

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE UNIVERSITE MOULOU MAMMARI DE TIZI-OUZOU FACULTE DES
SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'études
Pour l'obtention du diplôme de Master II
en sciences biologiques

Option : Biochimie Appliquée

Thème

*Evaluation de l'effet d'un extrait éthanolique de feuilles
d'olivier sur la viabilité et l'adhérence des polynucléaires
neutrophiles humains*

- **Réalisé Par : HAMDANI Lisa**
HADJ-SAID Dihia
- **Dirigé par : M^{me} BEDOUHENE-FENANE Samia**
- **Soutenu devant le jury composé de :**

Présidente	: M ^{me} SI AHMED-ZENNIA Saliha	Maitre de conférence, B	UMMTO.
Examinatrice	: M ^{me} SENANI-OULARBI Nassima	Maitre assistante, A	UMMTO.
Examinatrice	: M ^{me} GHEZALI-SENOUSSI Chahra	Maitre assistante, A	UMMTO.

Année universitaire 2017/2018



*Notre mémoire a été réalisé au sein du laboratoire de biochimie à l'université de Mouloud Mammeri, sous la direction de **M^{me} BEDOHENE-FENANE S.** maitre de conférence, que nous tenons à remercier pour avoir accepté de diriger, avec beaucoup de patience, ce sujet de mémoire de fin de cycle, pour la disponibilité, la confiance, les conseils et le soutien moral qu'elle a su nous apporter*

*On remercie aussi vivement les **membres du jury** d'avoir accepté d'évaluer notre travail*

*Nous tenons également à remercier le professeur **A. MATI**, directeur du laboratoire LABAB pour toutes les conditions de travail et le matériel qu'il a pu nous conférer afin de réaliser notre projet, et aussi sur les connaissances et les conseils qu'il nous a transmis au cours de notre formation.*

*Nous voudrions remercier le professeur **K. HOUALI** qui nous a ouvert les portes de son laboratoire et nous a accueilli en toute joie ainsi que toute son équipe de recherche pour leur gentillesse et leur soutien.*

*Aussi, nous remercions toute l'équipe du laboratoire LABAB qui a contribué à la réalisation de notre mémoire de près ou de loin notamment **M^{me} L. BOUADJLA**, ingénieur de soutien à la recherche qui était toujours à notre disposition.*

*Un grand merci à **HIBA, ZAZI, KIKI, ZAAZI, MELISSA, AMINE, CHERIF, SMAIL**, qui nous ont beaucoup aidés.*

*Toute la reconnaissance, le remerciement et le respect à Madame **HAMEG**, chef de service du laboratoire d'analyses médicales au sein de la polyclinique de Draa Ben Khedda pour son soutien et tout ce qu'elle a pu nous conférer pour la réalisation de notre mémoire.*



Dédicace

Dieu merci

Je dédie ce travail :

A Mon Cher Papa

Aucune expression ne peut traduire le noble sentiment que j'ai à ton égard, Pour toutes les peines et tous les sacrifices que tu as consentis pour mon éducation, pour l'amour que tu m'as toujours porté, tu m'as appris à me battre jusqu'au bout pour réussir, je n'ai été guidée jusqu'à présent que par le désir de t'honorer et te rendre fière, « ta boutchoura est enfin arrivé là où tu voulais ».

Je te dédie ce travail en témoignage de ma grande reconnaissance et mon grand Amour.

A Ma Chère Maman

Les mots me manquent pour exprimer toute ma reconnaissance pour tout ce que tu as fait pour mon bonheur et ma réussite. Que Dieu te protège et t'accorde le bonheur, la santé et la longue vie. Pour ton grand amour, ta tendresse et tes longues prières qui m'ont été le meilleur gage de réussite, je t'offre ce travail.

A mon adorable petit frère Samy et petite sœur Inès

Vous étiez

toujours là pour me réconforter, me faire rire et m'encourager dans les moments de doute. Tous les mots ne suffiraient pas... Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre amour si pur, ce modeste travail doit vous servir d'exemple pour réussir et faire mieux que votre grande sœur ; Je vous aime.

A mes précieux amis Zazi, Amine et Kiki

Qui ont toujours répondu présent aux moments où j'avais besoin d'eux, qui ont su m'épauler, me pousser dans mes choix, et qui

m'encouragent toujours à aller plus loin. Sans vous je ne serai pas arrivée jusque-là. Comme on dit « les amis sont la famille que l'on choisit » et j'ai de la chance de vous avoir.

A la mémoire de ma regrettée grand-mère « yemma fatma » que dieu t'accueille dans son vaste paradis ; et à ma grand-mère MAMATI que dieu te garde pour moi

A mon cher binôme et ami Dihia qui a partagée avec moi cette expérience.

Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.



Lisa



Dédicace

Mes chers parents

Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte. Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur. Ma promesse pour vous c'est d'être toujours à la hauteur.

