes de sang. Le sang est réparti dans des tubes en plastique et centrifugé à 1000 g pendant 15 minutes à température ambiante (20°C). Le surnageant ou PRP (plasma riche en plaquettes) est prélevé puis acidifié à pH 6,4 par de l'acide citrique 0,15 M afin d'éviter l'agrégation spontanée des plaquettes. Le PRP acidifié est immédiatement réparti dans des tubes par fraction de 6 ml et centrifugé à 900 g pendant 10 minutes à 20°C. Pour chaque tube, le surnageant (plasma pauvre en plaquettes) est délicatement enlevé et le culot plaquettaire est remis en suspension dans 3 ml de tampon Tyrode HEPES (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHCO₃ 11,9 mM, NaH₂PO₄ 0,41 mM, MgCl₂ 1mM, glucose 5,5 mM, HEPES 5 mM- pH 7,35). La suspension plaquettaire est conservée à température ambiante et les plaquettes restent fonctionnelles toute la journée (Figure 31).

Le sang, recueilli sur anticoagulant CPD



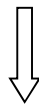
Centrifugation à 1000 g pendant 15 minutes (20°C)



Le PRP (plasma riche en plaquettes) est prélevé puis acidifié à pH 6,4



Centrifugation à 900 g pendant 10 minutes (20°C)



Le culot plaquettaire est remis en suspension dans de tampon Tyrode HEPES

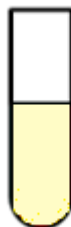


Figure 31. Diagramme résumant les étapes d'isolement des plaquettes à partir de sang humain

1.2. Tests d'activation des plaquettes par un agoniste : l'épinéphrine (adrénaline)

La technique d'activation plaquettaire via l'épinéphrine provient d'une fiche technique (annexe 4) de BIO/DATA CORPORATION (Fabricant et distributeur des produits à fonctions plaquettaires pour les laboratoires de thrombose, d'hémostase et de recherche). L'adrénaline utilisée est l'adrénaline injectable préparée (1 mg/ml) (ADRENALINE RAZES® sans sulfite, les laboratoires FRATER-RAZES).

0,5 ml de plasma riche en plaquettes est pipeté dans des tubes contenant 0,25 ml de Tyrode HEPES. Ces derniers sont incubés à 37 °C pendant 3 minutes en agitation. Deux doses d'épinéphrine (test 1 : 0,1 ml, 0,2 ml- test 2 : 0,2 ml, 0,6 ml / 1ml de PRP) sont ajoutées, après 5 minutes, l'agrégation est formée.

Pour déterminer l'agrégation plaquettaire, nous avons adopté une technique rapportée par ENNOURI (2010), celle-ci s'appuie juste sur le calcul du nombre des plaquettes avant et après agrégation (appareil spécial pour la numération formule sanguine : FNS, Ruby Cell-Dyn, Cytométrie de flux). Si agrégation y est, le nombre de plaquettes devrait diminuer. Cependant, nous avons aussi dosé les taux de Calcium extracellulaire (automate Abbot Architect plus Ci4100, annexe 3) et de fibrinogène (technique manuelle), deux composants engagés dans l'agrégation plaquettaire via le récepteur $\alpha IIb \beta 3$ décrit précédemment. Si agrégation y est, en plus du nombre des plaquettes sanguine, les taux de calcium extracellulaire et de fibrinogène devraient aussi diminuer. Le calcul du nombre des plaquettes, le dosage du calcium et le dosage du fibrinogène sur le même échantillon, doivent impérativement se succéder selon cet ordre.

Dosage de fibrinogène (technique manuelle)

Le dosage de fibrinogène est réalisé selon la méthode de VON CLAUSS (1957). En présence d'un excès de thrombine, le temps de coagulation d'un plasma préalablement dilué est inversement proportionnel à la concentration en fibrinogène.

Le prélèvement sanguin est effectué sur des tubes citrates. Une dilution de 1/10 du plasma est réalisée en mélangeant 450 μ L de diluant (BIO-FIBRI, BIOLABO, buffer HEPES 0,02 M, anticoagulant citrate, inhibiteur de la fibrinolyse, pH 7,35) avec 50 μ L de plasma, la dilution est laissée 10 min. Dans une cupule munie d'une bille, 100 μ L de la dilution est mélangée avec 100 μ L de réactif (BIO-FIBRI, Thrombine). Le temps de la coagulation est calculé par un coagulo-mètre (CYANCoag). Une simple lecture sur un tableau de correspondance révèle la quantité de fibrinogène (g/L) en fonction du temps de la coagulation enregistré.

1.3. Caractérisation de l'extrait phénolique utilisé

L'extraction de l'extrait phénolique à partir des margines, le dosage des polyphénols totaux et la HPLC ont été effectués selon les méthodes précédentes.

1.4. Tester un extrait phénolique des margines sur l'activation plaquettaire induite par l'adrénaline

Test 3

- Incubation (5 min à 37°C avec agitation) de 3 tubes avec 5,4 µl d'extrait phénolique /1 ml de PRP (la solution mère 111,3mg/ml de DMSO) + 3 tubes témoins (5,4µl de DMSO sans extrait/1 ml de PRP).
- Rajouter 0,1 ml d'adrénaline/1ml de PRP à tous les tubes et incubation 5 min à 73°C.
- Déterminer le nombre de plaquettes sanguines et dosage des taux de calcium et de fibrinogène.

Test 4

- Incubation (5min à 37°C avec agitation) de 3 tubes avec une dose de 6 µl de l'extrait phénolique/1ml de PRP (la solution mère de notre extrait est à 111,3mg/ml de DMSO).
- Rajouter 0,1 ml d'adrénaline/1 ml de PRP à tous les tubes et incubation 5 min à 73°C.
- Déterminer le nombre de plaquettes sanguines et dosage des taux de calcium et de fibrinogène.

2. Résultat et discussion

2.1. Effets de l'adrénaline sur l'activation plaquettaire

Test 1

Tableau XIII. Effet de l'adrénaline sur l'activation plaquettaire (Test 1)

	A Plaquettes sans agoniste	B Plaquettes + adrénaline (0,1 ml)	C Plaquettes + adrénaline (0,2 ml)
Nombre de plaquettes ($\times 10^3$/mm³)	214 $\pm$ 22,06)	154,33 $\pm$ 12,42	160,33 $\pm$ 16,77
Calcium (mg/L)	53,96 $\pm$ 0,35	49,26 $\pm$ 0,51	47,93 $\pm$ 5,6
Fibrinogène (g/L)	2,22 $\pm$ 0,21	1,90 $\pm$ 0,20	1,58 $\pm$ 0,05

Les doses B (0,1 ml/ml de PRP) et aussi C (0,2 ml/ ml de PRP) d'adrénaline ont induit une baisse significative du nombre de plaquettes (agrégation), soit une diminution de 27,88 % et 25,07 % respectivement (test de Tukey- Kramer, $P < 0,05$)

Les doses B (0,1 ml/ml de PRP) et C (0,2 ml / ml de PRP) d'adrénaline ont induit une baisse significative du taux de calcium, soit une diminution de 8,7 % et de 11,17 % respectivement. Contrairement à la dose B (0,1 ml/ml de PRP), la dose C (0,2 ml/ml de PRP) a induit une baisse significative du taux de fibrinogène de 28,82 %.

Test 2

Tableau XIV. Effet de l'adrénaline sur l'activation plaquettaire (Test 2).

	A Plaquettes sans agoniste	B Plaquettes + adrénaline (0,2 ml)	C Plaquettes + adrénaline (0,6 ml)
Nombre de plaquettes ($\times 10^3$ /mm ³)	104,5 $\pm$ 3,53	68,46 $\pm$ 5,42	74,96 $\pm$ 3,43
Calcium (mg/L)	59,3 $\pm$ 0,42	52,66 $\pm$ 1,27	44,43 $\pm$ 0,28
Fibrinogène (g/L)	2,02 $\pm$ 0,44	1,99 $\pm$ 0,15	1,57

Les doses B (0,2 ml/ml de PRP) et C (0,6 ml/ ml de PRP) d'adrénaline ont induit une baisse significative du nombre de plaquettes (agrégation), soit une diminution de 34,48 % et de 28,26 %.

Les doses B (0,2 ml/ml de PRP) et C (0,6 ml/ml de PRP) d'adrénaline ont induit une baisse significative du taux de calcium, soit une diminution de 11,19 % et de 25,07 %.

Les deux doses d'adrénaline, B (0,2 ml/ml de PRP) et C (0,6 ml/ml de PRP) ont induit une baisse mais non significative du taux de fibrinogène.

2.2. Caractérisation de l'extrait phénolique utilisé

La quantité de polyphénols totaux trouvée dans notre extrait lyophilisé est de $136,4 \pm 7,3$ mg EAG/g extrait (EAG: Equivalent acide gallique). La figure 32 représente l'analyse HPLC de l'extrait phénolique lyophilisé.

1 mg de l'extrait phénolique lyophilisé /ml (900 μ L éthanol+ 100 μ L d'eau)

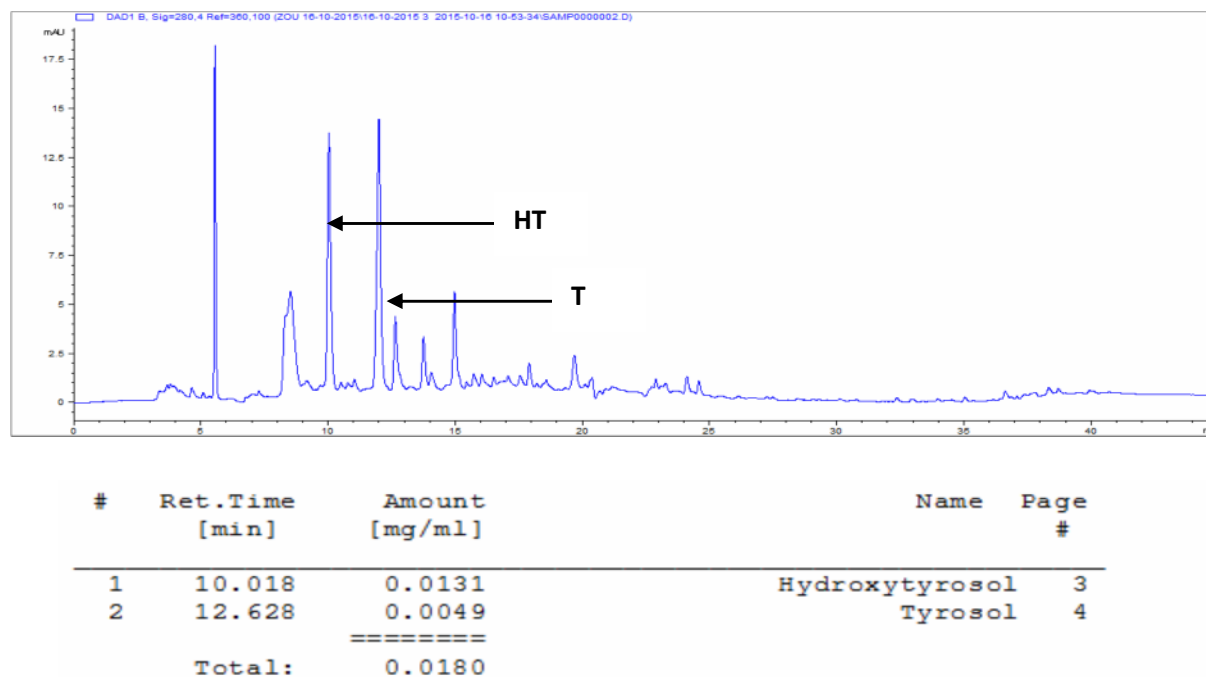


Figure 32. HPLC à 280 nm de l'extrait phénolique des margines testé sur les plaquettes. :

Débit : 0,5 ml/min. Temps de rétention de l'Hydroxytyrosol est de 10.018 min. Temps de rétention de tyrosol est de 12.628 min. HT : Hydroxytyrosol , Tyr : Tyrosol.

L'analyse HPLC de l'extrait phénolique utilisé dans cette partie expérimentale nous révèle la présence de deux composants phénoliques présents en très faible quantité par rapport aux valeurs rapportées par la littérature. Ainsi, la teneur en hydroxytyrosol et en tyrosol respectivement est de 0,0131 mg et 0,0049 mg dans 1 mg d'extrait phénolique lyophilisé.

2.3. Effets de l'extrait phénolique des margines sur l'activation plaquettaire induite par l'adrénaline

Test 3

Tableau XV. Effets de l'extrait phénolique sur l'activation plaquettaire (Test 3).

	A Plaquette + agoniste (0,1ml) + 5,4 µl de DMSO	B Plaquettes + agoniste (0,1 ml) + 5,4 µl d'extrait phénolique [81,97 µg de ppt / ml de PRP, ce qui correspond à 7,8 µg d'HT/ ml de PRP]
Nombre de plaquettes (×10³ /mm³)	122,50 ± 13,44	137,0 ± 27,9
Calcium (mg/L)	45,5 ± 0,56	45,1± 0,79
Fibrinogène (g/L)	2,06 ± 0,20	1,86 ± 0,20

La dose de l'extrait phénolique (5,4 µl / ml de PRP) n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de plaquettes sanguines.

La dose de l'extrait phénolique (5,4 µl / ml de PRP) n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de Calcium.

La doses de l'extrait phénolique (5,4 µl / ml de PRP) n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de fibrinogène.

Test 4

Tableau XVI. Effet de l'extrait phénolique sur l'activation plaquettaire (Test 4).

	A Plaquettes sans agoniste	B Plaquette + agoniste (0,1 ml) + 6 µl de DMSO	C Plaquettes + agoniste (0,1 ml) + 6 µl de l'extrait phénolique [90 µg de ppt ce qui correspond à 8,74 µg d'HT] /ml de PRP
Nombre de plaquettes (× 1000/ µl)	94,05 ± 2,61	64,05 ± 1,9	54,9 ± 5,37
Calcium mg/L)	49 ± 0	46,33 ± 0,57	45,66 ± 0,57
Fibrinogène (g/L)	1,71 ± 0	1,54 ± 0,03	1,58 ± 0,04

Le nombre de plaquettes a baissé d'une façon significative sous l'effet de l'adrénaline (**A** : $94,05 \pm 2,61$ vs **B** : $64,05 \pm 1,9 \times 1000/\mu\text{l}$), soit une diminution de 31,89 %. La dose de l'extrait phénolique (6 μl /ml de PRP) n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de plaquettes sanguines (**B** : $64,05 \pm 1,9$ vs **C** : $54,9 \pm 5,37 \times 1000/\mu\text{l}$).

Le taux de calcium a baissé d'une façon significative sous l'effet de l'adrénaline (**A** : 49 ± 0 vs **B** : $46,33 \pm 0,57$ mg/L), soit une diminution de 05,44 %. La dose de l'extrait phénolique (6 μl /ml de PRP) n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de calcium (**B** : $46,33 \pm 0,57$ vs **C** : $45,66 \pm 0,57$ mg/L)

Le taux de fibrinogène a baissé mais d'une façon non significative sous l'effet de l'adrénaline (**A** : $1,71 \pm 0$ vs **B** : $1,54 \pm 0,03$ g/L). La dose de l'extrait phénolique (6 μl /ml de PRP) n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de fibrinogène (**B** : $1,54 \pm 0,03$ vs **C** : $1,58 \pm 0,04$ g/L).

Le tableau XVII résume les résultats de l'ensemble des 4 tests.

Tableau XVII. Effets de l'adrénaline et de l'extrait phénolique sur l'activation des plaquettes.

La quantité testée /1ml de PRP		Le nombre de plaquettes	Le taux de calcium	Le taux de fibrinogène
Agoniste (adrénaline)	0,1 ml (test 1)	↓ de 27,88 %	↓ de 8,7 %	↓ non significative
	0,1 ml (test 4)	↓ de 31,89 %.	↓ de 05,44 %.	↓ non significative
	0,2 ml (test 1)	↓ de 25,07 %	↓ de 11,17 %	↓ de 28,82 %
	0,2 ml (test 2)	↓ de 34,48 %	↓ de 11,19 %	↓ non significative
	0,6 ml (test 2)	↓ de 28,26 %.	↓ de 25,07 %.	↓ non significative
Extrait phénolique	5,4 μl (test 3)	Pas de variation significative	Pas de variation significative	Pas de variation significative
	6 μl (test 4)	Pas de variation significative	Pas de variation significative	Pas de variation significative

Le taux du nombre des plaquettes sanguines contrairement au taux de calcium, n'est pas influencé par la concentration d'agoniste utilisée. Les résultats concernant le taux de fibrinogène restent mitigés. La combinaison entre un extrait phénolique des margines et un agoniste tel que l'adrénaline sur l'activation plaquettaire n'a pas été apportée par la littérature. Cependant plusieurs études ont été réalisées en utilisant de l'hydroxytyrosol (HT) combiné à d'autres agonistes tels que l'ADP, le collagène, l'acide arachidonique ou encore la thrombine. Ainsi PETRONI et *al.*(1995) rapportent l'effet inhibiteur de deux doses de l'HT (23µM et 67µM) sur l'agrégation plaquettaire, en utilisant respectivement les agonistes ADP (2µM) et le collagène (2µg/ml). La technique utilisée est le comptage du nombre des plaquettes.

Aussi, NAKASHIMA et *al.* (1991), révèlent l'existence d'une action anti-plaquettaire sélective et spécifique, par exemple la génistéine (un isoflavone, une classe des polyphénols) inhibe l'agrégation plaquettaire lorsqu'elle est induite par le collagène et non par la thrombine.

PETRONI et *al.* (1995) et LILL et *al.* (2003) rapportent que l'effet de certains polyphénols comme l'épigallocatechine et l'hydroxytyrosol sur l'agrégation plaquettaire est fonction du temps d'incubation, ainsi, l'inhibition maximale étant observée entre 10 et 30 min à partir du début de l'incubation.

Selon NATELLA et *al.* (2006), concernant les doses utilisées, le rapport inhibiteur / agoniste est un facteur expérimental important. Ces mêmes auteurs signalent également que la concentration utilisée pour induire une activité anti-agrégation détectable (> 5-1000 µM) est en général bien supérieure à tout niveau en circulation pouvant être atteint de manière réaliste par le régime alimentaire seul (1 à 2 µM). Seules quelques études *in vitro* démontrent que les polyphénols peuvent inhiber de manière significative l'agrégation plaquettaire à des concentrations proches d'un statut *in vivo* (HUBBARD et *al.*, 2003). Néanmoins, même si la concentration plasmatique d'une seule molécule n'est pas suffisante pour être efficace, la somme des concentrations de composés ayant des propriétés similaires peut éventuellement atteindre un niveau efficace. En fait, l'hypothèse selon laquelle un seul composé polyphénolique explique les effets *in vivo* d'un régime riche en phénol est trop stricte, car notre régime est une source riche en milliers de polyphénols, l'apport estimé atteignant 1 gramme par jour (CLIFFORD 2004).

Aussi, certains auteurs se sont interrogés sur les propriétés anti-agrégantes de ces composés *in vivo* (JANSSEN et *al.*, 1998). En effet, la majorité des études effectuées sur des cultures

cellulaires ont utilisé les formes natives des polyphénols, cependant, *in vivo*, les effets biologiques de ces derniers sont dus essentiellement à leurs produits de dégradation et /ou de conjugaison (SCALBERT et *al.*, 2002). Les futures études *in vitro* devront se focaliser essentiellement sur l'action des métabolites.

Bien qu'il est considéré comme un agoniste faible, l'épinephrine (adrénaline) est utilisé *in vitro* pour induire l'agrégation plaquettaire (BONECHI et *al.*, 2016). L'épinéphrine agit sur le récepteur $\alpha 2A$. NATELLA et *al.* (2006) rapportent que ce récepteur couplé à la protéine $G_{\alpha z}$ (une G_i), inhibe l'adénylate cyclase, empêchant ainsi une accumulation d'AMP cyclique, ce qui va potentialiser l'activation plaquettaire suite à l'augmentation du calcium cytosolique. Cette voie de signalisation fait partie des diverses autres voies que plusieurs agonistes (ADP, collagène, Thromboxane A₂, thrombine) entreprennent qui, toutes convergent vers l'activation du récepteur (GPIIb/GPIIIa). L'adrénaline peut aussi emprunter d'autres voies qui ne sont pas encore bien élucidées pour favoriser l'agrégation plaquettaire.

La mise au point de méthodes de plus en plus sophistiquées d'exploration fonctionnelle plaquettaire *ex vivo* permet non seulement de mieux identifier les anomalies des récepteurs responsables de la réactivité plaquettaire pour un diagnostic ciblé des maladies hémorragiques, mais aussi de prendre en charge de manière plus adaptée les traitements antiplaquettaires pour limiter au mieux le risque de récurrence thrombotique et/ou d'accident hémorragique. Parmi les techniques d'évaluation de l'agrégation plaquettaire l'agrégométrie par turbidimétrie, décrite par BORN (1962) et O'BRIEN (1962), est considérée comme la technique de référence d'évaluation de la fonction plaquettaire. Le dosage de certains marqueurs qui sont des contenus des granules de sécrétions libérés lors de l'activation est également utilisé, exemple le dosage des thromboxanes B₂ plaquettaires (métabolites stables des thromboxane A₂) (MUNOZ-MARIN et *al.*, 2013) , le dosage des leucocytes 6-keto-prostaglandin F_{1 α} (6-keto-PF_{1 α}) (GONZALEZ-CORREA et *al.*, 2009) etc.

Pour nos travaux, nous nous sommes focalisés sur le mécanisme d'agrégation plaquettaire via le récepteur $\alpha IIb \beta 3$ (GPIIb/IIIa ou CD41/CD61) qui lie le fibrinogène et le calcium, ainsi, si agrégation y est, le nombre de plaquettes serait diminué mais aussi le taux de fibrinogène et de calcium aussi serait bas car ils seront engagés dans la liaison *via* ce récepteur. Nous avons probablement apporté une méthode nouvelle et simple pour évaluer l'agrégation plaquettaire juste par énumération du nombre de plaquettes et dosage du taux de fibrinogène et du calcium.

Cependant cette méthode doit être vérifiée avec d'autres agonistes plus forts que l'adrénaline tels que l'ADP, le collagène ou l'acide arachidonique et aussi renouveler l'expérimentation en utilisant des antiagrégants plaquettaires plus particulièrement les inhibiteurs des intégrines plaquettaires GPIIb/IIIa (α IIb β 3) tels que l'abciximab, le tirofiban, ou l'eptifibatide (ENNOURI, 2010). .