*Mes deux prunelles **MASSINISSA** et **ALI***

Mes frères chéris, vous m'avez toujours soutenu et cru en moi. Vous étiez et vous restiez mon soutien dans la vie Je vous aime très fort là ou vous êtes toujours.

*À la mémoire de mes **grands-parents paternels** que dieu les accueille dans son vaste paradis, et à mes **grands-parents maternels**,
Dieu les protège et les garde pour moi*

*À mes sœurs du cœur **HIBA**, **ZAHIA** et **KAHINA**.*

À toutes mes tantes et oncles paternels et maternels qui m'ont toujours aimé et gâté, et ont été une fierté pour moi.

*À ma nouvelle famille, les **KHEDACHE** : Mon beau-père et ma belle-mère auxquels je dois tout le respect, à mes belles-sœurs et mes beaux-frères.*

*À mon **binôme LISA**, Tu as su toujours m'écouter et placer les bonnes choses dans les bons endroits, sans toi rien ne serai ainsi.*

A toutes mes copines qui sont toujours près du cœur même si loin des yeux parfois

À toi ma moitié, ma vie et mon amour.

***MOURAD**, depuis que je t'ai connu, tu n'as pas cessé d'être derrière moi à m'encourager me guider et me soutenir, de ta confiance et de ton amour que je tiens ma force. **MERCI MON MARI**.*



Dihia

RESUME

Les neutrophiles sont des cellules originaires de la moelle osseuse libérées dans la circulation sanguine après maturité. Ils migrent vers les sites infectieux en réponse à des signaux chimiotactiques, induisant une inflammation. Cependant les réponses excessives de ces cellules peuvent provoquer des dommages aux tissus avoisinants. L'organisme est doté d'un système endogène protecteur capable de neutraliser les FROs potentiellement dangereux. Dans l'objectif de renforcer ce système et réparer ses défaillances, nombreux sont les travaux qui sont orientés vers la phytothérapie. Dans ce contexte l'olivier et ses dérivés « fruits, huile et feuilles » restent les plus utilisées. En effet, des études récentes montrent que les feuilles d'olivier pourraient être utilisées en tant que source naturelle de composés bioactifs, en particulier, les composés phénoliques ayant un large éventail d'activités biologiques. L'abondance des neutrophiles dans la circulation sanguine et leurs multiples propriétés font de ces derniers un modèle cellulaire de choix afin d'étudier l'effet d'un extrait éthanolique de feuilles d'olivier en particulier sur la viabilité et l'adhérence de celles-ci. Ces cellules ont été fraîchement isolées à partir de sang frais en utilisant la méthode du Dextran/Ficoll basée sur la séparation des cellules en fonction de leur densité. La cytotoxicité des feuilles d'olivier a été évaluée par la méthode d'exclusion du bleu de trypan et l'adhérence par l'utilisation de boîtes de Pétri. Une mortalité des PNs avoisinant les 40% a été constatée qui serait probablement due à la complexité de l'extrait, alors qu'il n'a pas eu d'effet significatif sur l'adhérence de PNs.

Mots clés : polynucléaires neutrophiles, feuilles d'olivier, polyphénols, cytotoxicité, adhérence.

ABSTRACT

Neutrophils are bone marrow cells that are released into the bloodstream after maturity. They move to infectious sites in response to chemotactic signals, inducing inflammation. However, excessive responses of these cells can cause damage to nearby tissues. The organism has a protective endogenous system capable of neutralizing the potentially dangerous (ROS). In order to strengthen this system and repair these deficiencies, many works are oriented towards herbal medicine. In this context the olive tree and its derivatives "fruits, oil and leaves" remain the most used. Indeed, recent studies show that olive leaves could be used as a natural source of bioactive compounds, in particular, phenolic compounds having a wide range of biological activities. The abundance of neutrophils in the bloodstream and their multiple properties prompted us to choose this cell model in order to study olive leaf extract, particularly on the viability and adhesion of these. These cells were freshly isolated from fresh blood using the dextran / ficoll method based on the separation of cells according to their density. The cytotoxicity of olive leaves was evaluated by the trypan blue exclusion method and the adhesion by the use of Petri dishes. We report that a mortality of the PNs was around 40% probably to the complexity of the extract, whereas it did not have a significant effect on the adhesion of PNs even at high concentrations.

Key words: neutrophils, olive leaves, polyphenols, cytotoxicity, adhesion.