Les polyphénols en général sont connus pour leurs effets inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire que ce soit *in vitro* (SAGESAKA-MITANE *et al.* 1990 ; RUSSO *et al.* 2001) ou *in vivo* chez l'animal (OSMAN *et al.* 1998; WOLLNY *et al.* 1999). En ce qui concerne les polyphénols spécifiques aux produits et sous-produits oléicoles, l'HT peut être considérée comme une molécule antithrombotique et anti-inflammatoire (CICERALE *et al.*, 2009). En effet, l'HT peut inhiber la production de cyclooxygénase (COX) (RICHARD *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2009) en diminuant la production de thromboxane B2 (TxB2) et de thromboxane A2 (TxA2) (DE ROOS *et al.*, 2001; LEGER *et al.*, 2005). Aussi, plusieurs auteurs comme PETRONI *et al.*(1995), DELL'AGLI *et al.*(2008) et GONZALEZ-CORREA *et al.*(2009) ont également rapporté l'effet inhibiteur des polyphénols de l'huile d'olive sur l'agrégation plaquettaire. Les travaux de DELL'AGLI *et al.*(2008) ont montré que l'extrait phénolique à partir d'huile d'olive, un extrait riche en hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropéine aglycone, quercétine, luteoline et apigénine, intervient dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes en inhibant la AMPc – phosphodiesterase, une enzyme qui hydrolyse l'AMPc .

Nos résultats concernant l'effet de l'extrait phénolique sur l'agrégation plaquettaire n'étaient pas concluants car l'effet inhibiteur rapporté par la bibliographie n'a pas été observé. Le rapport entre les doses des polyphénols par rapport à la dose d'Adrénaline utilisée peut être la cause de l'absence de cet effet inhibiteur.

Les composés phénoliques des margines sont hautement biodisponibles chez l'Humain, et par conséquent, ils peuvent exercer des effets bénéfiques sur la santé. Dans des études expérimentales (*in vivo* et *in vitro*), le rôle des polyphénols extraits des margines est très intensivement testé dans le traitement des perturbations métaboliques liée à l'obésité et aussi dans la modification de la fonction plaquettaire et cellulaire, ainsi les effets antiathérogènes associés à l'ingestion de composés phénoliques d'olive peut expliquer le faible taux de maladie cardiovasculaire dans les populations méditerranéennes.

Cependant l'extraction des polyphénols est onéreuse et l'utilisation des margines brutes qui peut être une alternative pour traiter des perturbations métaboliques liées à l'obésité (dyslipidémie et hyperglycémie), au diabète (hyperglycémie) et au syndrome métabolique, est notre objectif dans cette étude.

Les diverses conclusions de notre travail sont :

- le régime cafeteria testé a induit une augmentation significative du poids corporel, soit une augmentation de 19,18 % après 13 semaines de régime. Aussi, ce régime a causé des dyslipidémies telles qu'une augmentation significative du taux du cholestérol total après 12 semaines (augmentation de 20,45 %) et une augmentation significative aussi des triglycérides après 12 et 13 semaines (des augmentations de 87,58 % et de 156,25 % respectivement). L'hyperglycémie a augmenté de 77,70 % et de 45, 52 % après 12 et 13 semaines de régime respectivement.
- l'extrait phénolique testé pendant 12 semaines n'a pas eu d'impact sur le poids corporel. Pour les dyslipidémies, le taux du cholestérol total a significativement diminué de 33,69 %, cependant aucun effet sur le taux des triglycérides.
- les margines n'ont pas d'effets significatifs sur le poids corporel, cependant, ils ont un réel effet hypolipidémiant et hypoglycémiant en diminuant les taux du cholestérol de 18,98 %, des triglycérides de 29,51 % et de la glycémie de 23,77 %, aussi en augmentant le taux des HDL-cholestérol de 20,87 % après 13 semaines de régime hypercalorique.
- la toxicité des margines n'a pas été prouvée par nos travaux du moins pour les deux fonctions hépatique et rénale.
- L'extrait phénolique n'a pas eu d'effets sur l'activité plaquettaire, cependant nous avons probablement apporté une nouvelle méthode simple et moins couteuse pour évaluer l'agrégation plaquettaire.

Ainsi, des préparations de margines de haute qualité pour l'incorporation dans des boissons, dans l'alimentation ou les utiliser telles qu'elles sont comme remède thérapeutique ou encore les commercialiser sous forme de produits pharmaceutiques est un challenge ambitieux, cependant certaines précautions doivent être prises concernant les conditions de récolte et de stockage des olives, ainsi que le système d'extraction d'huile d'olive. En vue d'obtenir des margines de haute qualité, ces dernières doivent être traitées et stockées en utilisant les conditions appropriées (pH et température) qui maintiendraient leur concentration en polyphénols tout en minimisant les effets indésirables (par exemple, la dégradation des composés et brunissement). Elles doivent être prétraitées en utilisant des techniques peu onéreuses (par exemple ultrafiltration) qui maximisent la récupération des constituants bioactifs et rejetant une grande partie de la suspension solides en produisant un extrait clair et propre, aussi la stérilisation est une étape importante pour minimiser le développement des microorganismes, l'enrichissement en Hydroxytyrosol par différentes méthodes peut aussi contribuer à définir la qualité des margines. Bien que d'autres études soient nécessaires surtout sur l'éventuel effet toxique à long terme, les propriétés biologiques des margines peuvent avoir un impact significatif sur la santé de l'Homme par une réduction de l'incidence de nombreuses maladies non seulement pour celles qui sont liées à l'obésité mais aussi pour les autres pathologies neuro-dégénératives, cancers...etc. Ainsi les margines par leurs richesse en polyphénols peuvent être utilisées tout simplement diluées dans l'eau de boisson pour en bénéficier de tous leurs bienfaits.

Les perspectives pour notre travail sont :

Diverses études *in vitro* ont testé l'effet de l'oleuropéine sur diverses enzymes digestives (commerciales), et plus particulièrement la lipase. Ces études ont clairement montré l'effet inhibiteur compétitif de ce composé phénolique sur l'activité de cette enzyme (POLZONETTI et *al.*, 2010). L'effet des margines brutes aussi peut être testé sur la lipase. Concernant l'effet hypoglycémique, l'action directe des margines sur l'activité des isomaltase, lactase et ... (études *in vitro*) peut être également vérifiée.

Pour la nouvelle technique exposée afin de déterminer l'agrégation plaquettaire, il est intéressant de la renouveler avec d'autres agonistes plus puissants tels que l'ADP, la thrombine ou le collagène en combinaison avec des antiagrégants plaquettaires plus particulièrement des inhibiteurs des intégrines plaquettaires ($\alpha\text{IIb } \beta 3$).

-A-

ACHAK M., OUAZZANI N., YAACOUBI A. and MANDI L.(2008). Modern olive mill effluent characterization and their treatment by coagulation–flocculation using lime and aluminium sulphate. *Revue des Sciences de l'Eau*, 21 (1), 53-67.

AGGOUN M., ARHAB R., CORNU A., PORTELLI J., BARKAT M. and GRAULET B. (2016). Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process. *Food Chemistry*, 209, 72–80.

AISSAM H. (2003). Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat national. Université sidimohamed ben abdellah. Fes. Tunisie.156p.

ALLOUCHE N., FKI I. and SAYADI S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 267–273.

AMARAL CARL A., MARCO S. LUCAS., JOAˆO COUTINHO., ANTONIO L.. CRESPIˆ., MARIA DO ROSAˆRIO ANJOS A. and CEˆLIA PAIS B. (2008). Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal. *Bioresource Technology*, 99, 7215–7223.

ANONYME 1. ONFAA (Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires). Juin **2014**. Marché International de l'huile d'olive Juin 2014. République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche.

ANONYME 2. ONFAA. (Observatoire National des Filières Agricoles et Agroalimentaires). Juin **2016**. Bilan de la campagne oléicole 2015/2016 « Segment huile d'olive ». République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche.

ANONYME 3. SAMIA BOUB, journal anonyme

ASFI M., OUZOUNIDOU G., PANAJIOTIDIS S., THERIOS I. and MOUSTAKAS M.(2012). Toxicity effects of olive-mill wastewater on growth, photosynthesis and pollen morphology of spinach plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 69-75.

AUNON-CALLES D., CANUT L. and VISIOLI F. (2013). Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 498-504.

-B-

BACHELOT C., FALET H. et RENDU F. (1995). Récepteurs et mécanismes d'activation plaquettaire. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 17, 39-44.

BAI C., YAN X., TAKENAKA M., SEKIYA K. and NAGATA T. (1998). Determination of Synthetic Hydroxytyrosol in Rat Plasma by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 3998-4001.

BALICE V., BOARI G., CERA O. and ABBATICCHIO P. (1982). Indagine analitica sulle acque di vegetazione. *Nota 1. Inquinamento*, 7, 49-53.

BALICE V. and CERA O. (1984). Acidic phenolic fraction of the juice of olives determined by gas chromatographic method. *Grasas y Aceites*, 25, 178-180.

BASU A., WILKINSON M., PENUGONDA K., SIMMONS B., BETTS N.M. and LYONS T.J.(2009).Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutr. J.*, 8,43.

BAUDIN B. (2019). Les vitamines du groupe B : structures et rôles dans le métabolisme, déficits nutritionnels. B vitamins: structure and functions in metabolism, nutritional defects. *Revue Francophone des Laboratoires*, 514, 36-44.

BEASLAS O., CUEILLE C., DELERS F., CHATEAU D., CHAMBAZ J., ROUSSET M. et CARRIERE V.(2012). Detection lumineuse des micelles lipidiques. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 47, 280-283.

BEGLOVA N., BLACKLOW S. C. and TAKAGI J. (2002). Springer. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat. Struct. Biol.*, 9(4), 282-7.

BEHNKE O. and FORER A. (1998). From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur. J. Haematol. Suppl.*, 61, 3-23.

BERNINI R., MERENDINO N., ROMANI A. and VELOTTI F. (2013). Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. *Current Medicinal Chemistry*, 20(5), 655-670.

BERRICHE O., SAHNOUN M., ALAYA W., ZANTOUR B. et HAMMAMI S. (2015). Dyslipidémie et obésité : les relations sont-elles si étroites ? *Annales d'Endocrinologie*, 559-571.

BIANCO A. and UCCELLA N. (2000). Biophenolic components of olives. *Food Res. Int.*, 33, 475-485.

BLIKA P S., STAMATELATOU K. and KORNAROS M. (2009). Anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Global NEST Journal*, 11(3), 364-372.

BLOCKMANS D., DECKMYN H. and VERMYLEN J. (1995). Platelet activation. *Blood Rev.*, 9, 143-156.

BONECHI C., LAMPONI S., DONATI A., TAMASI G., CONSUMI M., LEONE G., ROSSI C. and MAGNANI A. (2016). Effect of Resveratrol on Platelet Aggregation by Fibrinogen Protection. *Biophysical Chemistry*, 222, 41-48.

BONEU B. et CAZENAVE J. P. (1997). "Introduction à l'étude de l'Hémostase et de la Thrombose. 2^{ème} édition." Alinéa.

BORN G.V.R. (1962). Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J. Physiol.*, 162, 67-68.

BOUCLAOUS C., TORBAY N., NASSAR C. and HWALLA N. (2003). Modification of glucocorticoid effects on body weight gain, plasma lipids by changes in diet composition. *Nutr. Res.*, 23(8), 1105-1115.

BARZILAI N. and ROSSETTI L. (1995). Relationship between changes in body composition and insulin responsiveness in models of the aging rat. *American journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 269(3), 591-597.

BROOS K., FEYS H.B., DE MEYER S.F., VANHOORELBEKE K. and DECKMYN H. (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.*, 25, 155-167.

BURSILL C.A. and ROACH P.D. (2006). Modulation of Cholesterol Metabolism by the Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin Gallate in Cultured Human Liver (HepG2) Cells. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (5), 1621–1626.

-C-

CAO K., XU J., ZOU X., LI Y., CHEN C., ZHENG A. LI H. LI H. MAN-YAUSZETO I. SHI Y. LONG J. LIU J. and FENG Z. (2014). Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radical Biology & Medicine.*, 67,396-407.

CARDINALI A., CICCIO N., LINSALATA V., MINERVINI F., PATI S., PIERALICE M., TURSI N. and LATTANZIO V. (2010). Biological Activity of High Molecular Weight Phenolics from Olive Mill Wastewater. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 8585-8590.

CARSIA R.V., WEBER H., MCILROY P.J. and HOCK C.E. (2008). Long-term dietary lipid regimen alters adrenocortical function at the cellular level. *Hormone and metabolic research.*, 40(12), 848-853.

CARUSO D., VISIOLI F., PATELLI R., GALLI C. and GALLI G. (2001). Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism*, 50, 1426-1428.

CECCON L., SACCÙ D., PROCIDA G. and CARDINALI S. (2001). Liquid Chromatographic Determination of Simple Phenolic Compounds in Waste Waters from Olive Oil Production Plants. *Journal of AOAC International*, 84(6), 1739-1744.

CHAROENPRASERT S. and MITCHELL A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7081-7095

CHASHMI N. A., EMADI S. and KHASTAR H. (2017). Protective effects of hydroxytyrosol on gentamicin induced nephrotoxicity in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 1427-1429.

CHRISTIAN M. S., SHARPER V. A., HOBERMAN A. M., SENG J. E., FU L., COVELL D., Diener R.M., Bitler C.M. and CREA R. (2004). The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug and Chemical Toxicology*, 27(4), 309-330.

CICERALE S., CONLAN X. A., SINCLAIR A. J. and KEAST. R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 218-236.

CICHELLI A. and SOLINAS M. (1984). I composti fenolici delle olive e dell'olio di oliva. *Riv. Merceol.*, 23, 55-69.

CLIFFORD M. N. (2004). Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*, 70, 1103-14.

COATMELLECC-TAGLIONI G., DAUSSE J.P., GIUDICELLI Y. and RIBIERE C. (2003). Sexual dimorphism in cafeteria diet-induced hypertension is associated with gender-related difference in renal leptin receptor down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther.*, 305(1), 362-367.

C.O.I. (Conseil Oléicole International). **2008**

C.O.I (Conseil oléicole international). Novembre **2014**. Huile d'olive. Production.

CORCOS T. (2012). Les complications cardiovasculaires de l'obésité. *Médecine & Longévité*, 4, 99-110

CROUVEZIER S., POWELL D., KEIR D. and YAQOOB P.(2001). The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Citokine*, 13,280-286.

-D-

DAGLAA I., BENAKIA D., BAIRA E., LEMONAKISB N., POUDYALC H., BROWND L., TSARBOPOULOSE A., SKALTSOUNISB A.L., MIKROSA E. and GIKASA E. (2018). Alteration in the liver metabolome of rats with metabolic syndrome after treatment with Hydroxytyrosol. A Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance - based metabolomics study. *Talanta*, 178, 246-257.

DANELAKIS D., NTAIKOUB L., KORNAROS M. and DAILIANIS S. (2011). Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 101, 358–366

D'ANGELO S., MANNA C., MIGLIARDI V., MAZZONI O., MORRICA P., CAPASSO G., PONTONI G., GALLETTI P. and ZAPPIA V. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 1492-1498.

DARIMONT C., TURINI M., EPITAUX M., ZBINDEN I., RICHELLE M., MONTELL E., FERRER-MARTINEZ A. and MACÉ K. (2004). β 3-adrenoceptor agonist prevents alterations of muscle diacylglycerol and adipose tissue phospholipids induced by a cafeteria diet. *Nutrition & Metabolism*, 1,4.

DELATTRE J., DURAND G. and JARDILLIER J.C. (2003). Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Ed. Flammarion, Paris. 317p.

DELL'AGLI M., MASCHI O., GALLI G.V., FAGNANI R., DAL CERO E., CARUSO D. and BOSISIO E. (2008). Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP phosphodiesterase. *Br. J. Nutr.*, 99, 945–951.

DEL BOCCIO P., DI DEO A., DE CURTIS A., CELLI N., IACOVIELLO L. and ROTILIO D. (2003). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration. *Journal of Chromatography B.*, 785, 47-56.

DE LEONARDIS A., MACCIOLA V., LEMBO G., ARETINI A. and AHINDRA N.A.G. (2007). Studies on oxidative stabilisation of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater. *Food Chemistry*, 100,998-1004.

DE LEONARDIS A., ARETINI A., ALFANO G, MACCIOLA V. and RANALLI G. (2008). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, 226(4), 653–659.

DELLA GRECA M., PREVITERA L., TEMESSI F. and CARRELLI A. (2004). Lowmolecular- weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochemical Analysis*, 15, 184-188.

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

DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F and MICHAUD P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48, 1532–1552.

**DE ROOS B., ZHANG X., RODRIGUEZ- GUTIERREZ G., WOOD S.,
UCKLIDGE G.J., REID M.D.,** Duncan G.J., Cantlay L.L., Duthie G.G. and

O'KENNEDY N. (2011). Anti-platelet effects of olive oil extract: in vitro functional and proteomic studies. *European Journal of Nutrition*, 50(7), 553-562.

DIEBOLT M., BUCHER B. and ANDRIANTSITOHAINA R. (2001). Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilation, and induce gene expression. *Hypertension*, 38,159-165.

DI GIOVACCHINO L., SESTILI S. and DI VINCENZO D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 587-601.

DOMINGUEZ-PERLES R., AUNON D., FERRERES F. and GIL-IZQUIERDO A. (2017). Gender differences in plasma and urine metabolites from Sprague-Dawley rats after oral administration of normal and high doses of hydroxytyrosol hydroxytyrosol acetate and DOPAC. *European Journal of Nutrition*, 56(1), 215-224.

DONNELLY K.L., SMITH C.I., SCHWARZENBERG S.J., JESSURUN J., BOLDT M.D. and PARKS E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 115:1343–1351.

DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J.K., REBERS P.A. and SMITH F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167.

-E-

EL-ABBASSI A., KHAYET M. and HAFIDI A. (2011). Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 45, 4522 -4530.

EL-ABBASSI A., KIAI H. and HAFIDI A. (2012). Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chemistry*, 132, 406-412.

ENNOURI A. (2010). Inhibiteurs du fonctionnement plaquettaire : données de la littérature. Thèse de Doctorat . <http://ao.um5s.ac.ma/xmlui/handle/123456789/1944>

ERICKSON S.K. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease. *J. Lipid. Res.* 50:412–416.

-F-

FAUCHER P. et POITOU C. (2016). Physiopathologie de l'obésité. *Revue du rhumatisme monographies*, 83 (1), 6-12.

FERNANDEZ DIAZ M.J. (1983). Olives. In Rehm H.J., Reed G. (eds) *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, 5, 379-397.

FIESTAS ROS DE URSINOS J.A. (1981). Différentes utilisations des margines. Actes du Séminaire International sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture (FAO). Tunisie.* 93-110.

FIESTAS ROS DE URSINOS J.A. and BORJA PADILLA R. (1992). Use and treatment of olive mill wastewater. Current situation and prospects in Spain. *Grasas Aceites*, 43, 101–106.

FIorentino A., Gentili A., ISIDORI M., MONACO P., NARDELLI A., PANELLA A. and FABIO T. (2003). Environmental effects caused by olive mill waste waters: Toxicity comparison of low-molecular-weight phenol compounds. *J. Agr. Food Chem.*, 51, 1005-1009.

FISHER N. D. L., HUGHES M., GERHARD-HERMAN M. and HOLLENBERG N. K. (2003). Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide dependent vasodilation in health human. *J. Hypert.*, 21, 2281-2286.

FITZGERALD D.J. (1997). Platelet activation in unstable coronary diseases. *N. Engl. J. Med.*, 315 (16), 983-999.

FKI I., BOUAZIZ M., SAHNOUN Z., SAYADI S. (2005). Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. *Bioorg. Med. Chem.*, 15(13), 5362-70.

FKI I., SAHNOUN Z., SAYADI S. (2007). Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *J. Agric. Food. Chem.*, 55 (3), 624-31.

FUHRMAN B., LAVY A. and AVIRAM M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61,549–554.

-G-

GARRISON R.J., HIGGINS M.W. and KANNEL W.B. (1996). Obesity and coronary heart disease. *Curr. Opin. Lipid.*,7,199-202.

GATTA-CHERIFI B. (2016). Obésités : quoi de neuf en 2016 ? *Annales d'Endocrinologie*, 77, 29-35.

GONZALEZ-SANTIAGO M., MARTÍ'N-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.

GONZALEZ-CORREA J.A., LOPEZ-VILLODRES J.A., ASENSI R., ESPARTERO J.L., RODRIGUEZ- GUTIEREZ G. and DE LA CRUZ J.P. (2009). Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid. *Br. J. Nutr.*, 101, 1157–1164.

GOTO K., KANAYA S., NISHIKAWA T., HARA H., TERADA A., ISHIGAMA T. and HARA Y. (1998). The influence of tea catechins on fecal flora of elderly residents in long-term care facilities. *Ann. Long-Term Care*, 6,43-48.

GRANADOS-PRINCIPAL S., QUILES J.L., RAMIREZ-TORTOSA C.L., OCHOA-HERRERA J., PEREZ-LOPEZ P., PULIDO-MORAN M. and RAMIREZ-TORTOSA M.C. (2012). Squalene ameliorates atherosclerotic lesions through the reduction of CD36 scavenger receptor expression in macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(5),733-740.

GRANADOS-PRINCIPAL S., EL-AZEM N., PAMPLONA R., RAMIREZ-TORTOSA C., PULIDO-MORAN M., VERA-RAMIREZ L. and RAMIREZ-TORTOSA M.C. (2014). Hydroxytyrosol ameliorates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with breast cancer. *Biochemical pharmacology*, 90(1), 25-33.

-H-

HALL K.D., BAIN H.L. and CHOW C.C. (2007). How adaptations of substrate utilization regulate body composition. *Int.J. Obes.*, 31, 1378-1383.

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.

HAMDEN K., ALLOUCHE N., JOUADI B., EL-FAZAA S., GHARBI N., CARREAU S., DAMAK M. and ELFEKI A. (2010). Inhibitory Action of Purified Hydroxytyrosol from Stored Olive Mill Waste on Intestinal Disaccharidases and Lipase Activities and Pancreatic Toxicity in Diabetic Rats. *Food Sci. Biotechnol.*, 19(2), 439-447.

HAMDI M. (1991). Nouvelle conception d'un procédé de dépollution biologique des margines, effluents liquides de l'extraction de l'huile d'olive. Thèse de doctorat de l'université de Provence. Marseille. France.

HARA-KUDO Y., YAMASAKI A., SASAKI M., OKUBO T., MINAI Y., HAGA M., KONDO K. and SUGITA-KONISHI Y. (2005). Antibacterial action on pathogenic bacterial spore by green tea catechins. *J. Sci. Food Agr.*, 85, 2354-2361.

HEILMAN J., ANYANGWE N., TRAN N., EDWARDS J., BEILSTEIN P. and LOPEZ, J. (2015). Toxicological evaluation of an olive extract H35: Subchronic toxicity in the rat. *Food And Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 84, 18-28.

HU T., HE X.W., JIANG J.G. and XU X. L. (2014). Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1449-1455.

HUBBARD G. P., STEVENS J. M., CICMIL M., SAGE T., JORDAN P. A., WILLIAMS C. M., LOVEGROVE J. A. and GIBBINS J. M. (2003A). Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1, 1079-88.

-J-

JANSSEN K., MENSINK R. P., COX F. J., HARRYVAN J. L., HOVENIER R., HOLLMAN P. C. and KATAN M. B. (1998). Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67, 255-62.

a JEMAI H., BOUAZIZ M., FKI I., EL FEKI A. and SAYADI S. (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2-3), 88-98.

b JEMAI H., FKI I., BOUAZIZ M., BOUALLAGUI Z., EL FEKI A., ISODA H., SAYADI S. (2008). Lipid-Lowering and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Its Triacetylated Derivative Recovered from Olive Tree Leaves in Cholesterol-Fed Rats. *J Agric Food Chem*, 56 (8), 2630–2636.

JIMENEZ B., SANCHEZ-ORTIZ A. and RIVAS A. (2014). Influence of the malaxation time and olive ripening stage on oil quality and phenolic compounds of virgin olive oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 2521–2527.

-K-

KANG O.H., JANG H.J., CHAE H.S., OH Y.C., CHOI J.G., LEE Y.S., KIM J.H., KIM Y.C., SOHN D.H., PARK H. and KWON D.Y. (2009). Anti-inflammatory mechanisms of resveratrol in activated HMC-1 cells: Pivotal roles of NF-kB and MAPK. *Pharmacol. Res.*, 59,330-337.

KARLESKIND A., WOLFF J.P. (1992). Fats Manual, **Karleskind, A.**(Ed), Lavoisier, Paris , pp. 1-787.

KAYANO T., BURANT C., FUKUMOTO H., GOULD G., FAN Y., EDDY R., BYERS M., SHOWS T., SEINO S. and BELL G.(1990). Human facilitative glucose transporters. *Journal of Biological Chemistry.*, 265,13276-13282.

KHAYYAL M.T., EL-GHAZALY M.A., ABDALLAH D.M., NASSAR N.N., OKPANYI S.N. and KREUTER M.H. (2002). Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittelforschung.*, 52(11), 797-802.

KHOEFI S., HAMZA M. and SAYADI S. (2011). Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment. *Bioresource Technology.* , 102, 9050-9058.

KIEFFER N., GUICHARD J., FARCET J. P., VAINCHENKER W. and BRETON-GORIUS J. (1987). Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur. J. Biochem.*, 164,189-195.

KRZEMINSKI R., GORINSTEIN S., LEONTOWICZ H., LEONTOWICZ M., GRALAK M., CZERWINSKI J., LOJEK A., ČÍŽ M., MARTIN-BELLOSO O., GLIGELMO-MIGUEL N. and TRAKHTENBERG S. (2003). Effect of Different Olive Oils on Bile Excretion in Rats Fed Cholesterol-Containing and Cholesterol-Free Diets. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (19),5774–5779.

KURTH T., GAZIANO J.M., BERGER K., REXRODE K.M., COOK N.R. and BURING J.E. (2002). Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch. Intern. Med.*, 162, 2557-62.

-L-

LAGARDE M., BRYON P. A., GUICHARDANT M. and DECHAVANNE M. (1980). A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb. Res.*, 17, 581-588.

LARROSA M., YANEZ-GASCON M. J., SELMA M. V., GONZALEZ-SARRÍAS A., TOTI S. CERON J. J., TOMÁS-BARBERAN F., DOLARA P. and ESPÍN J.C. (2009). Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *J. Agr. Food Chem.*, 57, 2211-2220.

LA SCALIA G., MICALE R., CANNIZZARO L. AND MARRA F. P. (2017). A sustainable phenolic compound extraction system from olive oil mill wastewater. *Journal of Cleaner Production.*, 142, 3782–3788.

LECERF J.M. (2008). Apport lipidique et prise de poids. Aspects quantitatifs – un débat. *Cah. Nutr. Diet.*, 43, 3.

LEE I.T., CHANI Y.C., LIN C.W., LEE W.J. and SHEU W.H-H. (2008). Effects of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with type 2 diabetes. *Diabet.Med*, 25, 1473-1477.

LEGER C.L., CARBONNEAU M.A., MICHEL F., MAS E., MONNIER L., CRISTOL J.P. and DESCOMPS B. (2005). A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition.*, 59(5), 727-730.

LESAGE-MEESSENA L., NAVARROA D., MAUNIERA S., SIGOILLOTA J-C., LORQUINB J., DELATTREA M., SIMONC J-L., ASTHERA M. and LABATB M. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry.*, 75 (2001), 501–507.

LEULMI N. (2011). Thèse de Magister : La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l’ovin. Université Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biochimie et de Microbiologie.

LILL G., VOIT S., SCHROR K. and WEBER A. A. (2003). Complex effects of different green tea catechins on human platelets. *FEBS Letters*, **546**, 265-70.

LOOMBA R. and SANYAL A.J. (2013). The global NAFLD epidemic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10: 686–690.

LOPES M., ARAUJO C., AGUEDO M., GOMESN., ALVES G C., TEIXEIRA J A and BELO I. (2009). The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 533–537

LOUADJ L. and GIUFFRÈ A M. (2010). Analytical characteristics of olive oil produced with three different processes in Algeria. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 87, (3), 186-195.

LU Y., HAJIFATHALIAN K. and EZZATI M (2014). Global burden of metabolic risk factors for chronic diseases collaboration (BMI mediated effects). Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke: a pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1.8 million participants. *Lancet.*, 383 (9921), 970-83.

MANNA C., GALLETTI P., MAISTO G., CUCCIOLLA V., DANGELO S. and ZAPPIA V. (2000). Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters.*, 470, 341-344.

MANSOUR-BENAMAR M., SAVOIE J.M., CHAVANT L. (2013). Valorization of solid olive mill wastes by cultivation of a local strain of edible mushrooms. *Comptes Rendus Biologies*, 336(8), 407-415. DOI: 10.1016/j.crv.2013.07.004.

MEDINA-MARTINEZ M.S., TRUCHADO P., CASTRO-IBANEZ I. and ALLENDE A. (2016). Antimicrobial activity of hydroxytyrosol: a current controversy. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.*, 80(4), 801-810.

MOSELE J.I., MARTIN-PELAEZ S., MACIA A., FARRAS M., VALLS R.M., CATALAN U. and MOTILVA M.J. (2014). Faecal microbial metabolism of olive oil phenolic compounds: in vitro and in vivo approaches. *Molecular Nutrition & Food Research.*, 58(9), 1809-1819.

MOTAIB I. G. ELMGHARI G. et EL ANSARI N. (2013). Corrélation de sévérité de l'obésité et du profil de la dyslipidémie, à propos de 120 cas. *Annales d'Endocrinologie.*, 74(4), 458.

MUKHERJEE S., DAS S. K. and VASUDEVAN D. M. (2009). Role of polyphenols in diet and nutrition-an updated review. *Curr. Nutr. Food Sci.*, 5, 149-159.

MUÑOZ-MARIN J., DE LA CRUZ J.P., REYES J.J., LOPEZ-VILLODRES J.A., GUERRERO A., LOPEZ-LEIVA I., ESPARTERO J.L., LABAJOS M.T. and GONZALEZ-CORREA J.A. (2013). Hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives inhibit platelet activation after oral administration to rats. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 295–300.

NADOUR M. (2015). Extraction, caractérisation des polysaccharides et des polyphénols issus des sous-produits oléicoles. Valorisation des polysaccharides à visée alimentaire. Thèse de doctorat en Sciences biologiques. Option : Biochimie appliquée et biotechnologies. Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi – Ouzou

NAKASHIMA S., KOIKE T., and NOZAWA Y. (1991). Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane A₂- mediated human platelet responses. *Molecular Pharmacology*, 39, 475-480.

NATELLA F., NARDINI M., VIRGILI F. AND SCACCINI C. (2006). Role of dietary polyphenols in the platelet aggregation network - a review of the in vitro studies. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 4(1),1-22.

NEWMAN P. J., GORSKI J., WHITE G. C., GIDWITZ S., CRETNEY C. J. and ASTER R.H. (1988). Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest.*, 82, 739-743.

NIAOUNAKIS M. and HALVADAKIS CP. (2006). Olive processing waste management literature review and patent survey. *2nd ed, Elsevier: Waste Management Series.*, 5, 23-64.

NIGDIKAR S. V., WILLIAMS N. R., GRIFFIN B. A. and HOWARD A. N. (1998). Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of lowdensity lipoproteins to oxidation in vivo. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68,258-265.

NOMOTO M., YAMADA K., HAGA M. and HAYASHI M. (1998). Improvement of intestinal absorption of peptide drugs by glycosylation: transport of tetrapeptide by the sodium ion-dependent D-glucose transporter. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(3), 326-332.

NURDEN A.T. (2006). Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet. J. Rare. Dis.*, 1, 10.

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(4), 823-837.

O'BRIEN J.R. (1962). Platelet aggregation Part II: some results of a new method. *J. Clin. Pathol.*, 15, 452-5.

OSMAN H.E., MAALEJ N., SHANMUGANAYAGAM D. and FOLTS J.D. (1998). Grape Juice but Not Orange or Grapefruit Juice Inhibits Platelet Activity in Dogs and Monkeys *Macaca fascicularis*). *The Journal of Nutrition.*, 128 (12), 2307–2312.

-P-

PADILLA E., RUIZ E., REDONDO S., GORDILLO-MOSCOSO A., SLOWING R. and TEJERINA I. (2005). Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish Wines. *Eur. J. pharmacol.*, 517, 89-91.

PARASKEVA P. and DIAMADOPOULOS E. (2006). Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81, 475-1485.

PARKAR S. G., STEVENSON D. E. and SKINNER M. A. (2008). The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int. J. Food Microbiol.*, 124, 295-298.

PERUTELLI P. and MORI P.G. (1992). The human platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex: a multi functional adhesion receptor. *Haematologica.*, 77, 162-168.

PETRONI A., BLASEVICH M., SALAMI M., PAPINI N., MONTEDORO G.F. and GALLI C. (1995). Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb. Res.*, 78, 151–160.

POLZONETTI V., NATALINI P., VINCENZETTI S., VITA A. and PUCCIARELLI S. (2010). *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. Chapter 148 - Modulatory Effect of Oleuropein on Digestive Enzymes*, 1327-1333.

POSTIC C. and GIRARD J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* 118: 829–838.

POUDYAL H., CAMPBELL F. and BROWN L. (2010). Olive leaf extract attenuates cardiac hepatic and metabolic changes in high carbohydrate- high fat-fed rats. *The Journal of Nutrition.*, 140(5), 946-953.

PRATS E., MONFAR M., CASTELLA J., IGLESIAS R. and ALEMANY M. (1989). Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiology & behavior.*, 45(2) ,263-272.

PRENTICE A.M. and DUNN M.R.C. (1998). Manipulation of dietary fat and energy density and subsequent effects on substrate flux and food intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 67 : 535-541.

-R-

RAMOS-CORMENZANA A. (1986). Physical, chemical, microbiological and biochemical characteristics of vegetation water. In: SevilleSpain, FAO (Ed.), International Symposium on “Olive by-products valorization”, UN Development Programme, pp. 19–40.

RANALLI A. (1991). The effluent from olive mills : Proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae.*, 37,30-39.

RIBEREAU-GAYON P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris page,254.

RICHARD N., ARNOLD S., HOELLER U., KILPERT C., WERTZ K. and SCHWAGER J. (2011). Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages. *Planta Medica.*, 77(17), 1890-1897.

ROBLES-ALMAZAN M., PULIDO-MORAN M., MORENO- FERNANDEZ J., RAMIREZ-TORTOSA C., RODRIGUEZ-GARCIA C., QUILES J.L. AND RAMIREZ-TORTOSA MC. (2017). Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Research International*, S0963-9969(17)30822-0.

RODIS P.S., KARATHANOS V.T. and MANTZAVINOU A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (3), 596-601.

RODRIGUEZ-MORATO J., XICOTA L., FITO M., FARRE M., DIERSSEN M. and DE LA TORRE R. (2015). Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules (Basel Switzerland)*, 20(3), 4655-4680.

RODRÍGUEZ-MORATÓ J., BORONAT A., KOTRONOULAS A., PUJADAS A., PASTOR A. and OLESTI E.(2016). Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin:hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metabolism Reviews*, 48, 218-236.

ROMERO C., BRENES M., GARCIA P. and GARRIDO A. (2002). Hydroxytyrosol-4-b-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3835-3839.

ROMERO M.M., ESTEVE M. and ALEMANY M.(2006). Combined effects of oral oleoyl-estrone and limited food intake on body composition of young overweight male rats. *International journal of obesity*, 30(7),1149-1156.

RUSSO P., TEDESCO I., RUSSO M., RUSSO G.L., VENESIA A. and CICALA C. (2001). Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation. *Nutr. Metab. Cardiocasc. Dis.*, 11, 25-29.

SAGESAKA-MITANE Y., MIWA M. and OKADA S. (1990). Platelet Aggregation Inhibitors in Hot Water Extract of Green Tea. *Chem. Pharm. Bull.*, 38(3), 790-793.

SALVEMINI F. (1985). Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essicando tercamente le acque di vegetazione delle olive. *Riv.Delle Sostanze Grasse*, 112, 559-564.

SANTANGELO C., VARÌ R., SCAZZOCCHIO B., DI BENEDETTO R., FILESI C. and MASELLA R. (2007). Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann. Ist. Super. Sanità.*, 43(4), 394-405.

SCALBERT A., MORAND C., MANACH C. and RÉMÉSY C. (2002). Dossier: Polyphenols: diversity and bioavailability. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother*, 56, 276-282.

SCALBERT A., JOHNSON I. T. and SALTAMARSH M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* 81,215-217.

SCHAFFER S., MÜLLER W. E. and ECKERT. G.P.(2010). Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacological Research*, 62,322-327.

SCHEMMEL R. MICKELSEN O. and GILL J.L. (1970). Dietary Obesity in Rats: Body Weight and Body Fat Accretion in Seven Strains of Rats. *The Journal of Nutrition*, 100 (9), 1041–1048.

SCHINNER F., OHLINGER R., KANDELER E. and MARGESIN R. (1996). *Methods in Soil Biology*. Springer, Berlin, ISBN-10, 3642646336, 426 pages.

SCHLIENGER J.L. (2010). Conséquences pathologiques de l'obésité. *Presse Med.* 39: 913–920.

SCHNEIDER D. J., HOLMES C. E., TAATJES-SOMMER H. S. and SOBEL B. E. (2008). Contributions of young platelets and of previously activated platelets to platelet reactivity in patients with coronary artery disease. *Thromb. Res.*, 121,455-462.

SCHRAUWEN P., VAN MARKEN LICHTENBELT W.D., SARIS W.H. and WESTERTEP K.R. (1997). Changes in fat oxidation in response to a high fat diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66, 276-282.

SCHWIMMER J.B., DEUTSCH R., KAHEN T. et al. (2006). Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics*,118:1388-93.

SENANI-OULARBI N., MOULTI-MATI F., LETTERON P., DUCROC R., EL BENNA J. and MARIE J-C. (2017). Hypoglycemic effect of olive mill wastewater in mice involves the sglt-1 transporter.*International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9 (1), 73-78.

SENANI-OULARBI N., RIBA A. and MOULTI-MATI F. (2018). Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production by olive mill wastewater. *Bioscience Research*, 15(1), 369-380.

SERRA A., RUBIO L., BORRAS X., MACIA A., ROMERO M.P. and MOTILVA M.J. (2012). Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(3), 486-496.

SFAR H., MAHJOUB F. HTIRA Y., BEN OTHMAN R., CHAARI C., KILANI O., GAMOUDI A. et JAMOSSI H. (2014). Troubles lipidiques associés à l'obésité à propos de 100 cas .*Nutrition Clinique et Métabolisme*, 28(1),123.

SHATTIL S. J. and NEWMAN P.J. (2004). Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*, 104(6), 1606-15.

SINGLETON V. L. and ROSSI J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*,16, 144-158.

SOLER-RIVAS C., ESPIN J. C. and WICHERS H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 80,1013-1023.

STEVENS A. et LOWE J. (1997). [Histologie humaine]. Deuxième édition traduite par Validire P. Bruxelles ; Paris : De Boeck université, page, 408.

SUAREZ M., VALLS R.M., ROMERO M.P., MACIA A., FERNANDEZ S., GIRALT M., SOLA R. and MOTILVA M.J.(2011). Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil. *The British Journal of Nutrition*, 106(11), 1691-1701.

-T-

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. *Journal of Chromatography B*, 785,187-191

TANCHEV S., JONCHEVA N., GENOV N. and CODOUNIS M. (1980). Identification of anthocyanins contained in olives. *Georgike Ereuna*, 4, 5-73.

TEMESSEK A., TERTEK H., DOGHRI S., BOUSSELMI J., BERRICHE O. and BLOUZA S. (2013). Obésité viscérale et désordres métaboliques: à propos de 70 cas. *Diabetes & Metabolism*,39(1),114-115.

THATTALIYATH B., CYKOWSKI M. and JAGADEESWARAN P. (2005). Young thrombocytes initiate the formation of arterial thrombi in zebrafish. *Blood*, 106, 118-124.

TONJES A., BLUHER M. and STUMVOLL M. (2010). Retinol-binding protein 4 and new adipocytokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Pharm. Design.*, 16,1921–1928.

TORDOFF MG.(2002). Obesity by choice: the powerful influence of nutrient availability on nutrient intake. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.*,282(5),1536-1539.

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. *Nutrition Research Reviews*, 18, 98–112.

TUCK K.L., FREEMAN M.P., HAYBALL P.J., STRETCH G.L. and STUPANS I. (2001). The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *Journal of Nutrition*, 131,1993-1996.

TUCK K. L. and HAYBALL P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry*,13,636–644.

-U-

UCHIYAMA S., TANIGUCHI Y., SAK A., YOSHIDA A. and YAJIMA H. (2011). Prevention of diet induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo.*Nutrition*, 27,287-292.

-V-

VAN GAAL L.F., MERTENS I.L. and DE BLOCK C.E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*,444, 875–80.

VAZEQUEZ R.A., MAESTRO D.R. and GRACIANI C.E. (1974). Compentes fenolicos de la aceituna. II. Poliphenoles del alpechin. *Grasas y Aceites*, 25, 341-345.

VERGES B.(2007). Physiopathologie de la dyslipidémie du syndrome métabolique et du diabète de type 2. *Nutrition clinique et métabolisme* , 21, 9–16.

VISIOI F., ROMANI A., MULINACCI N., ZARINI S., CONTE D., VINCIERI F. F. and GALLI C. (1999). Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *J. Agric. Food Chem.*, 47,3397–3401.

VISIOLI F., GALLI C., BORNET F., MATTEI A., PATELLI R., GALLI G., and CARUSO D. (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *Febs Letters*, 468, 159–160

VISIOLI F., VINCERI F. F. and GALLI C. (1995). Wastewaters from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia*, 51, 32-34.

VON CLAUS A. (1957). *ACTA HAEMATOLOGICA*, 17, 237-246.

-W-

WAGNER H., BLADT S. and ZGAINSKI E.M. (1974). Plant Drug Analysis (Translated by A.Scott), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp. 86-87.

WAGNER C.L., MASCELLI M. A., NEBLOCK D.S., WEISMAN H.F. COLLER B.S. and JORDAN R.E. (1996). Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelet. *blood*, 88, 907-914.

WANG Y., ANDREWS M., YANG Y., LANG S., JIN J.W., CAMERON-VENDRIG A., ZHU G., REHEMAN A. and NI H. (2012). Platelets in thrombosis and hemostasis: old topic with new mechanisms. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets*, 12, 126-132.

WOLLNY T., AIELLO L., DI TOMMASO D., BELLAVIA V., ROTILIO D. DONATI M.B., DE GAETANO G. and IACOVIELLO L. (1999). Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *British Journal of pharmacology*, 127, 747 - 755

WORMSER D., KAPTOGE S. and DI ANGELANTONIO E. (2011). The Emerging Risk Factors Collaboration Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet*, 377, 1085–1095.

-Y-

YOUSUF O. AND BHATT D.L. (2011). The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.*,8, 547-559.

YUAN W., LEISNER T.M., MCFADDEN A.W., WANG Z., LARSON M.K., CLARK S., BOUDIGNON-PROUDHON C., LAM S.C. and PARISE L.V. (2006). CIB1 is an endogenous inhibitor of agonist-induced integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ activation. *J. Cell. Biol.*, 172, 169-175.

-Z-

ZBAKH H. and EL ABBASSI A. (2012). Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages : A review. *journal of functional food*, 4, 53-65.

ZHANG X., CAO J. and ZHONG L.(2009). Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines iNOS and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 379(6), 581-586.

ZIOGAS V., TANOU G.,MOLASSIOTIS A., DIAMANTIDIS G. and VASILAKAKIS M. (2010). Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry*, 120 (4), 1097-1103.

ZORIC N., HORVAT I., KOPJAR N., VUCEMILOVIC A., KREMER D., TOMIC S. and KOSALEC I. (2013). Hydroxytyrosol expresses antifungal activity in vitro. *Current Drug Targets*, 14(9), 992-998.