TABLE DES MATIERES

	Page
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Liste des abréviations	
Introduction	01
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Les polynucléaires neutrophiles	
1. La physiologie des polynucléaires neutrophiles	02
2. Origine et formation des polynucléaires neutrophiles	03
3. La maturation des PNs et apparition de granules cytoplasmiques	04
4. Les propriétés des polynucléaires neutrophiles	05
4.1. Le chimiotactisme	05
4.2. La mobilité	06
4.3. L'adhérence et la migration	06
4.4. La diapédèse	07
5. Les fonctions effectrices des polynucléaires neutrophiles	08
5.1. La phagocytose	08
5.2. La bactéricide	09
5.2.1. La dégranulation	09
5.2.2. L'explosion oxydative	10
5.2.3. La bactéricide médiée par les filets extracellulaires	11
6. Le mécanisme de mort cellulaire	12
7. Les mécanismes de défense antioxydant	13
7.1. Les antioxydants enzymatiques	13
7.2. Les antioxydants non enzymatiques	14
8. Le stress oxydatif et les dysfonctionnement du neutrophile	14
8.1. Le stress oxydatif	14
8.2. Les dysfonctionnements du neutrophile	15

II. Les extraits de feuilles d'olivier

1. La description de l'olivier et de ses feuilles	16
2. La composition chimique des feuilles d'olivier	16
3. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier	17
4. Les intérêts des extraits de feuilles d'olivier	19

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Matériel et méthodes	20
1.1. Matériel	20
1.2. Méthodes	21
1.2.1. La préparation des solutions	21
1.2.2. Le protocole expérimental d'isolement des neutrophiles	21
1.2.3. Le dénombrement des PNs au bleu de trypan	24
1.2.4. L'évaluation de l'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur la viabilité des PNs	25
1.2.5. La mise en évidence de l'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur l'adhérence des PNs	25

RESULTATS ET DISCUSSION

1. L'isolement et dénombrement des polynucléaires neutrophiles	27
2. L'effet de l'extrait de feuille d'olivier sur la viabilité des neutrophiles	28
3. L'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur l'adhérence des polynucléaires neutrophiles	31

CONCLUSION	35
-------------------	-----------

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des figures

Figure 1	Morphologie d'un neutrophile vue sous microscopie électronique.	p2
Figure 2	Origine et différenciation hématopoïétique des cellules sanguines.	p3
Figure 3	Les différentes étapes du recrutement des neutrophiles sur les sites inflammatoires.	p7
Figure 4	Les étapes de la phagocytose.	p9
Figure 5	Métabolismes des Formes réactives de l'oxygène.	p11
Figure 6	Arsenal antimicrobien des polynucléaires neutrophiles.	p12
Figure 7	Morphologie de l'olivier et de ses feuilles.	p17
Figure 8	Structure chimique de l'oleuropéine.	p19
Figure 9	Les étapes de purification des neutrophiles.	p23
Figure 10	Cellule de MALASSEZ préparée pour observation sous microscope.	p24
Figure 11	Schéma montrant le comptage avec une cellule de MALASSEZ sous microscope photonique au grossissement X 40.	p24
Figure 12	Boîtes de pétri contenant les cellules, l'extrait à différentes concentrations, et l'HBSS.	p26
Figure 13	Morphologie des cellules sanguines révélées au cristal violet sous microscope photonique au grossissement X 100.	p27
Figure 14	Morphologie des PNs isolés, révélés avec le cristal violet vue sous microscope photonique	p28
Figure 15	Observation sous microscope photonique des PNs morts et vivants dilués au bleu de trypan sous microscope photonique au grossissement X40 en présence d'extrait de feuilles.	p29
Figure 16	Effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur la viabilité des PNs.	p30
Figure 17	Effet des extraits de feuilles d'olivier sur l'adhérence des neutrophiles.	p32
Figure 18	PNs adhérents traités à l'extrait de feuilles d'olivier à concentrations croissantes observés sous microscope inversé au grossissement X40.	p33

Liste des tableaux

Tableau I	Principaux chimioattractants.	p5
Tableau II	Antioxydants enzymatiques endogènes.	p14
Tableau III	Conséquences de la production excessive des FROs sur les macromolécules.	p16
Tableau IV	Composition chimique globale des feuilles d'olivier.	p18
Tableau V	Données qualitatives et quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait de feuilles d'olivier.	p19

Liste des annexes

ANNEXE 1	Aspect morphologique de la phagocytose médiée par les immunoglobulines (A), et par les molécules C3b du complément (B).
ANNEXE 2	Classification des polyphénols.
ANNEXE 3	Appareillages utilisés au cours de la pratique.
ANNEXE 4	Poids moléculaires des différentes molécules chimiques composants le PBS.
ANNEXE 5	Résultat statistique du test de cytotoxicité réalisés par ANOVA prisme.
ANNEXE 6	Les structures chimiques des principales familles de flavonoïdes.
ANNEXE 7	Résultat statistique du test sur pouvoir d'adhérence réalisée par ANOVA prisme.
ANNEXE 8	Structure chimique du tannin.
ANNEXE 9	Structure chimique de l'acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque).