ANNEXE 1

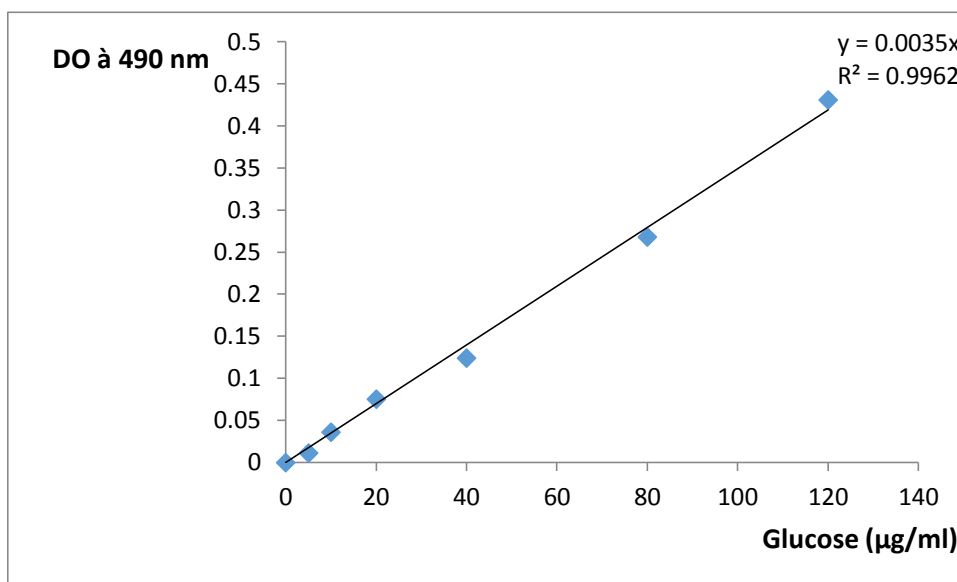


Figure 1. La courbe d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux

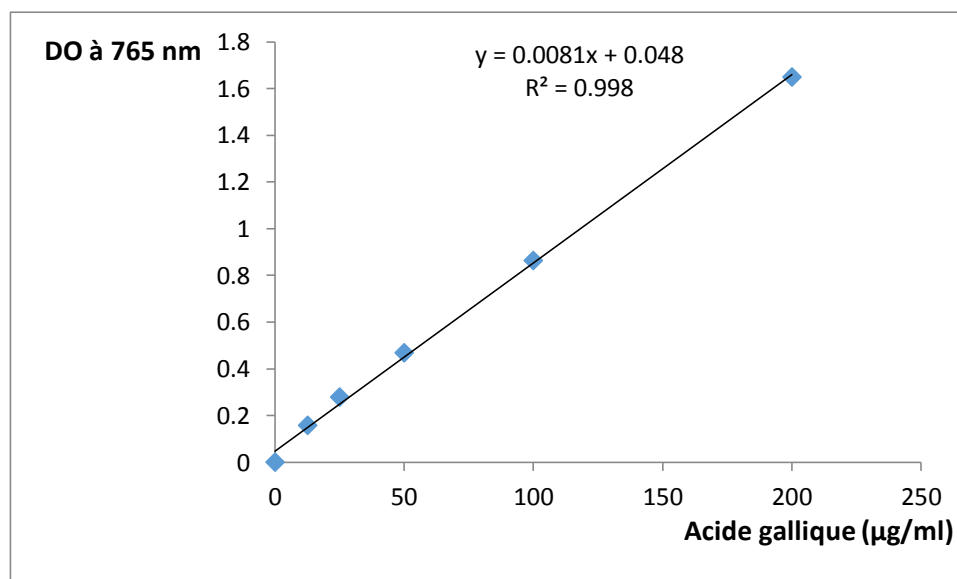


Figure 2. La courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

	Jour 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Moyenne $\pm$ S.E.M
Rat 1 (ml d'eau)	28,33	33,33	26,66	—	41,66	—	40	50	—	—	—	36,66 $\pm$ 8, 88
Rat 2	43,33	35	33,33	46,66	36,66	43,33	—	—	—	—	—	39,71 $\pm$ 5,41
Rat 3	25	26,66	20	—	23,33	25	26,66	28,33	26,66	25	31,66	25,83 $\pm$ 3,06
Rat4	28,33	26,66	23,33	—	25	26,66	26,66	30	28,33	23,33	28,33	26,66 $\pm$ 2,22
Rat5	36,66	33,33	28,33	26,66	28,33	26,66	30	28,33	35	26,66	31,66	30,14 $\pm$ 3,53
Rat6	51,66	40	38,33	36,66	36,66	—	—	—	—	—	—	40,66 $\pm$ 6, 30

ANNEXE 3

Le régime cafeteria :

Le régime cafétéria est composé de produits à fabrication locale

La composition des cacahuètes (<http://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/nutrition-aliments/cacahuete/composition>)

	Chips (100 g)	Biscuits (100 g)	Fromage (100 g)	Cacahuètes (100 g)	Pâté au fromage (100 g)	Chocolat au lait (100 g)	Le régime cafeteria (100 g)
Lipides	30 g	11,14 g	17,5 g	49,5 g	7,34 g	30,61 g	24,34 g
Acides gras saturés	2,5 g	13 g	-	6,87 g	-	-	-
Hydrates de carbone	40 g	77,86 g	-	10,9 g	-	60,95 g	-
sucres totaux	1 g	6,5 g	12 g	4 g	14,70 g	45 g	13,86 g
Protéines	2 g	7,0 g	8 g	25,2 g	13,62 g	5,28 g	10,18
Valeur énergétique	500 Kcal	440 Kcal	238 Kcal	590 Kcal	179,34 Kcal	5422 Kcal	15,22Kcal
	2090 KJ	1839 KJ	994 KJ	2466 KJ	749 KJ	22664 KJ	1317,61 KJ

Glucide : 4 kcal ou 17 kJ /gramme ; protéine : 4 kcal ou 17 kJ/gramme ; lipide 9 kcal ou 38 kJ/gramme. Les valeurs ci-dessus sont mentionnées sur les produits alimentaires (selon les procédés industriels).

ANNEXE 4

Dosages des paramètres sanguins : Les dosages sanguins (glycémie, bilan lipidique, transaminases, bilirubine, créatinine, acide urique, urée, protéines totales, calcium) sont réalisés au niveau du Laboratoire d'Analyses Médicale : Zerrar Amar, Tizi ouzou. La référence de l'automate utilisé est : Abbot Architect Ci 4100.

1- Dosage de glucose

Principe de la méthode (méthodologie : hexokinase/G-6-PDH)

Le glucose est phosphorylé par l'hexokinase (HK) en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et d'ions de magnésium, produisant ainsi du glucose-6-phosphate (G-6-P) et de l'adénosine diphosphate. La glucose – 6- phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) oxyde en particulier le G-6-P en 6-phosphogluconate avec réduction simultanée du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH). Une micromole de NADH est produite pour chaque micromole de glucose consommée. Le NADH produit absorbe la lumière à 340 nm et cette augmentation de l'absorbance peut être détectée par spectrophotométrie.

2- Dosage de cholestérol total

Principes biologiques de la méthode (méthodologie : enzymatique)

Les esters de cholestérol sont hydrolysés par la cholestérol estérase qui les décompose en cholestérol et en acides gras libres. Le cholestérol libre, y compris celui initialement présent, est ensuite oxydé par la cholestérol oxydase pour former du cholestène-4-one-3 et du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène se combine avec de l'acide hydroxybenzoïque (HBA) et de la 4-aminoantipyrine pour former un chromophore (quinoneimine) quantifié à 500 nm.

3- Dosage des Triglycérides

Principes biologiques de la méthode (méthodologie : glycérol phosphate oxydase)

Les triglycérides sont hydrolysés enzymatiquement par la lipase afin de libérer les acides gras et le glycérol. Le glycérol est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) et la glycérol kinase (GK) pour produire du glycérol-3-phosphate et de l'adénosine diphosphate (ADP). Le glycérol-3-phosphate est oxydé en dihydroxyacétone phosphate (DAP) par la glycérol phosphate oxydase (GPO) en produisant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Lors d'une réaction colorée catalysée par la peroxydase, le H₂O₂ réagit avec la 4-aminoantipyrine (4-AAP) et le 4-

chlorophénol (4-CP) pour produire un colorant rouge. L'absorbance de ce colorant est proportionnelle à la concentration en triglycérides dans l'échantillon.

4- Dosage des HDL-Cholestérol (méthodologie : détergent sélectif et accélérateur)

Principes Biologiques de la méthode

Le dosage des HDL est une méthode homogène pour la mesure directe des concentrations en cholestérol HDL dans le sérum ou le plasma ne nécessitant pas d'étapes de prétraitement à l'extérieur de l'analyseur ou de centrifugation. Cette méthode utilise deux réactifs et dépend des propriétés d'un détergent unique. Elle repose sur l'accélération de la réaction du cholestérol oxydase (CO) avec le cholestérol non-HDL non estérifié et la dissolution sélective du cholestérol HDL à l'aide d'un détergent spécifique. Au contact du premier réactif, le cholestérol non-HDL non estérifié est soumis à une réaction enzymatique et le peroxyde généré est dégradé par la peroxydase au cours d'une réaction incolore utilisant du DSBmT (Disodium de N,N-bis-(4-sulfobutyl)-m-toluidine). Le second réactif est constitué d'un détergent (capable de solubiliser le cholestérol HDL), de cholestérol estérase et d'un coupleur chromogène permettant la détermination quantitative du cholestérol HDL par le biais de la coloration résultant de la réaction.

5- Dosage de la créatinine sanguine (méthodologie : méthode cinétique au picrate alcalin)

En milieu alcalin, la créatinine présente dans l'échantillon réagit avec le picrate de sodium, formant ainsi un complexe créatinine-picrate. L'augmentation de l'absorbance à 500 nm due à la formation de ce complexe est directement proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon.

6- Dosage de la bilirubine totale (méthodologie : sel de diazonium)

La bilirubine totale (fractions conjuguée et non conjuguée) se lie avec le réactif diazoïque en présence d'un surfactant pour former de l'azobilirubine. La diazoreaction est accélérée par l'addition de surfactant comme agent de solubilisation. L'augmentation de la densité optique à 548 nm causée par l'azobilirubine est directement proportionnelle à la concentration en bilirubine totale.

7- Dosage de l'acide urique (méthodologie : uricase)

Le dosage de l'acide urique est une réaction composée de deux parties. L'acide urique est oxydé en allantoïne par l'uricase avec production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le H₂O₂ réagit

avec la 4-aminoantipyrine (4-AAP) et la N- (3-sulfopropyl) -3-méthoxy-5-méthylaniline (HMMPS) en présence de peroxydase (POD) pour donner un colorant quinoneimine. La variation d'absorbance résultante à 604 nm est proportionnelle à la concentration en acide urique dans l'échantillon.

uricase

Uric acid + O₂ + 2H₂O → allantoïne + CO₂ + H₂O₂

POD

H₂O₂ + 4-AAP + HMMPS → quinoneimine colorant

8- Dosage de l'urée (méthodologie : Urease)

Le dosage de l'urée est une modification d'une procédure totalement enzymatique. Le test est effectué sous la forme d'un dosage cinétique dans lequel la vitesse initiale de la réaction est linéaire pour une période de temps limitée. L'urée de l'échantillon est hydrolysée par l'uréase en ammoniac et en dioxyde de carbone. La deuxième réaction, catalysée par la glutamate déshydrogénase (GLD), convertit l'ammoniac et l' α -cétooglutarate en glutamate et en eau avec l'oxydation simultanée du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) réduit en nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Deux moles de NADH sont oxydées pour chaque mole d'urée présente. Le taux initial de diminution de l'absorbance à 340 nm est proportionnel à la concentration en urée dans l'échantillon.

9- Dosage des protéines totales (méthodologie : Biuret)

Les polypeptides contenant au moins deux liaisons peptidiques réagissent avec le réactif biuret. En solution alcaline, l'ion cuprique forme un complexe de coordination avec l'azote protéique avec très peu de différence entre l'albumine et la globuline sur la base de l'azote protéique.

10- Dosage des transaminases

Dosage de l'aspartate aminotransferase ASAT (SGOT) (méthodologie : NADH sans P-5'-P): L'AST présent dans l'échantillon catalyse le transfert du groupe amino du L-aspartate à l' α -cétooglutarate en formant un oxaloacétate et du L-glutamate. L'oxaloacétate en présence de NADH et de malate déshydrogénase (MDH) est réduit en L-malate. Dans cette réaction, le NADH est oxydé en NAD. La réaction est contrôlée en mesurant la vitesse de diminution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation du NADH en NAD.

Dosage de l'alanine aminotransferase ALAT (SGPT) (méthodologie : NADH sans P-5'-P)

L'ALT présente dans l'échantillon catalyse le transfert du groupe amino de la L-alanine à l' α -cétooglutarate en formant du pyruvate et du L-glutamate. Le pyruvate en présence de NADH et de lactate déshydrogénase (LD) est réduit en L-lactate. Dans cette réaction, le NADH est oxydé en NAD. La réaction est contrôlée en mesurant la vitesse de diminution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation du NADH en NAD.

11- Dosage du Calcium (méthodologie)

Le colorant Arsenazo III réagit avec le calcium dans une solution acide pour former un complexe bleu-violet. La couleur développée est mesurée à 660 nm et est proportionnelle à la concentration en calcium dans la méthodologie de l'échantillon : Arsenazo III.

ANNEXE 5

La technique d'activation plaquettaire via l'épinephrine. Fiche technique de BIO/DATA CORPORATION (Fabricant et distributeur des produits à fonctions plaquettaires pour les laboratoires de thrombose, d'hémostase et de recherche).

Épinéphrine

DESCRIPTION DU PRODUIT

L'épinéphrine est une préparation lyophilisée d'adrénaline. La concentration active du réactif reconstitué est de 1×10^{-3} M.

USAGE PRÉVU

L'épinéphrine est utilisée dans les études d'agrégation plaquettaire de routine pour l'évaluation de dysfonctionnement ou d'activation plaquettaire.

PRINCIPE DU TEST

Ajoutée au plasma riche en plaquettes, l'épinéphrine stimule l'agrégation des plaquettes. L'agrégation induite par l'épinéphrine est connue sous le nom d'agrégation primaire. Les plaquettes normales répondront en outre en libérant de l'ADP endogène de leurs granules. La libération d'ADP endogène résulte en une vague d'agrégation secondaire.^{8,10,11}

PRÉCAUTIONS

L'épinéphrine est destinée au DIAGNOSTIC *IN VITRO* UNIQUEMENT ET NE DOIT ÊTRE NI INJECTÉE OU NI INGÉRÉE.

MATÉRIEL FOURNI

Épinéphrine 3 x 0,5 ml. Conserver entre 2 ° à 8 °C avant reconstitution.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

1. Agrégomètre de plaquettes
2. Eau purifiée (distillée, désionisée ou de qualité réactif), pH 5,3 – 7,2
3. Pipettes (contenances de 0,5 ml, 0,45 ml, 0,05 ml)
4. Agitateurs jetables
5. Cuvettes pour agrégomètre

INSTRUMENTATION

L'épinéphrine fonctionnera comme décrit lorsque utilisée avec la plupart des agrégomètres optiques de plaquettes.¹ Suivre les consignes du fabricant pour faire fonctionner l'agrégomètre utilisé.

PRÉLÈVEMENT DES SPÉCIMENS ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS À TESTER

Consulter la directive H21 A2 approuvée par NCCLS en vigueur pour prendre connaissance des instructions détaillées.⁶

1. PRÉPARATION DU PATIENT:

Sept à 10 jours avant le prélèvement du spécimen, les patients doivent s'abstenir de prendre de l'aspirine ou des médicaments qui contiennent de l'aspirine ou tout autre médicament et supplément diététique connu pour modifier la fonction plaquettaire. Les patients doivent jeûner et éviter les nourritures grasses et les produits laitiers pendant 12 heures précédant le prélèvement du spécimen.⁶

2. PRÉLÈVEMENT DU SPÉCIMEN:

Le prélèvement sanguin doit être effectué avec soin pour éviter la stase, l'hémolyse, la contamination par des liquides tissulaires ou l'exposition au verre. Garder les spécimens à température ambiante.⁸

Chacun des facteurs suivants peut entraîner des résultats inexacts d'analyse, et les échantillons affectés doivent être rejetés : présence d'hémolyse, de contamination par des globules rouges, de lipémie, de chyle, d'ictère, de caillots de thrombocytopénie ($< 75,000 /\text{mm}^3$) dans le spécimen et de l'hypofibrinogénémie. La réutilisation d'articles jetables peut entraîner l'inexactitude des résultats d'analyse.

Suivre les précautions d'usage pendant le prélèvement des échantillons, la préparation de l'étalon et le processus d'analyse.^{2,3} Jeter les objets contondants et les déchets biologiques conformément au règlement du laboratoire.

Technique à la seringue (recommandée)⁸

- a. Utiliser une aiguille papillon pour la ponction veineuse.
- b. Prélever 9,0 ml de sang dans une seringue en plastique. Éviter une succion excessive.
- c. Retirer l'aiguille de la seringue et transvaser immédiatement et doucement le sang dans un tube en plastique [polypropylène]⁴ contenant 1,0 ml d'anticoagulant au citrate de sodium 0,11 M. La proportion doit être de 9 parties de sang pour 1 partie d'anticoagulant.⁵
- d. Couvrir et retourner 4 - 5 fois doucement pour mélanger.
- e. Conserver à température ambiante (entre 15 ° et 28 °C).

REMARQUE : lorsque l'hématocrite du patient est $< 30 \%$ ou $> 55 \%$, les volumes de sang par rapport à l'anticoagulant doivent être ajustés.⁴

Technique du tube de prélèvement sous vide

1. Utiliser une aiguille papillon pour la ponction veineuse.
2. Prélever le sang dans des tubes (en plastique) contenant l'anticoagulant au citrate de sodium 0,11 M.
3. Retourner 4 à 5 fois doucement pour mélanger.

REMARQUE : Si on utilise des tubes de prélèvement en plastique sous vide, vérifier sur l'étiquette que l'anticoagulant au citrate est bien à 0,11 M. La couleur des bouchons ne change pas avec les différentes concentrations en citrate. Suivre les consignes du fabricant pour le prélèvement des spécimens.

PRÉPARATION DE PLASMA RICHE (PRP) ET PAUVRE (PPP) EN PLAQUETTES

1. Préparer du plasma riche en plaquettes en centrifugeant du sang anticoagulé à 150 x g pendant 10 minutes à température ambiante (15 ° à 28 °C).
2. Vérifier qu'il n'y a pas de globules rouges dans la couche de plasma. Si des globules rouges sont présents, recentrifuger à 150 x g pendant 5 minutes supplémentaires.
3. Au moyen d'une pipette de transfert en plastique, observer et retirer avec soin la couche de plaquettes sans déranger la couche leuco-plaquettaire ou des globules rouges, et transférer dans un récipient étiqueté (PRP). Boucher le récipient et le laisser à température ambiante.
4. Préparer le plasma pauvre en plaquettes en centrifugeant le restant du spécimen de sang à 2500 x g pendant 20 minutes. Vérifier que le plasma pauvre en plaquettes soit dépourvu d'hémolyse, puis transférer dans un tube en plastique étiqueté PPP.
5. La numération plaquettaire du PRP doit être de $250,000 \pm 50,000 /\text{mm}^3$. La numération plaquettaire peut être réduite par l'utilisation de PPP préparé à partir de l'échantillon.

REMARQUE: Si de l'acide arachidonique est utilisé comme agoniste, ne pas ajuster la numération plaquettaire.

RECONSTITUTION

REMARQUE: Les réactifs doivent être amenés à température ambiante (entre 15 ° et 28 °C) avant la reconstitution. Les réactifs conservés doivent être amenés à température ambiante avant d'être utilisés.

Reconstituer un flacon d'épinéphrine avec 0,5 ml d'eau purifiée.

CONSERVATION DES RÉACTIFS

L'épinéphrine reconstituée est stable pendant 30 jours lorsqu'il est conservé entre 2 ° et 8 °C dans son contenant d'origine hermétiquement fermé.

PROCÉDURE DE TEST

Le plasma riche en plaquettes doit être maintenu à température ambiante pendant au moins 30 minutes avant le test.

1. Préparer un contrôle d'agrégomètre en pipétant 0,5 ml de plasma pauvre en plaquettes dans une cuvette.
2. Pipeter 0,45 ml de plasma riche en plaquettes dans une seconde cuvette. Incuber à 37 °C pendant 3 minutes et ajouter un agitateur.
3. Au besoin, régler les références de 0 % et 100 % selon les instructions du fabricant pour l'agrégomètre utilisé.
4. Ajouter 0,05 ml d'épinéphrine directement dans le plasma riche en plaquettes. Ne pas laisser le réactif couler le long de la paroi de la cuvette. La concentration finale en épinéphrine dans le plasma riche en plaquettes est de 1×10^{-3} M.
5. Laisser l'agrégation se former pendant 5 minutes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les laboratoires doivent suivre les pratiques du contrôle de qualité généralement acceptées lorsqu'une épreuve de compétence n'est pas disponible.

Pour assurer un fonctionnement adéquat de l'instrument et la bonne performance des réactifs, un échantillon témoin doit être évalué chaque jour où les analyses sont effectuées. L'échantillon témoin doit être préparé de la même manière que l'échantillon d'analyse. Pour effectuer des études sur l'agrégation des plaquettes, l'échantillon témoin doit être composé de plasma frais riche en plaquettes et prélevé sur un donneur normal (spécifié et qualifié) qui n'a pas ingéré de composés contenant de l'aspirine au cours des 10 jours précédant l'analyse et dont la fonction plaquettaire a toujours été normale.

RÉSULTATS

Les modèles d'agrégation typiques à l'épinéphrine sont illustrés en Figures 1 et 2. L'épinéphrine induira deux vagues distinctes d'agrégation dans le plasma normal riche en plaquettes.^{8,10,11}

VALEURS ATTENDUES

Les intervalles de valeurs attendues pour chaque réactif aux concentrations utilisées pour produire une agrégation plaquettaire doivent être établis par chaque laboratoire, voir le tableau 1.^{4,8,9,10}

Tableau 1
RÉPONSES TYPIQUES D'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE POUR DES DONNEURS NORMAUX à 250,000 PLAQUETTES /mm³
[agrégation totale à 5 minutes]

	ADP	Acide arachidonique	Collagène [Type I]	Épinéphrine
Concentration finale	$2,0 \times 10^{-5}$ M	500 µg/mL	0,19 mg/mL	$1,0 \times 10^{-4}$ M
Phase de latence [sec]	<10	<=20	<60	0
Pente primaire	38-67	>20	35-67	7-34
Agrégation totale (% @ 5min)	63-89	65-90	61-99	54-101
Agrégation biphasique	Dépendent de la concentration	NON	NON	OUI
Autre	Peut montrer un changement de forme	Tous les donneurs normaux peuvent ne pas être conformes à PLT CT~175k-300k	Ne pas diluer	Tous les donneurs normaux peuvent ne pas être conformes

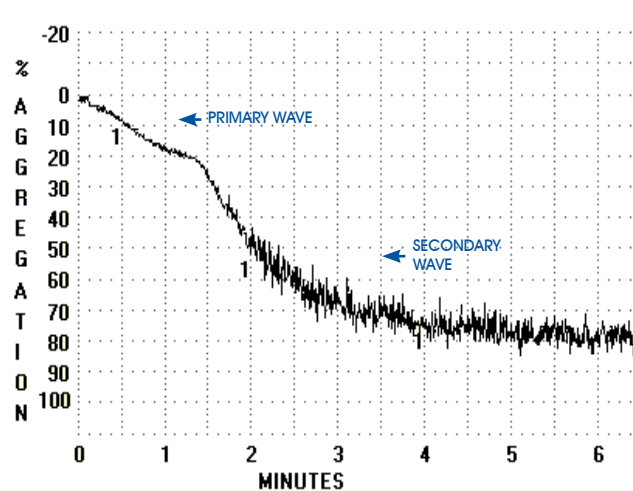


Fig. 1 Normal Aggregation

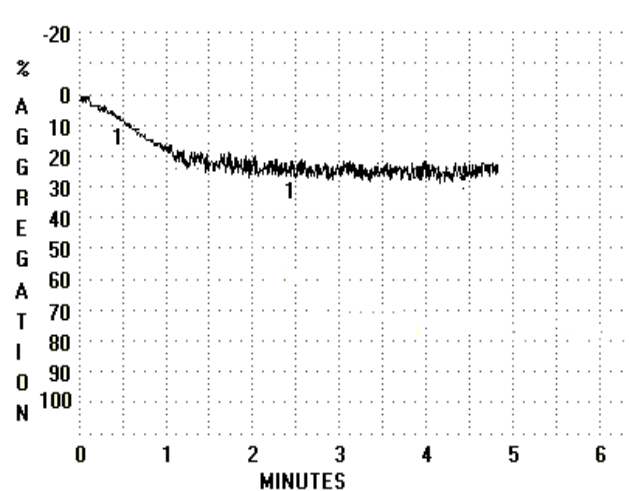


Fig. 2 Abnormal Aggregation

LÉGENDE: Résultats d'agrégation de plaquettes induite par épinéphrine pour plasma normal et anormal.

La concentration finale en épinéphrine dans le PRP est de 1×10^{-4} M.
La marque en pointe indique l'ajout de réactif.

LIMITES DU TEST³

De faux résultats seront observés si le nombre de plaquettes du plasma riche en plaquettes est inférieur à 75,000 plaquettes / μ l.

Le plasma riche en plaquettes qui n'a pas été maintenu au moins 30 minutes à température ambiante avant le test peut occasionner des résultats anormaux.

Plusieurs rapports indiquent que le plasma riche en plaquettes de 20-50% de la population normale ne donnera qu'une vague primaire d'agrégation en réponse à l'épinéphrine.

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Des études ont montré que ce produit fonctionnera comme décrit avant sa date de péremption si les instructions de procédure et de conservation sont respectées.

Linéarité:

L'agrégation plaquettaire provoquée par des agonistes communs (ADP, acide arachidonique, collagène et épinéphrine) est un système d'analyse non linéaire pour les paramètres suivants: phase de latence, pente primaire, pente secondaire, réponse biphasique et désagrégation. La non linéarité est due à plusieurs facteurs tels que la chimie de la réaction et l'instrumentation. L'agrégation plaquettaire mesure un taux de réponse ou une activité qui ne constitue pas une mesure quantitative des éléments réagissant ou de leur concentration.

EXACTITUDE, PRÉCISION ET REPRODUCTIBILITÉ

Exactitude

Dans l'agrégation plaquettaire, l'exactitude est un paramètre relatif qui dépend du système d'analyse.

Précision et reproductibilité

Les limites que présente d'agrégation plaquettaire font qu'il est difficile de fournir une précision typique ou des intervalles de reproductibilité. Toutefois, on applique à ces paramètres un consensus fondé sur l'expérience (voir ci-dessous). Chaque laboratoire doit établir ses propres limites quant à l'acceptabilité des dosages.

Reproductibilité d'une analyse à une autre :	mieux que $\pm 7,5$ %
Reproductibilité d'un instrument à un autre :	mieux que ± 15 %
Variation du réactif d'un lot à un autre :	mieux que $\pm 10,5$ %
D'un laboratoire à un autre (système d'analyse identique) :	mieux que $\pm 12,5$ %

RÉFÉRENCES

1. Born, GVR and Cross, MJ. The Aggregation of Blood Platelets. J. Physiol [London] 168:178, 1963.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Isolation Precautions in Hospitals. Centers for Disease Control and Prevention. 1996; Vol 17; 1:53 - 80.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS: Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline. NCCLS document M29. Wayne, PA.
4. McCabe-White, M and Jennings, LK. Platelet protocols: Research and Clinical Laboratory Procedure. Academic Press. London. 1999, p 35.
5. Newhouse, P and Clark, C. The Variability of Platelet Aggregation., in Triplett, DA, ed. Platelet Function: Laboratory Evaluation and Clinical Application. ASCP. Chicago. 1978. p 69.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS Collection, Transport and Processing of Blood Specimens Approved Guideline- Second Edition. NCCLS Document H 18-A2. Wayne, PA.

7. Weiss HJ: Aspirin and platelets in drugs and hematologic reactions. Dimittov and Nodine (eds.). Grune and Stratton, New York, 1974.
8. Triplett DA, Harms CS, Newhouse P, Clark C: Platelet Function. Laboratory Evaluation and Clinical Application. ASCP, 1978.
9. Day HJ, Holmsen H: Laboratory tests of platelet function. Ann Clin Lab Sci, 2:63, 1972.
10. Owen CA, Bowie EJW, Thompson JH: The diagnosis of bleeding disorder. Little, Brown and Co., 1975.
11. Williams WJ, Beutler, E. Erslev AJ, Rundles RW: Hematology. McGraw-Hill, 1977.

DISPONIBILITÉ DES PRODUITS

PRODUIT	CONTENU NET	NUMÉRO CATALOGUE
Épinéphrine	3 x 0,5 ml	101311
ADP	3 x 0,5 ml	101312
Acide arachidonique	3 x 0,5 ml	101297
BETA/Pak®		
(ADP, collagène, ristocétine)	1 x 0,5 ml chacun	101580
Collagène	3 x 0,5 ml	101562
Plaquettes lyophilisées	3 x 4 ml	101595
Plaquettes lyophilisées	1 x 10 ml	101258
PAR/Pak® II		
(ADP, collagène, épinéphrine)	2 x 0,5 ml chacun	101310
Ristocétine		
AggRecetin® 1,5 mg/ml	15 mg	100968
AggRecetin 1,0-1,5 mg/ml	15 mg	100970
AggRecetin Brut	100 mg	101241
vW Factor Assay®	10 déterminations	101246
vW Factor Assay	20 déterminations	103025
Plasma témoin anormal pour vW	3 x 0,5 ml	101270
Plasma de référence normal pour vW	3 x 0,5 ml	101269
Plasma témoin normal pour vW	3 x 0,5 ml	106426

CE PRODUIT EST GARANTI POUR FONCTIONNER SELON LES TERMES ÉNONCÉS SUR L'ÉTIQUETAGE ET LA DOCUMENTATION DE BIO/DATA CORPORATION ET BIO/DATA CORPORATION RENIE TOUTE GARANTIE DE QUALITÉ MARCHANDE IMPLICITE OU D'ADAPTATION À TOUT AUTRE FIN ; ET EN AUCUN CAS BIO/DATA NE SERA RESPONSABLE DE TOUT DOMMAGE CONSÉCUTIF SURVENANT EN DEHORS DE LA GARANTIE EXPRESSE SUSMENTIONNÉE.



155 Gibraltar Road, PO Box 347, Horsham, PA 19044-0347 États-Unis
(800) 257-3282 États-Unis (215) 441-4000 International
Télécopie : (215) 443-8820 International
Courriel : bdc@biodatacorp.com
Internet : www.biodatacorp.com



EMERGO EUROPE, Molenstraat 15, 2513 BH, La Hague, Pays-Bas



ANNEXE 6

Analyse statistique

Partie expérimentale I

Tableau I : Effet des margines sur le poids corporel

	RN (N= 6)	RNM (N= 9)	RCT (N= 6)	RCM (N=9)
Poids initial (g)	239,2 ± 12,35	236,4±10,64	243,25±6,94	236,33± 12,92
1 semaine	252,8 ± 15,31	247,6 ±21,74	267,25±11,44	255,5± 13,17
2 ^{ième} semaine	262± 12,98	260,6 ±16,72	280±17,22	267,66± 13,80
3 ^{ième} semaine	274± 14,98	271,2± 12,37	294±16,75	283,83±11,85
4 ^{ième} semaine	285,2 ± 15,44	276,8± 11,12	308,25±18,71	299,66± 13,77
5 ^{ième} semaine	293 ± 17,30	280,8 ±14,34	323,5±21,04	312,66± 13,83
6 ^{ième} semaine	296,2± 24,84	288 ±11,76	338,5±24,83	323,5±17,85
7 ^{ième} semaine	304,6± 19,17	295,2 ±10,70	352,75±25,68	335,5 ± 18,94
8 ^{ième} semaine	318,4 ± 23,10	304 ±10,31	365,75±25,40	347,5± 18,45
9 ^{ième} semaine	324± 25,36	310,6±09,63	376,25±26,65	355± 19,66
10 ^{ième} semaine	330,4 ± 25,06	315,8±10,47	386,25±28,12	365,66±19,86
11 ^{ième} semaine	338,2 ± 27,25	322,2±14,70	392,5±32,06	377±19,015
12 ^{ième} semaine	343,4± 28,59	332,6±14,69	402±34,44	389,33± 16,09
13 ^{ième} semaine	343± 30,76	330,2±16,84	408,75±36,04	394,5± 14,46

Poids corporel (la dernière semaine)

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle

Toutes les moyennes sont égales

Annexes

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	24723	8241,1	12,20	0,000
Erreur	21	14187	675,5		
Total	24	38910			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
25,9913	63,54%	58,33%	46,75%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	343,0	30,8	(318,8; 367,2)
RNM	7	342,57	25,29	(322,14; 363,00)
RCT	5	410,2	31,4	(386,0; 434,4)
RCM	8	402,50	19,35	(383,39; 421,61)

Ecart type regroupé = 25,9913

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCT	5	410,2	A
RCM	8	402,50	A
RN	5	343,0	B

Annexes

RNM 7 342,57 B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-0,4	15,2	(-42,8; 42,0)	-0,03	1,000
RCT - RN	67,2	16,4	(21,4; 113,0)	4,09	0,003
RCM - RN	59,5	14,8	(18,2; 100,8)	4,02	0,003
RCT - RNM	67,6	15,2	(25,2; 110,0)	4,44	0,001
RCM - RNM	59,9	13,5	(22,5; 97,4)	4,46	0,001
RCM - RCT	-7,7	14,8	(-49,0; 33,6)	-0,52	0,953

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

Cholestérol total

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 4

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	0,2269	0,07562	6,83	0,003

Annexes

Erreur 17 0,1883 0,01107

Total 20 0,4151

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,105232	54,65%	46,65%	29,98%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	1,0960	0,1518	(0,9967; 1,1953)
RNM	6	0,8833	0,0755	(0,7927; 0,9740)
RCT	5	1,0640	0,1144	(0,9647; 1,1633)
RCM	5	0,8620	0,0618	(0,7627; 0,9613)

Ecart type regroupé = 0,105232

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement	
RN	5	1,0960	A	
RCT	5	1,0640	A	B
RNM	6	0,8833	B	C
RCM	5	0,8620		C

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-0,2127	0,0637	(-0,3938; -0,0315)	-3,34	0,019
RCT - RN	-0,0320	0,0666	(-0,2212; 0,1572)	-0,48	0,962
RCM - RN	-0,2340	0,0666	(-0,4232; -0,0448)	-3,52	0,013
RCT - RNM	0,1807	0,0637	(-0,0005; 0,3618)	2,84	0,051

Annexes

RCM - RNM	-0,0213	0,0637	(-0,2025; 0,1598)	-0,33	0,987
RCM - RCT	-0,2020	0,0666	(-0,3912; -0,0128)	-3,04	0,034

Niveau de confiance individuel = 98,88 %

Triglycérides

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les moyennes sont égales
Hypothèse alternative	Toutes les moyenne ne sont pas égales
Seuil de signification	$\alpha = 0,05$
Lignes non utilisées	1

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	5,6213	1,87375	48,23	0,000
Erreur	20	0,7769	0,03885		
Total	23	6,3982			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,197097	87,86%	86,04%	82,92%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	0,8000	0,1880	(0,6161; 0,9839)
RNM	7	0,8457	0,2026	(0,6903; 1,0011)

Annexes

RCT 5 2,0500 0,0914 (1,8661; 2,2339)

RCM 7 1,4457 0,2435 (1,2903; 1,6011)

Ecart type regroupé = 0,197097

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCT	5	2,0500	A
RCM	7	1,4457	B
RNM	7	0,8457	C
RN	5	0,8000	C

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	0,046	0,115	(-0,277; 0,369)	0,40	0,978
RCT - RN	1,250	0,125	(0,901; 1,599)	10,03	0,000
RCM - RN	0,646	0,115	(0,323; 0,969)	5,60	0,000
RCT - RNM	1,204	0,115	(0,881; 1,527)	10,44	0,000
RCM - RNM	0,600	0,105	(0,305; 0,895)	5,70	0,000
RCM - RCT	-0,604	0,115	(-0,927; -0,281)	-5,24	0,000

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

HDL cholestérol

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyennes ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 2

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	0,01698	0,005659	5,19	0,008
Erreur	20	0,02182	0,001091		
Total	23	0,03880			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0330296	43,76%	35,32%	18,57%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	0,2800	0,0274	(0,2492; 0,3108)
RNM	7	0,26143	0,02035	(0,23539; 0,28747)
RCT	6	0,2733	0,0450	(0,2452; 0,3015)
RCM	6	0,3300	0,0352	(0,3019; 0,3581)

Ecart type regroupé = 0,0330296

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCM	6	0,3300	A
RN	5	0,2800	A B
RCT	6	0,2733	B
RNM	7	0,26143	B

Annexes

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-0,0186	0,0193	(-0,0727; 0,0356)	-0,96	0,773
RCT - RN	-0,0067	0,0200	(-0,0627; 0,0493)	-0,33	0,987
RCM - RN	0,0500	0,0200	(-0,0060; 0,1060)	2,50	0,091
RCT - RNM	0,0119	0,0184	(-0,0396; 0,0634)	0,65	0,915
RCM - RNM	0,0686	0,0184	(0,0171; 0,1200)	3,73	0,007
RCM - RCT	0,0567	0,0191	(0,0033; 0,1101)	2,97	0,035

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

Glycémie

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les moyennes sont égales
Hypothèse alternative	Toutes les moyenne ne sont pas égales
Seuil de signification	$\alpha = 0,05$
Lignes non utilisées	2

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	0,6484	0,216147	25,76	0,000
Erreur	17	0,1427	0,008391		

Annexes

Total 20 0,7911

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0916044	81,97%	78,79%	72,19%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	0,7600	0,0490	(0,6736; 0,8464)
RNM	5	0,6100	0,0604	(0,5236; 0,6964)
RCT	5	1,1060	0,1540	(1,0196; 1,1924)
RCM	6	0,8433	0,0686	(0,7644; 0,9222)

Ecart type regroupé = 0,0916044

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCT	5	1,1060	A
RCM	6	0,8433	B
RN	5	0,7600	B C
RNM	5	0,6100	C

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-0,1500	0,0579	(-0,3147; 0,0147)	-2,59	0,081
RCT - RN	0,3460	0,0579	(0,1813; 0,5107)	5,97	0,000
RCM - RN	0,0833	0,0555	(-0,0743; 0,2410)	1,50	0,458
RCT - RNM	0,4960	0,0579	(0,3313; 0,6607)	8,56	0,000
RCM - RNM	0,2333	0,0555	(0,0757; 0,3910)	4,21	0,003

Annexes

RCM - RCT	-0,2627	0,0555	(-0,4203; -0,1050)	-4,74	0,001
-----------	---------	--------	--------------------	-------	-------

Niveau de confiance individuel = 98,88 %

Urée

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 2

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
---------	---------	---------

Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM
---------	---	-------------------

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	0,02709	0,009029	2,74	0,073
Erreur	18	0,05926	0,003292		
Total	21	0,08635			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0573793	31,37%	19,93%	0,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	0,5660	0,0709	(0,5121; 0,6199)
RNM	7	0,5029	0,0419	(0,4573; 0,5484)
RCT	5	0,4780	0,0782	(0,4241; 0,5319)
RCM	5	0,4740	0,0321	(0,4201; 0,5279)

Annexes

Ecart type regroupé = 0,0573793

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RN	5	0,5660	A
RNM	7	0,5029	A
RCT	5	0,4780	A
RCM	5	0,4740	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-0,0631	0,0336	(-0,1582; 0,0319)	-1,88	0,271
RCT - RN	-0,0880	0,0363	(-0,1906; 0,0146)	-2,42	0,108
RCM - RN	-0,0920	0,0363	(-0,1946; 0,0106)	-2,54	0,088
RCT - RNM	-0,0249	0,0336	(-0,1199; 0,0702)	-0,74	0,880
RCM - RNM	-0,0289	0,0336	(-0,1239; 0,0662)	-0,86	0,826
RCM - RCT	-0,0040	0,0363	(-0,1066; 0,0986)	-0,11	1,000

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

Créatinine

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyennes ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Annexes

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	5,231	1,744	1,72	0,194
Erreur	21	21,329	1,016		
Total	24	26,560			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
1,00779	19,70%	8,22%	0,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	10,600	0,894	(9,663; 11,537)
RNM	7	9,286	1,380	(8,494; 10,078)
RCT	5	9,600	0,548	(8,663; 10,537)
RCM	8	9,750	0,886	(9,009; 10,491)

Ecart type regroupé = 1,00779

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RN	5	10,600	A
RCM	8	9,750	A
RCT	5	9,600	A
RNM	7	9,286	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Annexes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-1,314	0,590	(-2,958; 0,330)	-2,23	0,148
RCT - RN	-1,000	0,637	(-2,776; 0,776)	-1,57	0,417
RCM - RN	-0,850	0,575	(-2,451; 0,751)	-1,48	0,467
RCT - RNM	0,314	0,590	(-1,330; 1,958)	0,53	0,950
RCM - RNM	0,464	0,522	(-0,989; 1,917)	0,89	0,810
RCM - RCT	0,150	0,575	(-1,451; 1,751)	0,26	0,994

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

Bilirubine totale

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RC T; RCM

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	RN; RNM; RC T; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	0,8564	0,2855	1,13	0,359
Erreur	21	5,3036	0,2526		
Total	24	6,1600			

Récapitulatif du modèle

Annexes

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,502545	13,90%	1,60%	0,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	1,200	0,447	(0,733; 1,667)
RNM	7	1,714	0,488	(1,319; 2,109)
RC T	5	1,400	0,548	(0,933; 1,867)
RCM	8	1,375	0,518	(1,006; 1,744)

Ecart type regroupé = 0,502545

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RNM	7	1,714	A
RC T	5	1,400	A
RCM	8	1,375	A
RN	5	1,200	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	0,514	0,294	(-0,306; 1,334)	1,75	0,325
RC T - RN	0,200	0,318	(-0,685; 1,085)	0,63	0,921
RCM - RN	0,175	0,286	(-0,623; 0,973)	0,61	0,927
RC T - RNM	-0,314	0,294	(-1,134; 0,506)	-1,07	0,712
RCM - RNM	-0,339	0,260	(-1,064; 0,385)	-1,30	0,570
RCM - RC T	-0,025	0,286	(-0,823; 0,773)	-0,09	1,000

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

TGO

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyennes ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	101636	33879	5,31	0,007
Erreur	21	133974	6380		
Total	24	235609			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
79,8730	43,14%	35,01%	20,28%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	432,2	60,9	(357,9; 506,5)
RNM	7	423,6	55,4	(360,8; 486,4)
RCT	5	268,4	88,5	(194,1; 342,7)
RCM	8	332,6	99,6	(273,9; 391,4)

Ecart type regroupé = 79,8730

Comparaisons deux à deux de Tukey

Annexes

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RN	5	432,2	A
RNM	7	423,6	A
RCM	8	332,6	A B
RCT	5	268,4	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-8,6	46,8	(-138,9; 121,7)	-0,18	0,998
RCT - RN	-163,8	50,5	(-304,5; -23,1)	-3,24	0,019
RCM - RN	-99,6	45,5	(-226,4; 27,3)	-2,19	0,160
RCT - RNM	-155,2	46,8	(-285,5; -24,9)	-3,32	0,016
RCM - RNM	-90,9	41,3	(-206,1; 24,2)	-2,20	0,156
RCM - RCT	64,2	45,5	(-62,6; 191,1)	1,41	0,507

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

TGP

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les moyennes sont égales
Hypothèse alternative	Toutes les moyenne ne sont pas égales
Seuil de signification	$\alpha = 0,05$
Lignes non utilisées	2

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
---------	---------	---------

Annexes

Facteur 4 RN; RNM; RCT; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	20694	6898,0	20,36	0,000
Erreur	19	6438	338,8		
Total	22	27132			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
18,4072	76,27%	72,53%	64,09%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	140,4	31,9	(123,2; 157,6)
RNM	5	115,80	13,16	(98,57; 133,03)
RCT	5	64,20	10,47	(46,97; 81,43)
RCM	8	74,13	13,27	(60,50; 87,75)

Ecart type regroupé = 18,4072

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RN	5	140,4	A
RNM	5	115,80	A
RCM	8	74,13	B
RCT	5	64,20	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
---------------------------	----------------------------	------------------------------------	-----------	----------------	------------------------