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Cat	Catalase
CD	Cluster de differentiation
CSF	Colony stimulating factor (Facteur de stimulation des colonies)
CSH	Cellule souche hématopoïétique
EDTA	EthyleneDiaminete Traacetic Acid (acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique)
EPO	Érythropoïétine
FLT-3	Fms-like tyrosine kinase 3
FRO	Forme réactive de l'oxygène
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor (Facteur de stimulation des colonies granulocytaire)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage stimulating factor (Facteur de stimulation des colonies granulocytaires et macrophages)
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Globule rouge
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution (Solution saline équilibrée de Hanks)
HOCl	Acide hypochloreux
ICAM	Intercellular adhésion molecule (molecule d'adhésion intercellulaire)
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
INF	Interféron
LPS	Lipopolysaccharide

LT	Leucotriène
M-CSF	Monocyte colony stimulating factor (Facteur de stimulation des colonies monocytaires)
MPO	Myélopéroxydase
NADPH	Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate
NET	Neutrophil extracellular trap (piège extracellulaire)
O₂^{·-}	Anion superoxyde
PAF	Platelet activity factor (Facteur d'activité plaquettaire)
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffer saline (tampon phosphate salin)
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (molécule d'adhésion des cellules endothéliales et des plaquettes)
PGM	Progéniteur granulocyte-monocyte
PLC	Progéniteur lymphoïde commun
PM	Progéniteur multipotant
PME	Progéniteur mégacaryocyte-érythrocyte
PN	Polynucléaire neutrophile
PRR	Pattern recognition receptor
PS GL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
SCF	Stem cell factor (facteur de croissance des cellules souches)
SDF	Stromal cell-derived factor (facteur dérivé des cellules stromales)
SOD	Superoxyde dismutase
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1 (Facteur de croissance transformant beta 1)
TLR	Toll like receptor
TPO	Thyroperoxydase
TNF	Tumor necrosis factor (Facteur de nécrose tumoral)

A decorative frame with a grey border and rounded corners. A grey ribbon with a 3D effect is draped across the frame, passing behind the text. The word "Introduction" is centered within the frame.

Introduction

Les polynucléaires neutrophiles (PNs) acteurs majeurs de l'inflammation, sont des cellules essentielles dans l'immunité innée. Sous l'influence de différents chimioattractants, ces cellules patrouillent la circulation sanguine, phagocytent les pathogènes et les éliminent. Les neutrophiles meurent par apoptose.

Les dysfonctionnements des neutrophiles peuvent être à l'origine de diverses pathologies. Leur absence expose l'organisme à des infections répétées résultantes de la prolifération de bactéries et de champignons sur les sites lésés. En contrepartie, leur accumulation et suractivation dans le cas de maladies auto-immunes ou de réactions inflammatoires exagérées peut générer des molécules de haute potentialité toxique tels que les espèces réactives de l'oxygène. Afin de compenser les défaillances des mécanismes endogènes de l'organisme dans ces situations, les recherches scientifiques se sont dirigées vers l'usage de plantes médicinales, notamment l'olivier et ses dérivés qui semblent être des candidats prometteurs.

Les produits de l'olivier en particulier l'huile d'olive sont utilisés à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Par ailleurs, les feuilles d'olivier ne cessent de faire l'objet de recherches scientifiques en raison de leurs nombreuses vertus pour la santé.

Certains composés identifiés dans les extraits de feuilles d'olivier, tels que les composés phénoliques à savoir l'oleuropéine, l'acide gallique, et les flavonoïdes, sont doués d'activités biologiques extrêmement intéressantes notamment leurs pouvoirs antioxydants et leurs pouvoirs anticancéreux.

L'application des extraits végétaux sur le plan sanitaire nécessite une évaluation rigoureuse, en particulier leur toxicité vis-à-vis des cellules humaines. Malgré l'existence de plusieurs travaux réalisés "*in vitro*" sur l'activité biologique des extraits de feuilles d'olivier et leurs composés, le nombre de travaux publiés concernant une application de ces composés dans le domaine médicale reste négligeable.

L'objectif de ce travail est de mettre au point la technique d'isolement des polynucléaires neutrophiles humains à partir d'un sang frais, tester la cytotoxicité de l'extrait de feuilles d'olivier à différentes concentrations et déterminer leurs effets sur l'adhérence des neutrophiles.



Partie

Bibliographique



**Les polynucléaires
neutrophiles**

1- La physiologie des polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNs) sont des cellules à noyau polylobé appartenant à la lignée des granulocytes en raison de leurs nombreuses granulations au niveau de leur cytoplasme. Ils ont été décrits pour la première fois par Paul Ehrlich au tournant des années 1900 (WITKO-SARSAT et *al.*, 2000).

Morphologiquement, le neutrophile montré sur la figure 1 présente une forme arrondie ayant entre 10 à 14 μm de diamètre, avec un noyau formé de plusieurs lobes (2 à 5 lobes) réunis par de fins étranglements, plus au moins bien individualisés (EDWARDS, 1994). Le PN est la cellule la plus abondante avec environ 50 à 70% des globules blancs circulants (GOLDSBY et *al.*, 2001).

Chez l'homme, le renouvellement quotidien des neutrophiles est d'environ 1.6×10^9 cellules/kg de poids corporel, soit environ 10^{11} neutrophiles/jour (WALKER et WILLEMZE, 1980). Ce taux de renouvellement important est lié au flux sortant continu et unilatéral de ces cellules hors de la circulation (WEISS, 1989).

La demi-vie des PNs dans le sang est courte allant de 6 à 10h ; elle peut être prolongée en cas d'intrusion d'un pathogène, afin que ces derniers migrent vers les tissus infectés (QUINN et *al.*, 2004). En absence d'une inflammation, ils meurent spontanément par apoptose. En présence de site inflammatoire, différents stimuli y sont libérés induisant une attraction rapide et massive des PNs du sang circulant ainsi que la prolongation de leur durée de vie (GOUGEROT-POCIDALO et HURTADO- NEDELEC, 2011).

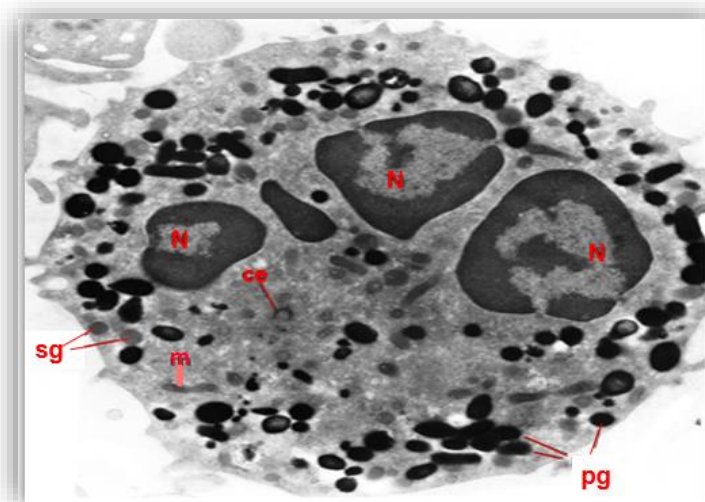


Figure 1 : Morphologie d'un neutrophile vu sous microscopie électronique : pg : granule primaire, sg : granule secondaire, N : noyau, Ce : centriole, m : mitochondrie. D'après WITKO-SARSAT et *al.*, 2000.

2- Origine et formation des polynucléaires neutrophiles

Comme toutes les cellules sanguines, les PN sont produits dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH), et libérés dans la circulation au terme d'une série d'étapes de détermination, de maturation, et de différenciation (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000).

Sous le contrôle des signaux extracellulaires et des facteurs de croissance qui l'entourent, les CSHs se différencient en un progéniteur multipotent (PM) qui lui-même donnera soit les progéniteurs lymphoïdes communs (PLCs) menant à la formation des lymphocytes B et T soit les progéniteurs myéloïdes communs (PMCs) menant à la formation des monocytes, des macrophages et des neutrophiles (ROSENBERG et GALLIN, 1999). La figure ci dessous illustre les étapes de différenciations aboutissant à la formation des cellules sanguines.