Annexes

RNM - RN	-24,6	11,6	(-57,4; 8,2)	-2,11	0,185
RCT - RN	-76,2	11,6	(-109,0; -43,4)	-6,55	0,000
RCM - RN	-66,3	10,5	(-95,8; -36,7)	-6,32	0,000
RCT - RNM	-51,6	11,6	(-84,4; -18,8)	-4,43	0,002
RCM - RNM	-41,7	10,5	(-71,2; -12,1)	-3,97	0,004
RCM - RCT	9,9	10,5	(-19,6; 39,5)	0,95	0,781

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

Protéines totales

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	207,7	69,23	0,94	0,437
Erreur	21	1538,5	73,26		
Total	24	1746,2			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
8,55925	11,89%	0,00%	0,00%

Moyennes

Annexes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	97,20	14,20	(89,24; 105,16)
RNM	7	90,00	5,45	(83,27; 96,73)
RCT	5	90,20	6,53	(82,24; 98,16)
RCM	8	89,88	7,40	(83,58; 96,17)

Ecart type regroupé = 8,55925

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RN	5	97,20	A
RCT	5	90,20	A
RNM	7	90,00	A
RCM	8	89,88	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-7,20	5,01	(-21,16; 6,76)	-1,44	0,492
RCT - RN	-7,00	5,41	(-22,08; 8,08)	-1,29	0,577
RCM - RN	-7,33	4,88	(-20,92; 6,27)	-1,50	0,455
RCT - RNM	0,20	5,01	(-13,76; 14,16)	0,04	1,000
RCM - RNM	-0,13	4,43	(-12,47; 12,22)	-0,03	1,000
RCM - RCT	-0,33	4,88	(-13,92; 13,27)	-0,07	1,000

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

Acide urique

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM

Méthode

Annexes

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 1

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
---------	---------	---------

Facteur	4	RN; RNM; RCT; RCM
---------	---	-------------------

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	457,2	152,40	10,65	0,000
Erreur	19	272,0	14,32		
Total	22	729,2			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
3,78368	62,70%	56,81%	49,70%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	29,200	1,095	(25,658; 32,742)
RNM	6	26,67	3,01	(23,43; 29,90)
RCT	4	17,500	1,732	(13,540; 21,460)
RCM	8	20,13	5,51	(17,33; 22,92)

Ecart type regroupé = 3,78368

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RN	5	29,200	A

Annexes

RNM 6 26,67 A

RCM 8 20,13 B

RCT 4 17,500 B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-2,53	2,29	(-8,98; 3,91)	-1,11	0,690
RCT - RN	-11,70	2,54	(-18,84; -4,56)	-4,61	0,001
RCM - RN	-9,07	2,16	(-15,15; -3,00)	-4,21	0,002
RCT - RNM	-9,17	2,44	(-16,04; -2,29)	-3,75	0,007
RCM - RNM	-6,54	2,04	(-12,29; -0,79)	-3,20	0,022
RCM - RCT	2,63	2,32	(-3,90; 9,15)	1,13	0,674

Niveau de confiance individuel = 98,89 %

Partie expérimentale II

Tableau II : Effets des margines et des polyphénols totaux sur le poids corporel

	RN (N=6)	RNM (N= 6)	RCT (N= 6)	RCM (N=6)	RCP (N=6)
Poids initial (g)	208,33±11,65	209,83±17,26	210,5± 14,93	208,20± 03,34	206,5± 15,93
1 ^{ère} semaine	234,5 ± 11,60	242,83±17,47	248± 16,77	248,20± 15,67	233,83±19,94
2 ^{ième} semaine	251± 12,99	264,33±22,60	269,75±19,46	270,2± 20,48	253,83±21,25
3 ^{ième} semaine	262 ± 14,07	272,66±26,74	281,75±21,54	272,4± 19,08	258,66±20,66
4 ^{ième} semaine	284± 15,81	298,5 ± 33,60	309,25±23,12	300,8± 20,65	285,5± 17,07
5 ^{ième} semaine	295,33±18,42	312,33±40,77	326,5±24,36	319,6± 23,56	303,16±19,75
6 ^{ième} semaine	303 ± 18,88	322,83±38,90	341 ± 30,24	337± 26,10	315±20,18

Annexes

7 ^{ième} semaine	306 ± 26,60	336 ± 41,69	354,5±34,54	352,80± 32,56	329,66±23,91
8 ^{ième} semaine	320,66±26,54	348,66±45,78	366,25±38,44	362,20±33,64	339±23,35
9 ^{ième} semaine	328,50±28,33	355,83±47,94	378,75±43,85	378,60± 33,91	352,66±28,23
10 ^{ième} semaine	334,16±28,43	357,33±46,69	388,75±41,58	390,20±34,75	360± 30,11
11 ^{ième} semaine	337,16±30,90	367,16±49,30	394±43,11	403,6±34,80	366± 33,23
12 ^{ième} semaine	343±27,99	374,83±54,14	402,25±41,82	408,6±33,35	371±30,13

Poids corporel (la dernière semaine)

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 3

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	5	RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	14722	3680	2,47	0,075
Erreur	22	32821	1492		
Total	26	47543			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
38,6245	30,97%	18,41%	0,00%

Annexes

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	6	343,0	28,0	(310,3; 375,7)
RNM	6	374,8	54,1	(342,1; 407,5)
RCT	4	402,3	41,8	(362,2; 442,3)
RCM	5	408,6	33,4	(372,8; 444,4)
RCP	6	371,0	30,1	(338,3; 403,7)

Ecart type regroupé = 38,6245

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCM	5	408,6	A
RCT	4	402,3	A
RNM	6	374,8	A
RCP	6	371,0	A
RN	6	343,0	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	31,8	22,3	(-34,4; 98,1)	1,43	0,617
RCT - RN	59,3	24,9	(-14,8; 133,3)	2,38	0,159
RCM - RN	65,6	23,4	(-3,9; 135,1)	2,80	0,070
RCP - RN	28,0	22,3	(-38,2; 94,2)	1,26	0,720
RCT - RNM	27,4	24,9	(-46,6; 101,5)	1,10	0,805
RCM - RNM	33,8	23,4	(-35,7; 103,2)	1,44	0,607
RCP - RNM	-3,8	22,3	(-70,1; 62,4)	-0,17	1,000

Annexes

RCM - RCT	6,4	25,9	(-70,6; 83,3)	0,25	0,999
RCP - RCT	-31,3	24,9	(-105,3; 42,8)	-1,25	0,721
RCP - RCM	-37,6	23,4	(-107,1; 31,9)	-1,61	0,508

Niveau de confiance individuel = 99,29 %

Cholestérol- total

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les moyennes sont égales
Hypothèse alternative	Toutes les moyenne ne sont pas égales
Seuil de signification	$\alpha = 0,05$
Lignes non utilisées	4

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	5	RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	0,27787	0,069468	23,06	0,000
Erreur	21	0,06327	0,003013		
Total	25	0,34114			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0548881	81,45%	77,92%	71,02%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	6	0,6117	0,0343	(0,5651; 0,6583)

Annexes

RNM 6 0,5683 0,0417 (0,5217; 0,6149)

RCT 5 0,7360 0,0541 (0,6850; 0,7870)

RCM 4 0,7850 0,0526 (0,7279; 0,8421)

RCP 5 0,4880 0,0847 (0,4370; 0,5390)

Ecart type regroupé = 0,0548881

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCM	4	0,7850	A
RCT	5	0,7360	A
RN	6	0,6117	B
RNM	6	0,5683	B C
RCP	5	0,4880	C

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-0,0433	0,0317	(-0,1377; 0,0510)	-1,37	0,654
RCT - RN	0,1243	0,0332	(0,0254; 0,2233)	3,74	0,009
RCM - RN	0,1733	0,0354	(0,0679; 0,2788)	4,89	0,001
RCP - RN	-0,1237	0,0332	(-0,2226; -0,0247)	-3,72	0,010
RCT - RNM	0,1677	0,0332	(0,0687; 0,2666)	5,04	0,000
RCM - RNM	0,2167	0,0354	(0,1112; 0,3221)	6,12	0,000
RCP - RNM	-0,0803	0,0332	(-0,1793; 0,0186)	-2,42	0,150
RCM - RCT	0,0490	0,0368	(-0,0606; 0,1586)	1,33	0,676
RCP - RCT	-0,2480	0,0347	(-0,3513; -0,1447)	-7,14	0,000

Annexes

RCP - RCM	-0,2970	0,0368	(-0,4066; -0,1874)	-8,07	0,000
-----------	---------	--------	--------------------	-------	-------

Niveau de confiance individuel = 99,28 %

Triglycérides

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 1

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
---------	---------	---------

Facteur	5	RN; RNM; RCT; RCM; RCP
---------	---	------------------------

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	1,516	0,37897	6,08	0,003
Erreur	19	1,184	0,06230		
Total	23	2,700			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,249593	56,15%	46,92%	30,63%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	0,6120	0,1339	(0,3784; 0,8456)
RNM	5	0,8660	0,2012	(0,6324; 1,0996)
RCT	5	1,148	0,286	(0,914; 1,382)

Annexes

RCM 5 1,332 0,358 (1,098; 1,566)

RCP 4 0,9225 0,1898 (0,6613; 1,1837)

Ecart type regroupé = 0,249593

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement	
RCM	5	1,332	A	
RCT	5	1,148	A	
RCP	4	0,9225	A	B
RNM	5	0,8660	A	B
RN	5	0,6120	B	

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	0,254	0,158	(-0,220; 0,728)	1,61	0,510
RCT - RN	0,536	0,158	(0,062; 1,010)	3,40	0,022
RCM - RN	0,720	0,158	(0,246; 1,194)	4,56	0,002
RCP - RN	0,311	0,167	(-0,193; 0,814)	1,85	0,374
RCT - RNM	0,282	0,158	(-0,192; 0,756)	1,79	0,409
RCM - RNM	0,466	0,158	(-0,008; 0,940)	2,95	0,056
RCP - RNM	0,056	0,167	(-0,447; 0,560)	0,34	0,997
RCM - RCT	0,184	0,158	(-0,290; 0,658)	1,17	0,770
RCP - RCT	-0,226	0,167	(-0,729; 0,278)	-1,35	0,667
RCP - RCM	-0,409	0,167	(-0,913; 0,094)	-2,45	0,146

Niveau de confiance individuel = 99,27 %

HDL- Cholestérol

Annexes

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	5	RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	0,17285	0,043213	19,24	0,000
Erreur	22	0,04941	0,002246		
Total	26	0,22227			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0473926	77,77%	73,73%	66,54%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	6	0,6250	0,0321	(0,5849; 0,6651)
RNM	6	0,5383	0,0417	(0,4982; 0,5785)
RCT	5	0,6920	0,0676	(0,6480; 0,7360)
RCM	4	0,7050	0,0311	(0,6559; 0,7541)
RCP	6	0,5000	0,0537	(0,4599; 0,5401)

Ecart type regroupé = 0,0473926

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Annexes

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCM	4	0,7050	A
RCT	5	0,6920	A
RN	6	0,6250	A
RNM	6	0,5383	B
RCP	6	0,5000	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-0,0867	0,0274	(-0,1679; -0,0054)	-3,17	0,033
RCT - RN	0,0670	0,0287	(-0,0182; 0,1522)	2,33	0,172
RCM - RN	0,0800	0,0306	(-0,0109; 0,1709)	2,62	0,102
RCP - RN	-0,1250	0,0274	(-0,2063; -0,0437)	-4,57	0,001
RCT - RNM	0,1537	0,0287	(0,0684; 0,2389)	5,35	0,000
RCM - RNM	0,1667	0,0306	(0,0758; 0,2575)	5,45	0,000
RCP - RNM	-0,0383	0,0274	(-0,1196; 0,0429)	-1,40	0,633
RCM - RCT	0,0130	0,0318	(-0,0814; 0,1074)	0,41	0,994
RCP - RCT	-0,1920	0,0287	(-0,2772; -0,1068)	-6,69	0,000
RCP - RCM	-0,2050	0,0306	(-0,2959; -0,1141)	-6,70	0,000

Niveau de confiance individuel = 99,29 %

Glycémie

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Annexes

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 2

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	5	RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	0,9260	0,23150	13,76	0,000
Erreur	23	0,3871	0,01683		
Total	27	1,3131			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,129728	70,52%	65,39%	55,86%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	0,4620	0,1246	(0,3420; 0,5820)
RNM	6	0,6550	0,1319	(0,5454; 0,7646)
RCT	6	0,8217	0,1009	(0,7121; 0,9312)
RCM	5	0,9480	0,1728	(0,8280; 1,0680)
RCP	6	0,9517	0,1163	(0,8421; 1,0612)

Ecart type regroupé = 0,129728

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCP	6	0,9517	A
RCM	5	0,9480	A

Annexes

RCT	6	0,8217	A	B
RNM	6	0,6550		B C
RN	5	0,4620		C

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	0,1930	0,0786	(-0,0392; 0,4252)	2,46	0,136
RCT - RN	0,3597	0,0786	(0,1275; 0,5919)	4,58	0,001
RCM - RN	0,4860	0,0820	(0,2435; 0,7285)	5,92	0,000
RCP - RN	0,4897	0,0786	(0,2575; 0,7219)	6,23	0,000
RCT - RNM	0,1667	0,0749	(-0,0547; 0,3880)	2,23	0,206
RCM - RNM	0,2930	0,0786	(0,0608; 0,5252)	3,73	0,009
RCP - RNM	0,2967	0,0749	(0,0753; 0,5180)	3,96	0,005
RCM - RCT	0,1263	0,0786	(-0,1059; 0,3585)	1,61	0,507
RCP - RCT	0,1300	0,0749	(-0,0914; 0,3514)	1,74	0,433
RCP - RCM	0,0037	0,0786	(-0,2285; 0,2359)	0,05	1,000

Niveau de confiance individuel = 99,29 %

Urée

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les moyennes sont égales
Hypothèse alternative	Toutes les moyenne ne sont pas égales
Seuil de signification	$\alpha = 0,05$
Lignes non utilisées	3

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Annexes

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	5	RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	0,05586	0,013966	3,38	0,027
Erreur	22	0,09083	0,004129		
Total	26	0,14670			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0642556	38,08%	26,82%	5,29%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	0,6020	0,0653	(0,5424; 0,6616)
RNM	6	0,4983	0,0588	(0,4439; 0,5527)
RCT	5	0,5600	0,0791	(0,5004; 0,6196)
RCM	5	0,4760	0,0780	(0,4164; 0,5356)
RCP	6	0,5650	0,0378	(0,5106; 0,6194)

Ecart type regroupé = 0,0642556

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement	
RN	5	0,6020	A	
RCP	6	0,5650	A	B
RCT	5	0,5600	A	B
RNM	6	0,4983	A	B

Annexes

RCM 5 0,4760 B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-0,1037	0,0389	(-0,2192; 0,0119)	-2,66	0,093
RCT - RN	-0,0420	0,0406	(-0,1627; 0,0787)	-1,03	0,837
RCM - RN	-0,1260	0,0406	(-0,2467; -0,0053)	-3,10	0,038
RCP - RN	-0,0370	0,0389	(-0,1526; 0,0786)	-0,95	0,874
RCT - RNM	0,0617	0,0389	(-0,0539; 0,1772)	1,58	0,522
RCM - RNM	-0,0223	0,0389	(-0,1379; 0,0932)	-0,57	0,978
RCP - RNM	0,0667	0,0371	(-0,0435; 0,1768)	1,80	0,400
RCM - RCT	-0,0840	0,0406	(-0,2047; 0,0367)	-2,07	0,269
RCP - RCT	0,0050	0,0389	(-0,1106; 0,1206)	0,13	1,000
RCP - RCM	0,0890	0,0389	(-0,0266; 0,2046)	2,29	0,187

Niveau de confiance individuel = 99,29 %

La créatinine

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 1

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
---------	---------	---------

Annexes

Facteur 5 RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	10,23	2,557	1,34	0,282
Erreur	24	45,63	1,901		
Total	28	55,86			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
1,37891	18,31%	4,70%	0,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	6	10,667	1,751	(9,505; 11,829)
RNM	6	9,667	0,816	(8,505; 10,829)
RCT	6	10,667	1,633	(9,505; 11,829)
RCM	5	10,200	1,304	(8,927; 11,473)
RCP	6	9,167	1,169	(8,005; 10,329)

Ecart type regroupé = 1,37891

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCT	6	10,667	A
RN	6	10,667	A
RCM	5	10,200	A
RNM	6	9,667	A
RCP	6	9,167	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Annexes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-1,000	0,796	(-3,347; 1,347)	-1,26	0,719
RCT - RN	0,000	0,796	(-2,347; 2,347)	0,00	1,000
RCM - RN	-0,467	0,835	(-2,929; 1,995)	-0,56	0,980
RCP - RN	-1,500	0,796	(-3,847; 0,847)	-1,88	0,352
RCT - RNM	1,000	0,796	(-1,347; 3,347)	1,26	0,719
RCM - RNM	0,533	0,835	(-1,929; 2,995)	0,64	0,967
RCP - RNM	-0,500	0,796	(-2,847; 1,847)	-0,63	0,969
RCM - RCT	-0,467	0,835	(-2,929; 1,995)	-0,56	0,980
RCP - RCT	-1,500	0,796	(-3,847; 0,847)	-1,88	0,352
RCP - RCM	-1,033	0,835	(-3,495; 1,429)	-1,24	0,730

Niveau de confiance individuel = 99,30 %

Acide urique

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	5	RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	418,5	104,61	2,02	0,127

Annexes

Erreur 22 1138,7 51,76

Total 26 1557,2

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
7,19448	26,87%	13,58%	0,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	27,40	5,59	(20,73; 34,07)
RNM	5	31,60	6,58	(24,93; 38,27)
RCT	6	32,50	5,86	(26,41; 38,59)
RCM	5	37,00	7,97	(30,33; 43,67)
RCP	6	25,83	9,11	(19,74; 31,92)

Ecart type regroupé = 7,19448

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCM	5	37,00	A
RCT	6	32,50	A
RNM	5	31,60	A
RN	5	27,40	A
RCP	6	25,83	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	4,20	4,55	(-9,31; 17,71)	0,92	0,885
RCT - RN	5,10	4,36	(-7,84; 18,04)	1,17	0,767

Annexes

RCM - RN	9,60	4,55	(-3,91; 23,11)	2,11	0,251
RCP - RN	-1,57	4,36	(-14,50; 11,37)	-0,36	0,996
RCT - RNM	0,90	4,36	(-12,04; 13,84)	0,21	1,000
RCM - RNM	5,40	4,55	(-8,11; 18,91)	1,19	0,759
RCP - RNM	-5,77	4,36	(-18,70; 7,17)	-1,32	0,680
RCM - RCT	4,50	4,36	(-8,44; 17,44)	1,03	0,837
RCP - RCT	-6,67	4,15	(-19,00; 5,67)	-1,60	0,510
RCP - RCM	-11,17	4,36	(-24,10; 1,77)	-2,56	0,113

Niveau de confiance individuel = 99,29 %

TGO

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
---------	---------	---------

Facteur	5	RN; RNM; RCT; RCM; RCP
---------	---	------------------------

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	12875	3219	3,09	0,036
Erreur	23	23977	1042		
Total	27	36852			

Récapitulatif du modèle

Annexes

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
32,2877	34,94%	23,62%	3,21%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	5	340,6	36,9	(310,7; 370,5)
RNM	6	312,33	19,54	(285,07; 339,60)
RCT	6	296,0	37,0	(268,7; 323,3)
RCM	5	289,2	31,2	(259,3; 319,1)
RCP	6	277,0	34,4	(249,7; 304,3)

Ecart type regroupé = 32,2877

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement	
RN	5	340,6	A	
RNM	6	312,33	A	B
RCT	6	296,0	A	B
RCM	5	289,2	A	B
RCP	6	277,0		B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-28,3	19,6	(-86,1; 29,5)	-1,45	0,606
RCT - RN	-44,6	19,6	(-102,4; 13,2)	-2,28	0,187
RCM - RN	-51,4	20,4	(-111,8; 9,0)	-2,52	0,121
RCP - RN	-63,6	19,6	(-121,4; -5,8)	-3,25	0,026

Annexes

RCT - RNM	-16,3	18,6	(-71,4; 38,8)	-0,88	0,903
RCM - RNM	-23,1	19,6	(-80,9; 34,7)	-1,18	0,761
RCP - RNM	-35,3	18,6	(-90,4; 19,8)	-1,90	0,348
RCM - RCT	-6,8	19,6	(-64,6; 51,0)	-0,35	0,997
RCP - RCT	-19,0	18,6	(-74,1; 36,1)	-1,02	0,844
RCP - RCM	-12,2	19,6	(-70,0; 45,6)	-0,62	0,970

Niveau de confiance individuel = 99,29 %

TGP

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur Niveaux Valeurs

Facteur	5	RN; RNM; RCT; RCM; RCP
---------	---	------------------------

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	3305	826,2	2,38	0,081
Erreur	23	7975	346,7		
Total	27	11280			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
18,6210	29,30%	17,00%	0,00%

Moyennes

Annexes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	6	134,83	16,95	(119,11; 150,56)
RNM	6	127,67	11,72	(111,94; 143,39)
RCT	6	110,33	19,70	(94,61; 126,06)
RCM	5	114,80	16,78	(97,57; 132,03)
RCP	5	138,2	26,4	(121,0; 155,4)

Ecart type regroupé = 18,6210

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCP	5	138,2	A
RN	6	134,83	A
RNM	6	127,67	A
RCM	5	114,80	A
RCT	6	110,33	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	-7,2	10,8	(-38,9; 24,6)	-0,67	0,962
RCT - RN	-24,5	10,8	(-56,3; 7,3)	-2,28	0,188
RCM - RN	-20,0	11,3	(-53,4; 13,3)	-1,78	0,410
RCP - RN	3,4	11,3	(-30,0; 36,7)	0,30	0,998
RCT - RNM	-17,3	10,8	(-49,1; 14,4)	-1,61	0,505
RCM - RNM	-12,9	11,3	(-46,2; 20,5)	-1,14	0,783
RCP - RNM	10,5	11,3	(-22,8; 43,9)	0,93	0,881

Annexes

RCM - RCT	4,5	11,3	(-28,9; 37,8)	0,40	0,994
RCP - RCT	27,9	11,3	(-5,5; 61,2)	2,47	0,132
RCP - RCM	23,4	11,8	(-11,4; 58,2)	1,99	0,303

Niveau de confiance individuel = 99,29 %

Protéines totales

ANOVA à un facteur contrôlé : RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur Niveaux Valeurs

Facteur 5 RN; RNM; RCT; RCM; RCP

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	4	18,06	4,515	0,52	0,722
Erreur	24	208,70	8,696		
Total	28	226,76			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
2,94887	7,96%	0,00%	0,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
RN	6	73,67	2,88	(71,18; 76,15)
RNM	6	74,17	2,71	(71,68; 76,65)
RCT	6	75,00	3,35	(72,52; 77,48)

Annexes

RCM 5 75,600 2,074 (72,878; 78,322)

RCP 6 75,67 3,39 (73,18; 78,15)

Ecart type regroupé = 2,94887

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
RCP	6	75,67	A
RCM	5	75,600	A
RCT	6	75,00	A
RNM	6	74,17	A
RN	6	73,67	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
RNM - RN	0,50	1,70	(-4,52; 5,52)	0,29	0,998
RCT - RN	1,33	1,70	(-3,69; 6,35)	0,78	0,933
RCM - RN	1,93	1,79	(-3,33; 7,20)	1,08	0,814
RCP - RN	2,00	1,70	(-3,02; 7,02)	1,17	0,765
RCT - RNM	0,83	1,70	(-4,19; 5,85)	0,49	0,988
RCM - RNM	1,43	1,79	(-3,83; 6,70)	0,80	0,927
RCP - RNM	1,50	1,70	(-3,52; 6,52)	0,88	0,901
RCM - RCT	0,60	1,79	(-4,67; 5,87)	0,34	0,997
RCP - RCT	0,67	1,70	(-4,35; 5,69)	0,39	0,995
RCP - RCM	0,07	1,79	(-5,20; 5,33)	0,04	1,000

Niveau de confiance individuel = 99,30 %

Partie expérimentale III

Tableau III. Effet des margines sur le poids corporel

	RN (N = 3)	RNM (N = 3)	RCT (N = 3)	RCM (N= 3)
Poids initial (g)	267± 5,19	262± 10,81	262,5± 6,36	265±7,07
1 semaine	282,66 ± 2,51	277 ± 09	289 ± 11,31	284 ± 5,65
2 ^{ième} semaine	285,66 ± 10,78	288,66 ± 03,05	304,5 ± 16,26	303,5 ± 14,84
3 ^{ième} semaine	303,33 ±11,67	299 ± 04,35	312,5 ±14,84	319,5 ± 12,02
4 ^{ième} semaine	308,66 ± 07,09	309,33 ± 04,04	326,5 ± 17,67	339,5 ± 13,43
5 ^{ième} semaine	317,33 ± 10,59	314,33 ± 06,65	338 ± 12,72	359,5 ± 19,09
6 ^{ième} semaine	330,33 ±7,63	323,66 ± 9,07	352 ± 8,48	375 ± 14,14
7 ^{ième} semaine	340,66 ±18,82	327 ± 3	366 ± 11,31	388 ± 9,89
8 ^{ième} semaine	350 ± 22,71	332,66 ± 2,51	387,5 ± 19,09	400 ± 5,65
9 ^{ième} semaine	352 ± 27,07	334 ± 2,64	393 ± 22,62	413 ± 2,82
10 ^{ième} semaine	362,66 ± 25,14	348 ± 4,58	397,5 ± 10,60	422,5 ± 0,70
11 ^{ième} semaine	367 ± 26,88	346,66 ±7,50	406 ± 15,55	435 ± 5,65
12 ^{ième} semaine	370 ± 23,38	348,33 ± 9,60	423 ± 21,21	445,5 ± 6,36
13 ^{ième} semaine	366,33 ± 23,69	352,66 ± 8,73	437,5 ± 20,50	459,5 ± 10,60
14 ^{ième} semaine	377,66 ± 25,73	351 ± 9,53	443 ±21,21	472 ± 14,14

Partie expérimentale IV

Poids des rats avant et à la fin de l'expérimentation

Annexes

	début de l'expérimentation	fin de l'expérimentation
Poids corporel des RN (N= 6)	232,66 ± 19,75 g	362,33 ± 28,30 g
Poids corporel des RC (N=6)	233 ± 7,21 g	456,33 ± 08,96 g

Partie expérimentale V

Test 1

Le nombre de plaquettes sanguines

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	3	1; 2; 3

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	2	6476	3238,1	10,53	0,011
Erreur	6	1845	307,6		
Total	8	8322			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
17,5373	77,82%	70,43%	50,11%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
---------	---	---------	-------	-----------

Annexes

1	3	214,0	22,1	(189,2; 238,8)
2	3	154,33	12,42	(129,56; 179,11)
3	3	160,33	16,77	(135,56; 185,11)

Ecart type regroupé = 17,5373

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	3	214,0	A
3	3	160,33	B
2	3	154,33	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-59,7	14,3	(-103,6; -15,7)	-4,17	0,014
3 - 1	-53,7	14,3	(-97,6; -9,7)	-3,75	0,022
3 - 2	6,0	14,3	(-37,9; 49,9)	0,42	0,909

Niveau de confiance individuel = 97,80 %

Le taux de fibrinogène

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les moyennes sont égales
Hypothèse alternative	Toutes les moyenne ne sont pas égales
Seuil de signification	$\alpha = 0,05$
Lignes non utilisées	1

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Annexes

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	3	1; 2; 3

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	2	0,5097	0,25483	7,00	0,036
Erreur	5	0,1821	0,03643		
Total	7	0,6918			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,190858	73,67%	63,14%	39,95%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	3	2,227	0,217	(1,943; 2,510)
2	3	1,903	0,206	(1,620; 2,187)
3	2	1,5800	0,0566	(1,2331; 1,9269)

Ecart type regroupé = 0,190858

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	3	2,227	A
2	3	1,903	A B
3	2	1,5800	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-0,323	0,156	(-0,830; 0,184)	-2,07	0,190

Annexes

3 - 1	-0,647	0,174	(-1,213; -0,080)	-3,71	0,031
3 - 2	-0,323	0,174	(-0,890; 0,243)	-1,86	0,245

Niveau de confiance individuel = 97,74 %

Le taux de Calcium

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3

Méthode

Hypothèse nulle	Toutes les moyennes sont égales
Hypothèse alternative	Toutes les moyenne ne sont pas égales
Seuil de signification	$\alpha = 0,05$
Lignes non utilisées	1

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	3	1; 2; 3

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	2	104,895	52,4477	307,31	0,000
Erreur	5	0,853	0,1707		
Total	7	105,749			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,413118	99,19%	98,87%	98,05%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
---------	---	---------	-------	-----------

Annexes

1 3 53,967 0,351 (53,354; 54,580)

2 3 49,267 0,513 (48,654; 49,880)

3 2 44,700 0,283 (43,949; 45,451)

Ecart type regroupé = 0,413118

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	3	53,967	A
2	3	49,267	B
3	2	44,700	C

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-4,700	0,337	(-5,797; -3,603)	-13,93	0,000
3 - 1	-9,267	0,377	(-10,493; -8,040)	-24,57	0,000
3 - 2	-4,567	0,377	(-5,793; -3,340)	-12,11	0,000

Niveau de confiance individuel = 97,74 %

Test 2

Le nombre de plaquettes sanguines

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 1

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Annexes

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	3	1; 2; 3

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	2	1675,50	837,75	44,09	0,001
Erreur	5	95,01	19,00		
Total	7	1770,51			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
4,35920	94,63%	92,49%	86,69%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	2	104,50	3,54	(96,58; 112,42)
2	3	68,47	5,43	(62,00; 74,94)
3	3	74,97	3,44	(68,50; 81,44)

Ecart type regroupé = 4,35920

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	2	104,50	A
3	3	74,97	B
2	3	68,47	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-36,03	3,98	(-48,98; -23,09)	-9,05	0,001

Annexes

3 - 1	-29,53	3,98	(-42,48; -16,59)	-7,42	0,002
3 - 2	6,50	3,56	(-5,08; 18,08)	1,83	0,253

Niveau de confiance individuel = 97,74 %

Le taux de fibrinogène

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	3	1; 2; 3

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	2	0,2705	0,13527	2,20	0,227
Erreur	4	0,2458	0,06146		
Total	6	0,5164			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,247916	52,39%	28,59%	0,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	2	2,025	0,445	(1,538; 2,512)
2	3	1,9900	0,1539	(1,5926; 2,3874)

Annexes

3 2 1,570 0,000 (1,083; 2,057)

Ecart type regroupé = 0,247916

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	2	2,025	A
2	3	1,9900	A
3	2	1,570	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-0,035	0,226	(-0,842; 0,772)	-0,15	0,987
3 - 1	-0,455	0,248	(-1,339; 0,429)	-1,84	0,270
3 - 2	-0,420	0,226	(-1,227; 0,387)	-1,86	0,265

Niveau de confiance individuel = 97,65 %

Le taux de Calcium

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	3	1; 2; 3

Analyse de variance

Annexes

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	2	275,025	137,513	192,42	0,000
Erreur	5	3,573	0,715		
Total	7	278,599			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,845380	98,72%	98,20%	97,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	2	59,300	0,424	(57,763; 60,837)
2	3	52,667	1,270	(51,412; 53,921)
3	3	44,433	0,289	(43,179; 45,688)

Ecart type regroupé = 0,845380

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	2	59,300	A
2	3	52,667	B
3	3	44,433	C

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-6,633	0,772	(-9,144; -4,123)	-8,60	0,001
3 - 1	-14,867	0,772	(-17,377; -12,356)	-19,26	0,000
3 - 2	-8,233	0,690	(-10,479; -5,988)	-11,93	0,000

Niveau de confiance individuel = 97,74 %

Test 3

Le nombre de plaquettes sanguines

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Lignes non utilisées 1

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	3	1; 2; 3

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	2	8899	4449,6	10,16	0,027
Erreur	4	1753	438,1		
Total	6	10652			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
20,9314	83,55%	75,32%	59,72%

Moyennes

Annexes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	2	122,50	13,44	(81,41; 163,59)
2	3	137,0	27,9	(103,4; 170,6)
3	2	209,00	4,24	(167,91; 250,09)

Ecart type regroupé = 20,9314

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
3	2	209,00	A
2	3	137,0	B
1	2	122,50	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	14,5	19,1	(-53,6; 82,6)	0,76	0,745
3 - 1	86,5	20,9	(11,9; 161,1)	4,13	0,031
3 - 2	72,0	19,1	(3,9; 140,1)	3,77	0,042

Niveau de confiance individuel = 97,65 %

Le taux de fibrinogène

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Annexes

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	3	1; 2; 3

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	2	0,08310	0,04155	1,01	0,427
Erreur	5	0,20505	0,04101		
Total	7	0,28815			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,202509	28,84%	0,37%	0,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	2	2,065	0,205	(1,697; 2,433)
2	3	1,860	0,207	(1,559; 2,161)
3	3	1,810	0,197	(1,509; 2,111)

Ecart type regroupé = 0,202509

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	2	2,065	A
2	3	1,860	A
3	3	1,810	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-0,205	0,185	(-0,806; 0,396)	-1,11	0,550

Annexes

3 - 1	-0,255	0,185	(-0,856; 0,346)	-1,38	0,418
3 - 2	-0,050	0,165	(-0,588; 0,488)	-0,30	0,951

Niveau de confiance individuel = 97,74 %

Le taux de Calcium

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	3	1; 2; 3

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	2	0,1988	0,09938	0,25	0,789
Erreur	5	2,0000	0,40000		
Total	7	2,1988			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,632456	9,04%	0,00%	0,00%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	2	45,500	0,566	(44,350; 46,650)
2	3	45,100	0,794	(44,161; 46,039)
3	3	45,200	0,458	(44,261; 46,139)

Ecart type regroupé = 0,632456

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	2	45,500	A
3	3	45,200	A
2	3	45,100	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-0,400	0,577	(-2,278; 1,478)	-0,69	0,778
3 - 1	-0,300	0,577	(-2,178; 1,578)	-0,52	0,865
3 - 2	0,100	0,516	(-1,580; 1,780)	0,19	0,980

Niveau de confiance individuel = 97,74 %

Test 4

Le nombre de plaquettes sanguines

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3; 4

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	1; 2; 3; 4

Analyse de variance

Annexes

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	2078,61	692,871	70,32	0,001
Erreur	4	39,42	9,854		
Total	7	2118,03			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
3,13907	98,14%	96,74%	92,56%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	2	94,05	2,62	(87,89; 100,21)
2	2	64,05	1,91	(57,89; 70,21)
3	2	54,90	5,37	(48,74; 61,06)
4	2	54,650	0,212	(48,487; 60,813)

Ecart type regroupé = 3,13907

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	2	94,05	A
2	2	64,05	B
3	2	54,90	B
4	2	54,650	B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-30,00	3,14	(-42,79; -17,21)	-9,56	0,002

Annexes

3 - 1	-39,15	3,14	(-51,94; -26,36)	-12,47	0,001
4 - 1	-39,40	3,14	(-52,19; -26,61)	-12,55	0,001
3 - 2	-9,15	3,14	(-21,94; 3,64)	-2,91	0,135
4 - 2	-9,40	3,14	(-22,19; 3,39)	-2,99	0,125
4 - 3	-0,25	3,14	(-13,04; 12,54)	-0,08	1,000

Niveau de confiance individuel = 98,48 %

Le taux de fibrinogène

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3; 4

Méthode

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur Niveaux Valeurs

Facteur 4 1; 2; 3; 4

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	0,03628	0,012095	3,01	0,104
Erreur	7	0,02813	0,004019		
Total	10	0,06442			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,0633960	56,33%	37,61%	1,74%

Moyennes

Annexes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	2	1,710	0,000	(1,604; 1,816)
2	3	1,5400	0,0346	(1,4535; 1,6265)
3	3	1,5833	0,0404	(1,4968; 1,6699)
4	3	1,6133	0,1060	(1,5268; 1,6999)

Ecart type regroupé = 0,0633960

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	2	1,710	A
4	3	1,6133	A
3	3	1,5833	A
2	3	1,5400	A

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-0,1700	0,0579	(-0,3615; 0,0215)	-2,94	0,081
3 - 1	-0,1267	0,0579	(-0,3182; 0,0648)	-2,19	0,216
4 - 1	-0,0967	0,0579	(-0,2882; 0,0948)	-1,67	0,403
3 - 2	0,0433	0,0518	(-0,1280; 0,2146)	0,84	0,836
4 - 2	0,0733	0,0518	(-0,0980; 0,2446)	1,42	0,528
4 - 3	0,0300	0,0518	(-0,1413; 0,2013)	0,58	0,935

Niveau de confiance individuel = 98,70 %

Le taux de Calcium

ANOVA à un facteur contrôlé : 1; 2; 3; 4

Méthode

Annexes

Hypothèse nulle Toutes les moyennes sont égales

Hypothèse alternative Toutes les moyenne ne sont pas égales

Seuil de signification $\alpha = 0,05$

Les variances ont été supposées égales pour l'analyse.

Informations sur les facteurs

Facteur	Niveaux	Valeurs
Facteur	4	1; 2; 3; 4

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Facteur	3	14,545	4,8485	16,97	0,001
Erreur	7	2,000	0,2857		
Total	10	16,545			

Récapitulatif du modèle

S	R carré	R carré (ajust)	R carré (prév)
0,534522	87,91%	82,73%	72,80%

Moyennes

Facteur	N	Moyenne	EcTyp	IC à 95 %
1	2	49,00	0,00	(48,11; 49,89)
2	3	46,333	0,577	(45,604; 47,063)
3	3	45,667	0,577	(44,937; 46,396)
4	3	46,333	0,577	(45,604; 47,063)

Ecart type regroupé = 0,534522

Comparaisons deux à deux de Tukey

Informations de groupement avec la méthode de Tukey et un niveau de confiance de 95 %

Facteur	N	Moyenne	Groupement
1	2	49,00	A
4	3	46,333	B

Annexes

2 3 46,333 B

3 3 45,667 B

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

Tests de simultanéité de Tukey pour les différences des moyennes

Différence des niveaux	Différence des moyennes	Erreur type de la différence	IC à 95 %	Valeur de T	Valeur de p ajustée
2 - 1	-2,667	0,488	(-4,281; -1,052)	-5,47	0,004
3 - 1	-3,333	0,488	(-4,948; -1,719)	-6,83	0,001
4 - 1	-2,667	0,488	(-4,281; -1,052)	-5,47	0,004
3 - 2	-0,667	0,436	(-2,111; 0,778)	-1,53	0,471
4 - 2	0,000	0,436	(-1,444; 1,444)	0,00	1,000
4 - 3	0,667	0,436	(-0,778; 2,111)	1,53	0,471

Niveau de confiance individuel = 98,70 %

Publication scientifique :

Messaoudi D., Bouallagui Z., Henab A. and Moulti-Mati F. (2019). Protective effect of olive mill wastewater against lipid metabolism perturbation induced in cafeteria diet fed rats. *ALJEST*, 5 (2), 930-936.

Communication scientifique affichée:

Messaoudi Djamila; Zouhaier Bouallagui; Moulti-Mati Farida. Metabolic parameters effects of raw olive mill wastewater in Rats Fed a Cafeteria Diet. At the first international congress on Biotechnologies for Sustainable Development CIBSDD 2017. BOUMERDES, ALGERIA 24-25 OCTOBER.

Protective effect of olive mill wastewater against lipid metabolism perturbation induced in cafeteria diet fed rats

*D. Messaoudi¹, Z. Bouallagui², A. Henab³, F. Moulti-Mati⁴

¹Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnologies, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University, Tizi Ouzou, Algeria.

²Laboratory of Environmental Bioprocesses, Centre of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, P.O. Box "1177", Sfax 3018, Tunisia.

³Mohamed Nedir hospital, Anatomy and Pathology service of Tizi ouzou, Algeria.

⁴Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnologies, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University, Tizi Ouzou, Algeria.

* Corresponding author: mohamdi.djamila@yahoo.fr; Tel: +213 659138292

ARTICLE INFO

ABSTRACT/ RESUME

Article History:

Received : 10/03/2018

Accepted : 25/02/2019

Key words:

Biochemical parameters;
Cafeteria diet;
Olive mill wastewater (OMWW);
Phenolic compounds;
Wistar rats;
HPLC analysis.

Abstract: The biological activities of phenolic compounds from olive mill wastewater (OMWW) have been extensively studied. However, the bioactivity of raw OMWW has not been yet well demonstrated in vivo. The objective of this study was to evaluate the effect of oral administration of OMWW on cafeteria diet induced metabolic disorders in rats. Our results showed that within a 13-week treatment period, the cafeteria diet induced an increase in glucose and triglycerides levels. The levels of glucose, triglycerides and the total cholesterol were significantly decreased after supplementation with OMWW ($p < 0.05$). To evaluate the toxicity effect of OMWW, the results concerning the blood parameters of the renal and liver function (urea, creatinine, uric acid, bilirubin, total protein and transaminases) showed that there are not difference between the control and the OMWW supplementation groups. The liver histology from rats fed with cafeteria diet showed a steatosis which is characterized by lipid droplet accumulation in the hepatocytes cytoplasm. In OMWW supplemented groups, the liver tissue showed a structure similar to the control group. HPLC analysis of OMWW reveled the major presence of a phenolic acid wich is hydroxytyrosol. In conclusion, our study suggests that OMWW brought real health benefits by protecting liver tissue and modulating some biological parameters such as lipid parameters.

I. Introduction

Obesity is one of the most important risk factors contributing to cardiovascular diseases [1]. In the Mediterranean area, the incidence of heart disease is lower due to a diet that is based mainly on fruits, vegetables and olive oil fat [2]. Olive oil is obtained by pressing the olive fruit, which contains a variety of phenolic compounds. During olive oil extraction, large amounts of water are generated and

subsequently discarded. These olive mill wastewaters (OMWW) contain notable amounts of polar phenolic compounds (approximately 53 %) [3], including hydroxytyrosol (HT), tyrosol, catechol, caffeic acid, and *para*-coumaric acid, which are major contributors to the environmental toxicity of OMWW [4][5]. These phenolic compounds, which are present in general in olives, olive oil and olive byproducts [6], are endowed with several biological activities such as antioxidant properties [7][8], inhibit platelet aggregation,

lipoxygenases and eicosanoid production [9][10]. However, these phenolic compounds also have hypoglycemic and hypolipidemic properties. Indeed Hamden et al.[11][12] reported that the administration of hydroxytyrosol extracted from olive mill waste decreases plasma glucose and cholesterol levels in diabetic rats. In addition, Cao et al.[13] show that HT could prevent high-fat-diet (HFD) induced obesity, hyperglycemia and hyperlipidemia in C57BL/6 J mice. In fact, HT is an effective compound that exerts a protective effect against dyslipidemia and hyperglycemia observed in several pathologies such as obesity, diabetes and metabolic syndrome. The extraction methods of polyphenols from OMWW are expensive and now a day, data concerning the effects of raw OMWW *in vivo* has not been reported yet. Therefore, in the present work, the hypolipidemic effects of OMWW on plasma lipid levels and the histological structure of liver tissue were analyzed using a model of rats who have received a cafeteria diet. In addition, the probably toxic effects of OMWW on the renal and liver function were also investigated.

II. Materials and methods

II.1. Preparation of OMWW

Fresh olive mill wastewater was supplied by a discontinuous olive milling plant from a cooperative in Kabylia region (Algeria). This sample was collected in the mid olive harvesting season (January 2015) and conserved at 4 °C. In our experiment, samples have not been treated with the exception of a decantation in order to eliminate a maximum of fat. The partial characterization of olive mill waste consists in determining the dry matter content, pH, total carbohydrates, lipids and total nitrogen. The pH was measured using a pH meter. The total dry matter was determined after drying at 105 °C. The total sugars was measured using the Dubois method [14]. The OMWW fats content was estimated following an extraction with hexane solvent. Total Nitrogen (TN) was determined following the Kjeldahl method (Table 1).