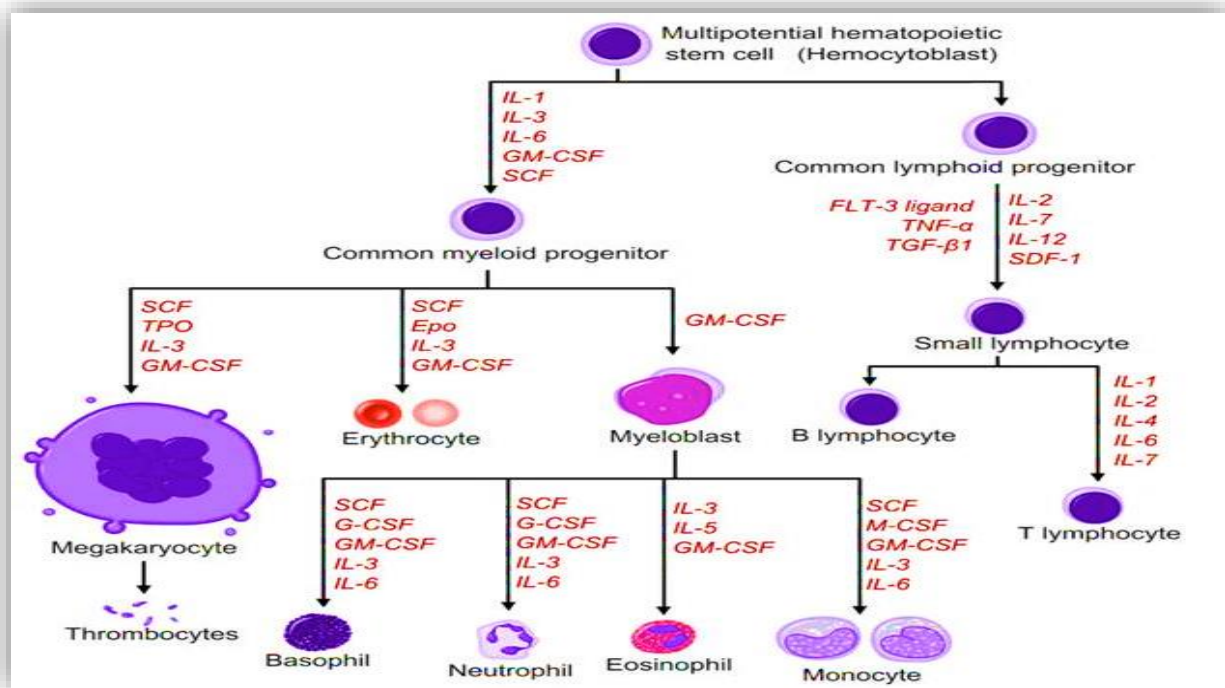


Figure 2 : Origine et différenciation hématopoïétique des cellules sanguines, d'après DAVOUST, 2015.

La myélopoïèse qui distingue la production de monocytes et de granulocytes dont les PNs, représente les deux tiers de l'activité hématopoïétique de la moelle osseuse sachant que le facteur de transcription PU.1 est absolument indispensable à l'établissement de la lignée myéloïde.

Les PMCs ont la capacité de se développer en progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes (PMEs), et en progéniteurs granulocytes-monocytes (PGMs).

La différenciation de la lignée granulocytaire et monocyttaire est médiée par des facteurs de croissance (CSF) : le G-CSF pour les polynucléaires neutrophiles et le M-CSF pour les monocytes/macrophages (WITKO-SARSAT, 2012).

Les cellules orientées vers la lignée granulocytaire passent successivement par différents stades de différenciation : myéloblaste, promyélocyte, myélocyte puis métamyélocyte avant de donner les PN matures (BJERREGAARD, 2003).

3- La maturation des PN et apparition de granules cytoplasmiques

Les granules apparaissent à l'étape de la maturation du PN, étape marquée par la transition du myéloblaste au promyélocyte (BAINTON et FARQUHAR, 1966 ; BAINTON *et al.*, 1971). Dès lors, la synthèse des protéines granulaires se poursuivra jusqu'à l'étape finale de la maturation (BORREGAARD *et al.*, 2007). On distingue alors 4 types de granules :

- **Les granules primaires ou azurophiles** : sont les granules les plus grands (0,3µm de diamètre) présents dans les PN (NUSSE ET LINDAU, 1988). Ils apparaissent en premiers au stade promyélocyte. Ils contiennent des hydrolases acides, des protéases neutres, et des substances qui jouent un rôle majeur dans la bactéricidie (myéloperoxydase (MPO), lysozyme, protéine cationique, et défensines) et dans la réaction inflammatoire (élastase et divers enzymes lysosomiales) (WITKO-SARSAT, 2012). Ces granules sécrètent leurs contenus en fusionnant avec le phagosome pour détruire les microorganismes (FAURSCHOU et BORREGGARD, 2003).
- **Les granules secondaires ou spécifiques** : sont des organites de taille inférieure à celle des granulations azurophiles (environ 0,2 /µm) apparaissant au stade myélocyte (BOXIO, 2005). Ces granules ne contiennent pas de MPO, mais sont riches en substances antimicrobiennes (lysozyme et lactoferrine) (SORENSEN *et al.*, 1999). Ils contiennent également des molécules essentielles aux fonctions des neutrophiles telles que CD11b/CD18, le cytochrome b245, et une collagénase, enzyme capable d'hydrolyser les protéines de la matrice extracellulaire, participant ainsi à la migration des polynucléaires neutrophiles vers le site inflammatoire (WITKO-SARSAT, 2012).

- **Les granules tertiaires** : apparaissent au stade métamyélocyte, et regroupe un ensemble de granules hétérogènes qui se distinguent des précédents par leur contenu en gélatinase et une réserve de récepteurs membranaires (KANG *et al.*, 2001).
- **Les vésicules sécrétoires** : apparaissent plus tardivement en fin de maturation, elles sont générées par endocytose et caractérisées par leur contenu en albumine (PERRIN, 2009). Ces vésicules morphologiquement très hétérogènes sont facilement mobilisables à la membrane plasmique et jouent un rôle essentiel dans les fonctions d'adhésion et de migration du PN (FAURSCHOU et BORREGAARD, 2003).

4- Les propriétés des polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles demeurent les acteurs principaux des premières étapes de la réaction inflammatoire nécessaire à la défense anti-infectieuse. Ce rôle privilégié par rapport aux autres cellules est lié à leur capacité de chimiotactisme, de migration, d'adhésion, et de diapédèse :

4-1- Le chimiotactisme

Sous l'effet d'un gradient de substances chimioattractantes (Tableau I) émises par les molécules étrangères à l'organisme ou par les cellules lésées, la plupart des PN franchissent la barrière de l'endothélium vasculaire pour s'y rendre, migrant au travers les tissus, vers le site inflammatoire : c'est le chimiotactisme (GOUGEROT-POCIDALO, 2002).

Tableau I : Principaux chimioattractants. D'après GOUGEROT-POCIDALO, 2002.

Dérivés des protéines bactériennes	N-formyl-méthionyl peptides
Protéines dérivées du complément	C5a
Produits cellulaires après stimulation	PAF, Dérivés de l'acide arachidonique, cytokines (chimiokines) : IL-8, GRO, NAP-2.

4-2- La mobilité

Les PN_s stimulés pour la locomotion perdent leur forme sphérique de repos pour prendre une forme allongée polarisée indispensable à la migration orientée. Puis ils se déplacent par des mouvements complexes et répétitifs en étendant un pseudopode dans la direction du gradient chimiotactique plaçant le noyau à l'arrière de la cellule, et en rétractant simultanément un uropode postérieur. La polymérisation des monomères d'actine "globulaire" (actine G) en filaments d'actine (actine F) est essentielle à cette mobilité (WITKO-SARSAT, 2012).

4-3- L'adhérence et la migration

En plus des médiateurs inflammatoires, d'autres molécules dites d'adhésion exprimées d'une part par les PN_s, et d'autre part par les cellules endothéliales coopèrent avec ceux-ci pour assurer la migration des PN_s vers le site inflammatoire.

La première étape de migration fait intervenir une adhérence réversible de faible affinité des PN_s aux cellules endothéliales, par l'intermédiaire des sélectines : L sélectines à la surface des PN_s, P et E sélectines à la surface des cellules endothéliales activées par des médiateurs provenant du foyer inflammatoire (la thrombine, l'histamine et les cytokines "d'alarme" telles que IL1, le TNF α et l'endotoxine (GOUGEROT-POCIDALO et HURTADO-NEDELEC, 2011). Ceux-ci augmentent l'expression des E et P-sélectines à la surface des cellules endothéliales (MOSER *et al.*, 1989).

Les Liaisons médiées par les sélectines ralentissent le flux des PN_s, elles sont faibles permettant ainsi la transition entre l'attachement et le détachement du neutrophile aux cellules endothéliales. Ce phénomène aboutit au « roulement » ou « rolling » tout le long de l'endothélium (JANEWAY *et al.*, 2001).

Si, durant cette première étape, le leucocyte est en contact avec des produits bactériens tels que les peptides formyles (fMLP), lipopolysaccharides (LPS) ou tout autre produit pro inflammatoire (LTB₄, IL-8, fragments du complément), il entre alors dans une étape d'activation (GOLDSBY *et al.*, 2001). Cette phase induit la perte des L sélectines par coupure protéolytique due à l'activation d'une métalloprotéase, et l'augmentation de l'expression membranaire par dégranulation de β 2 intégrines activées, en particulier CD11b/CD18. Les β 2 intégrines activées se lient aux molécules d'adhérence ICAM exprimées à la surface des cellules endothéliales (WITKO-SARSAT, 2012).

4-4- La diapédèse

L'action médiée par la $\beta 2$ intégrine activée produit une adhérence de forte affinité et non réversible qui arrête le roulement et consolide l'ancrage du PN à l'endothélium, grâce au réarrangement du cytosquelette autour de la partie intra cytosolique de ces molécules, permettant la traversé de la couche des cellules endothéliales : c'est la transmigration ou diapédèse (WOODFIN et *al.*, 2010).

En collaboration avec le neutrophile, les cellules endothéliales desserrent leurs jonctions et offrent au leucocyte des ligands (JAM) de substitution pour ses intégrines $\beta 2$, en plus des interactions homophiles des molécules PECAM-1 et CD99 lui permettant de progresser à travers l'endothélium vers la matrice pour aller exercer ses fonctions sur les agents étrangers (BOUAOUINA et HALBWACHS-MACAIELLI, 2006). La figure 3 montre les étapes de migration d'un neutrophile.