Table 1. Parameters of olive mill wastewater

Parameters	OMWW
pH (20 °C)	4.65
Dry matter (g/L)	50.5 ± 1.32
Total sugars (g/L)	5.16 ± 0.56
Lipids (g/L)	0.6 ± 0.04
Total Nitrogen (TN) (mg/L)	431 ± 27

II.2. HPLC analysis

A reverse phase high performance liquid chromatography method was developed to identify and quantify the major phenolic compounds contained in olive mill wastewater. Concentrations were calculated based on the peak areas compared to those of the authentic standards. The HPLC chain used is of the "Agilent technologies series 1260" type. It includes a binary pump, a diode array UV detector, an automatic injector and a thermostatted column compartment. The separation is carried out on a C18 column (250 mm in length x 4.6 mm in diameter x 3.5 µm as particle size). The mobile phase used is composed of two solutions: 0.1% acetic acid in water (A) and 100% acetonitrile (B) with a flow rate of 0.5 ml / min. Phenolic compounds were identified by comparison with commercial standards and by verification of their corresponding absorption spectra.

II.3. Animals and treatment

All the experiments were carried out according to the guidelines of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), following approval by the Institutional Animal Care Committee of the Algerian Higher Education and Scientific Research. The permits and ethical rules were achieved according to the Executive Decree n_10-90 completing the Executive Decree n_04-82 of the Algerian Government, establishing the terms and approval modalities of animal welfare in animal facilities. This was also, recently supported by the USTHB university ethical committee of the "Algerian Association of Animal Experimentation Sciences" AASEA (Agreement Number 45/DGLPAG/DVA.SD A.14).

Thirty male Wistar rats weighing between 220 and 250 g were purchased from Pasteur Institute (Algiers). The animals were individually housed in cages at a 25 °C controlled temperature and 12 h light and darkness alternating periods. The rats were randomly divided into four groups. Group 1 (Control group n= 6) was fed with a standard diet (SD). Group 2 (n= 9) was given a standard diet with incorporation of raw OMWW (SDO) in drinking water (dilution 11 times in water). Groups 3 (n= 6) was given a cafeteria diet (CD) and 4 group (n= 9) received a cafeteria diet with OMWW in drinking water (CDO). The duration of the treatment was 13 weeks. The body weight was measured every week. At the end of the experimental period, the rats were sacrificed by decapitation. Plasma samples were collected and stored at -80 °C until analysis.

II.4. Diet composition

The cafeteria diet used in our study is a hyper-caloric and hyper-lipidic diet. It was composed of 50% standard diet and 50% of a mixture of

products made locally and containing: cookies - pâté - cheese - chips - peanut - chocolate, in proportions of: 2: 2: 2: 1: 1: 1. The standard regime is manufactured by SARL local production (Cattle Feed Agglomerates, Bouzareua, Algiers, Algeria). The characterization of these diets consists in carrying out assays of lipids, sugars and proteins according to the industrial processes. The characteristics of the used diet are presented in Table 2.

Table 2. Composition of the experimental diets (g/100g diet)

Parameters (g/100g diet)	Standard diet	Cafeteria diet
Sugars	2 g	13.86 g
Lipids	4.53 g	24.34 g
Proteins	19 g	10.18
Energetic value	124.77 Kcal (521.53 KJ)	315.22 Kcal (1317.61 KJ)

II.5. Biochemical analysis

Quantitative estimation of plasma triglyceride (TG), glucose, total cholesterol (TC) levels and high-density lipoproteins (HDL), hepatic enzymes: (AST) and (ALT), total protein, total bilirubin, Uric acid, Urea and creatinine were measured using an automatic biochemistry analyzer Abbot Architect Ci 4100at laboratory Zerrar at Tizi-Ouzou, Algeria.

II.6. Liver histopathological analysis

Three livers were randomly selected from each group for routine light microscopy observation. They were taken freshly and immediately fixed in 10% formalin fluid, embedded in paraffin and serially sectioned at 5µm. These sections were stained with haematoxylin eosin (HE) for routine histological examination. Liver steatosis was considered to assess the histological integrity. Semi-quantitative assessment was performed using scores ranging from 0 to 4 as follows: (1+) represents a 25% loss, (2+) represents a 50% loss, (3+) represents a 75% loss and (4+) represents more than 75% loss [15][16]. The score was determined in 20 randomly selected sections which were examined at 100X magnification.

II.7. Statistical analysis

All data were expressed as means $\pm$ standard deviation (mean $\pm$ SD). Differences between treatments were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons with statistical significance. The software used is minitab18.

III. Results and discussion

III.1. Body growth

During the study period, a regular increase in body growth rate was noticed in cafeteria diet-fed rats (Figure 1). At day of sacrifice, final body weight of the CD group showed a significant increase ($p < 0.05$) compared to the control group (SD). OMWW supplementation in rats of both groups (SDO) and (CDO) induced a no significant decrease in weight.

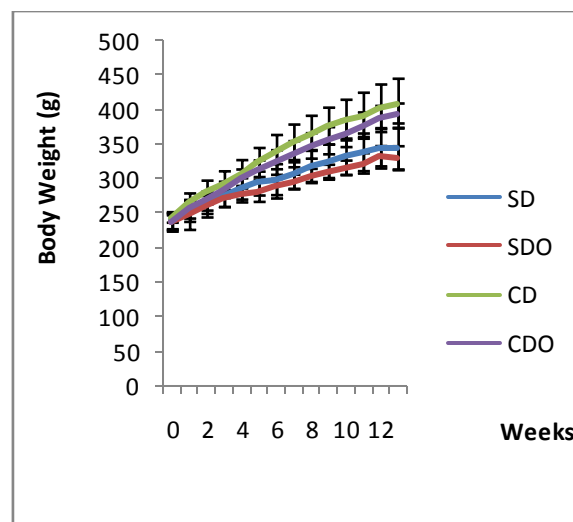


Figure 1. Body weight (g) of male rats during the experimental period. Control group (SD), rats treated with OMWW (SDO), cafeteria diet-fed rats (CD) and cafeteria diet-fed rats treated with OMWW (CDO).

III.2. HPLC analysis

In the present study, we investigated the effect of dietary phenolic compounds from OMWW in rats given a cafeteria diet. Through HPLC analysis (Figure 2), OMWW has showed few phenolic compounds with hydroxytyrosol being the major compound with a concentration of 0.25 g/L with trace amounts of tyrosol. Previous reports showed a predominant presence of hydroxytyrosol in OMWW at important levels (1.225 g/L and 1.433 g/L) [17][18].

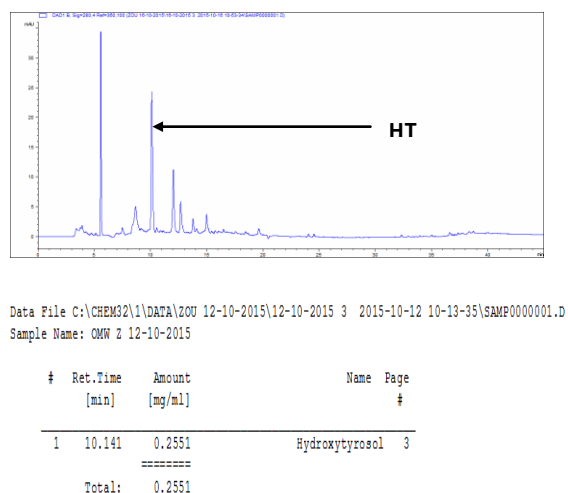


Figure 2. High performance liquid chromatography (HPLC) at 280 nm of raw olive mill wastewater (OMWW). HT: Hydroxytyrosol.

III.3. Plasma parameters

Cafeteria diet induced a perturbation in plasma sugar and lipid parameters. Unlike Cholesterol and High-Density Lipoprotein (HDL), the plasma of triglyceride and glucose levels showed an increase compared to the control group ($p < 0.05$) (Figure 3). Concerning total cholesterol, triglyceride and glucose levels, following supplementation of OMWW to standard and cafeteria diet-fed rats, a significant amelioration was displayed ($P < 0.05$). Similar effect was observed for HDL level but only in CDO group.

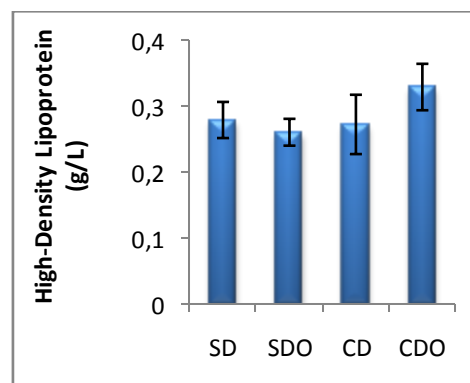
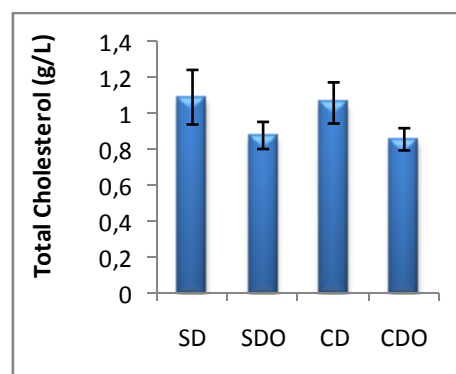
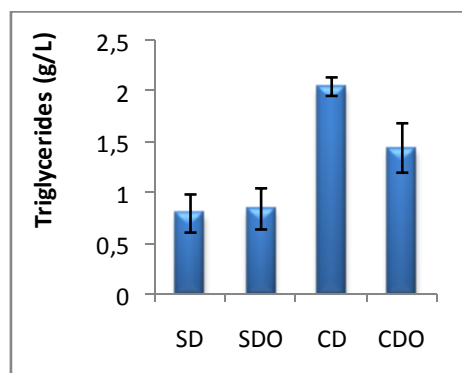
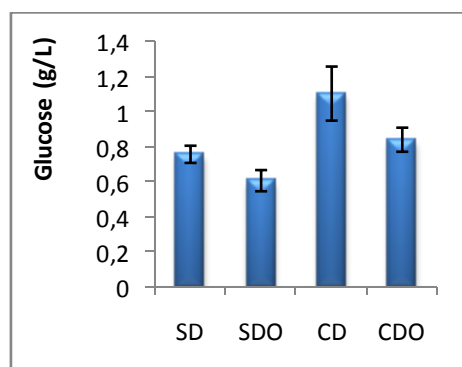


Figure 3. Effect of cafeteria diet and its combination with OMWW on plasma lipid parameters: triglycerides (g/L), cholesterol (g/L), HDL (g/L) and glucose (g/L). Control group (SD), rats treated with OMWW (SDO), cafeteria diet-fed rats (CD) and cafeteria diet-fed rats treated with OMWW (CDO).

For the hypoglycemic effect of OMWW, Hamden *et al.* [11][12] reported that hydroxytyrosol decrease plasma glucose levels in rats. This hypoglycemic effect might be explained by the inhibition of the activity of maltase, lactase and sucrose, the most important carbohydrate enzymes located in antherocytes and catalyze the breakdown of disaccharides into simple sugars, readily available for intestinal absorption [19][20].

The concentration of total cholesterol was significantly reduced by an oral intake of OMWW. Similar results were reported by previous studies but only about OMWW phenols. Indeed, Jemai *et al.* [21] and Fki *et al.* [22][17] have shown that oral administration of hydroxytyrosol or total polyphenols extracted from OMWW to Wistar rats induced a hypocholesterolemic effect by a significant decrease of CT, TG and LDL-C (Low-density lipoprotein) levels and an increase in HDL. Hamden *et al.* [12] reported that purified HT exerts a potential inhibition of intestinal lipase activity. Thus, this inhibitory effect decreases the hydrolysis of dietary triglycerides to monoglycerides and free fatty acids, resulting in a decrease in lipid

absorption. Our results suggest that OMWW has a potent serum lipid-lowering effect in cafeteria diet-fed rats. Indeed, the intake of diluted raw OMWW induced a protective effect against lipid metabolism perturbation.

Concerning transaminase levels, urea, total bilirubin, uric acid, total protein and creatinine, there is no significant difference between the control group (SD) and OMWW-treated (SDO) group (Table 3). However, the levels of transaminases and uric acid decreased significantly for the CD group ($p < 0.05$), probably because the cause is attributed to the cafeteria diet, however the OMWW supplementation (CDO group) seems to improve the levels of these parameters. These results show that OMWW does not affect blood parameters related to renal and hepatic function.

Table 3. Plasma levels of ALT (UI/L), AST (UI/L), total protein (g/l), total bilirubin (mg/l), uric acid (mg/l), urea (g/l) and creatinine (mg/l). controls (SD), treated with OMWW (SDO), CAF-diet (CD) and OMWW with CAF-diet (CDO). Treated (SD, SDO, CDO) vs. control (CD): (a,b,c) $p \leq 0.05$. Treated (SD, SDO) vs. treated (CDO): (d,e) $p \leq 0.05$.

Blood parameters	SD	SDO	CD	CDO
AST (UI/L)	427 $\pm$ 63.83	406.66 $\pm$ 35.75	227.6 $\pm$ 26.50	325.3 $\pm$ 61.86
ALT (UI/L)	125 $\pm$ 05	115.8 $\pm$ 13.16	64.5 $\pm$ 12.06	74.12 $\pm$ 13.27
Total protein (g/L)	91 $\pm$ 3.55	90 $\pm$ 5.44	91.75 $\pm$ 6.39	89.87 $\pm$ 7.39
Total bilirubin (mg/L)	1.2 $\pm$ 0.44	1.71 $\pm$ 0.48	1.25 $\pm$ 0.5	1.37 $\pm$ 0.51
Uric acid (mg/L)	29.25 $\pm$ 1.25	26.66 $\pm$ 3.01	17.5 $\pm$ 1.73	24.5 $\pm$ 3
Urea (g/L)	0.56 $\pm$ 0.07	0.50 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.02
Creatinine (mg/L)	10.33 $\pm$ 0.57	9.25 $\pm$ 0.5	9.66 $\pm$ 0.57	9.75 $\pm$ 0.88

III.4. Histological study

Light microscopic observation of hepatic tissue within the control (SD) and the OMWW-treated (SDO) group showed normal large polygonal cells with prominent round nuclei and eosinophilic cytoplasm (Figure 3, SD, SDO). Regarding the

cafeteria diet fed group, the liver histopathological observation showed a micro-vesicular steatosis and a leukocytes inflammatory cells infiltration mainly in the portal triad (Figure 4, CD). The liver tissue from cafeteria diet-fed rats supplemented with OMWW appeared similar to those of control rats (Figure 4, CDO).

Histopathological examination of liver tissue supported the biochemical data and shows the powerful activity of OMWW in reducing steatosis induced by cafeteria diet. Similar previous statements indicated that olive oil phenols and hydroxytyrosol able to reduce liver steatosis induced by high cholesterol diet [23][24][25].

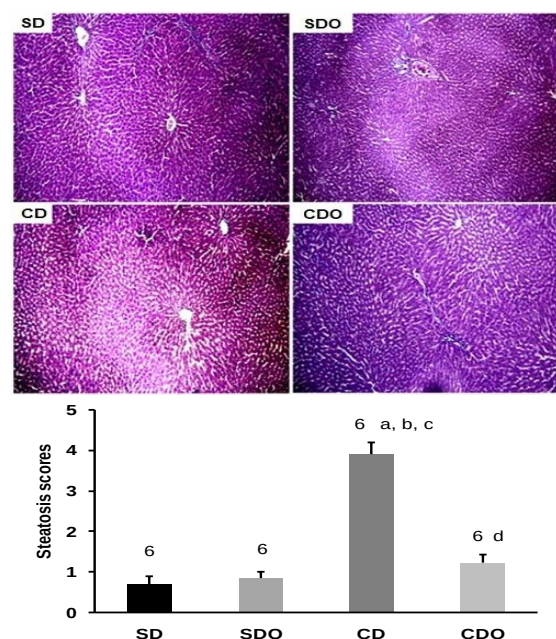


Figure 4. Histological aspect and semi-quantitative scores of liver injury in control and treated groups. HE staining; magnification: 100X. Control group (SD), rats treated with OMWW (SDO), cafeteria diet-fed rats (CD) and cafeteria diet-fed rats treated with OMWW (CDO). a,b,c for statistical comparison (SD, SDO, CDO) vs CD; d for statistical comparison SD vs CDO; $p \leq 0.01$.

Histological data are also in agreement with biochemical findings. Indeed, lipid droplets accumulation was observed in the cytoplasm of hepatocytes from cafeteria diet fed rats. This phenomenon known as microvesicular steatosis has been largely discussed [17].

IV. Conclusion

In summary, the present study demonstrated that OMWW, eventually through its phenolic compounds, has a very pronounced hypolipidemic and hypoglycemic activity and may protect the liver function against cafeteria diet damaging effects. Furthermore, our results showed that raw OMWW had not toxic effects in hepatic and renal functions. These properties are interesting regarding its uses as therapeutic agent in biotechnological applications especially in developing hypocholesterolemic drugs, therefore it can be used as a powerful agent in the prevention of cardiovascular diseases and an anti-obesity drug.

Acknowledgements

The authors would like to thank Sirine Choura (Centre of Biotechnology of SFAX CBS) for her technical assistance with HPLC analysis.

V. References

- Haslam, D.W.; James, W.P. Obesity. *Lancet* 366 (2005) 1197–209.
- Keys, A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *The American Journal of Clinical Nutrition* 61(1995) 1321–1323.
- Rodis, P.S.; Karathanos, V.T.; Mantzavinou, A. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(2002) 596–601.
- Capasso, R. The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. *Current Topics in Phytochemistry Research Trends* 1 (1997) 145–156.
- Greco, G.J.; Colarieti, M.L.; Toscano, G.; Iamarino, G.; Rao, M.A.; Gianfreda, L. Mitigation of olive mill wastewater toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(2006) 6776–6782.
- Servilli, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Minitati, E.; Macchioni, A.; Montedoro, G.F. HPLC evaluation of phenols in virgin olive oil, vegetable waters and pomace and 1D- and 2D-NMR characterization. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 76 (1999) 873–882.
- Visioli, F.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Zarini, S.; Conte, D.; Vincieri, F.F.; Galli, C. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(1999) 3397–3401.
- Gorinstein, S.; Leontowicz, H.; Lojek, A.; Leontowicz, M.; Ciz, M.; Krzeminski, R.; Gralak, M.; Czerwinski, J.; Jastrzebski, Z.; Trakhtenberg, S.; Grigelmo-Miguel, N.; Soliva-Fortuny, R. Olive oils improve lipid metabolism and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(2002) 6102–6108.
- Petroni, A.; Blasevich, M.; Salami, M.; Papini, N.; Montedoro, G.F.; Galli, C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research* 78 (1995) 151–160.
- De la Puerta, R.; Ruiz-Gutierrez, V.; Hault, J.R. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical Pharmacology* 57 (1999) 445–449.
- Hamden, K.; Allouche, N.; Damak, M.; Elfeki, A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions* 180(2009) 421–432.
- Hamden, K.; Allouche, N.; Jouadi, B.; El-Fazaa, S.; Gharbi, N.; Carreau, S.; Damak, M.; Elfeki, A. Inhibitory Action of Purified Hydroxytyrosol from Stored Olive Mill Waste on Intestinal Disaccharidases and Lipase Activities and Pancreatic Toxicity in Diabetic Rats. *Food Science and Biotechnology* 19 (2010) 439–447.
- Cao, K.; Xu, J.; Zou, X.; Li, Y.; Chen, C.; Zheng, A. et al. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radical Biology and Medicine* 67(2014) 396–40.
- Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 4265(1951) 168–167.
- Koop, D.R.; Klopstein, B.; Imuro, Y.; Thuman, R.G. Gadolinium chloride blocks alcohol-dependent liver toxicity in rats treated chronically with intragastric alcohol despite the induction of CYP2E1. *Molecular Pharmacology* 51(1997) 944–950.
- Slaughter, T.N.; Paige, A.; Spires, D.; Kojima, N.; Kyle, P.B.; Garrett, M.R. et al. Characterization of the development of renal injury in Type-1 diabetic Dahl salt-sensitive rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 305(2013) 727–734.
- Fki, I.; Sahnoun, Z.; Sayadi, S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 624–31.
- Bouaziz, M.; Hammami, H.; Bouallagui, Z.; Jemai, H.; Sayadi, S. Production of antioxidants from olive processing by-products. *Electronic journal of environmental, agricultural and food chemistry* 7(2008) 3231–3236.
- Chung, H.Y.; Yoro, M.K.; Kawagishi, H. Characteristics of water-soluble polysaccharide, showing inhibiting activity on α -glucosidase, in *Cordyceps militaris*. *Food Science and Biotechnology* 18(2009) 667–671.
- Adisakwattana, S.; Charoenlertkul, P.; Yibchok-Anun, S. α -Glucosidase inhibitory activity of cyanidin-3- galactoside and synergistic effect with acarbose. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 24(2009) 65–69.
- Jemai, H.; Fki, I.; Bouaziz, M.; Bouallagui, Z.; El Feki, A.; Isoda, H.; Sayadi, S. Lipid-Lowering and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Its Triacetylated Derivative Recovered from Olive Tree Leaves in Cholesterol-Fed Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(2008) 2630–2636.
- Fki, I.; Bouaziz, M.; Sahnoun, Z.; Sayadi, S. Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. *Biorganic and Medicinal Chemistry* 13(2005) 5362–70.
- Priore, P.; Cavallo, A.; Gnoni, A.; Damiano, F.; Gnoni, G. V.; Siculella, L. Modulation of hepatic lipid metabolism by olive oil and its phenols in nonalcoholic fatty liver disease. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 67(2015) 9–17.
- Rincon-Cervera, M.A.; Valenzuela, R.; Hernandez-Rodas, M.C.; Maramba, M.; Espinosa, A.; Mayer, S. et al. Supplementation with antioxidant-rich extra virgin olive oil prevents hepatic oxidative stress and reduction of de saturation capacity in mice fed a high-fat diet: Effects on fatty acid composition in liver and extrahepatic tissues. *Nutrition* 32(2016) 1254–1267.

25. Daglaa, I.; Benakia, D.; Baira, E.; Lemonakisb, N.; Poudyalc, H.; Brownd, L.; Tsaropoulouse, A.; Skaltsounisb, A.L.; Mikrosa, E.; Gikasa, E. Alteration in the liver metabolome of rats with metabolic syndrome after treatment with Hydroxytyrosol. A Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance-based metabolomics study. *Talanta* 178(2018) 246-257.

Please cite this Article as:

Messaoudi D., Bouallagui Z., Henab A., Moulti-Mati F., Protective effect of olive mill wastewater against lipid metabolism perturbation induced in cafeteria diet fed rats, ***Algerian J. Env. Sc. Technology*, 5:2 (2019) 930-936**