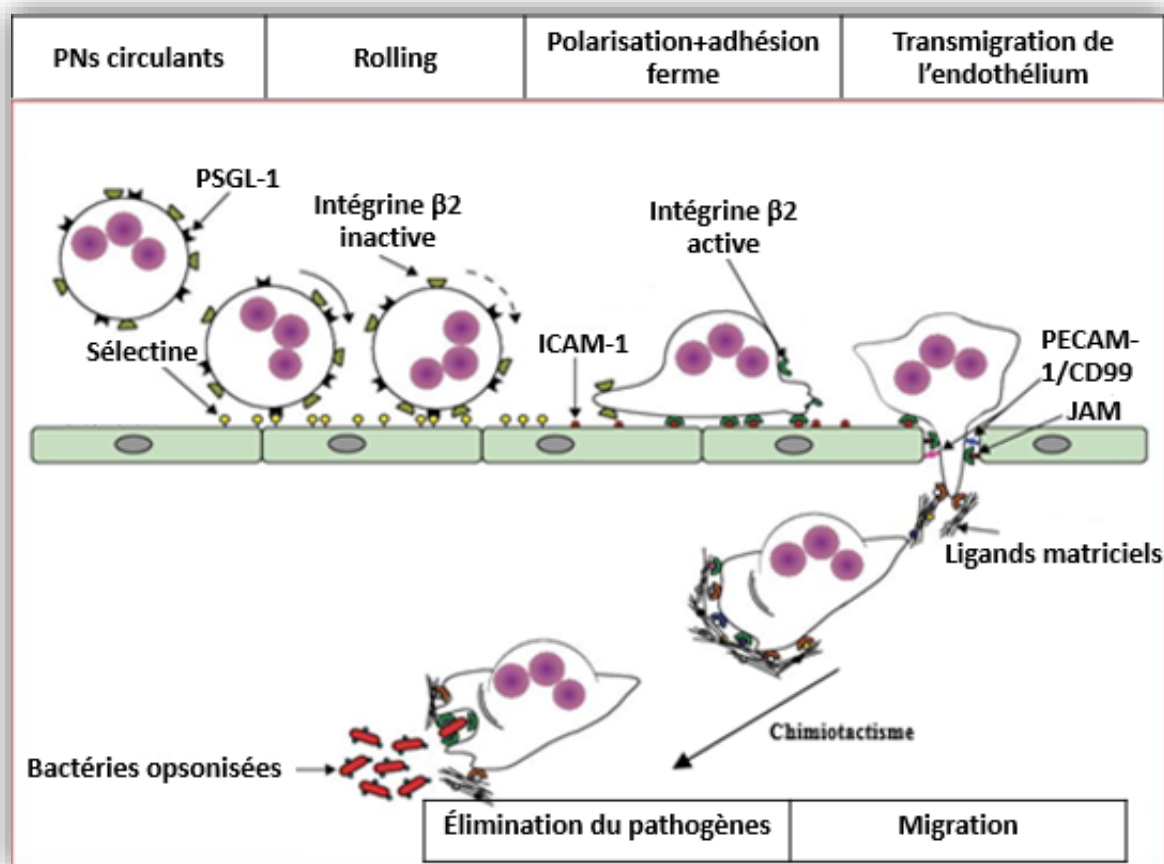


Figure 3 : Les différentes étapes du recrutement des neutrophiles sur les sites inflammatoires. D'après BOUAOUINA et HALBWACHS-MACAIELLI, 2006.

5- Les fonctions effectrices des polynucléaires neutrophiles

En réponse à différents stimuli, les neutrophiles exercent des fonctions essentielles pour l'organisme :

5-1- La phagocytose

Parvenus sur le site infectieux, les PN ont pour mission de reconnaître les bactéries, les ingérer et les tuer. Le processus de phagocytose proprement dit comporte deux étapes : l'adhésion du phagocyte à la particule, suivie de l'ingestion du pathogène (figure 4).

- Reconnaissance et adhérence du neutrophile au pathogène :

Arrivés au contact de l'agent pathogène, les PN reconnaissent leur cible de manière spécifique ou non spécifique :

La reconnaissance non spécifique est possible grâce aux *pattern recognition receptors* (PRR) qui vont se lier à des motifs moléculaires conservés au cours de l'évolution des micro-organismes : les *pathogène-associated molecular patterns* (PAMP). Les PRRs incluent les *toll like receptors* (TLRs) qui détectent de nombreux motifs microbiens dérivés de bactéries ou de virus (MEDZHITOV, 2007). L'adhérence spécifique entre le PN et sa cible est facilitée par les opsonines, particulièrement les immunoglobulines G (IgG1 et IgG3), et les protéines du complément dérivé du C3 (GRONDAHL et al., 2001 ; KOBAYASHI et al., 2005) qu'il peut reconnaître grâce à des récepteurs spécifiques situés à sa surface (GOUGEROT-POCIDALO, 2002).

- L'englobement et l'ingestion du pathogène :

L'ingestion du pathogène se fait grâce à la formation du phagosome, qui débute par l'invagination de la membrane plasmique en contact avec la particule à phagocyter et se termine par la projection de celle-ci en pseudopode qui englobe complètement la particule (HERANT et al., 2006).

En effet, lors d'une phagocytose médiée par des Ig, des pseudopodes cellulaires englobent la particule, alors que lorsqu'il s'agit d'une opsonisation par la molécule C3b, il n'y a pas d'émission de pseudopodes cellulaires mais plutôt un enfoncement de la membrane. Ces modèles supposent que la particule soit complètement recouverte par les opsonines (KAPLAN, 1977). Ce processus d'adhérence qualifié de "Zipper model" est illustré dans l'annexe 1.

Une fois formé, le phagosome rentre dans une phase de maturation qui conduit à la formation du phagolysosome. Après la fusion avec les diverses granulations des PN tous ces événements permettent une destruction optimale de l'agent pathogène (VIEIRA *et al.*, 2002).

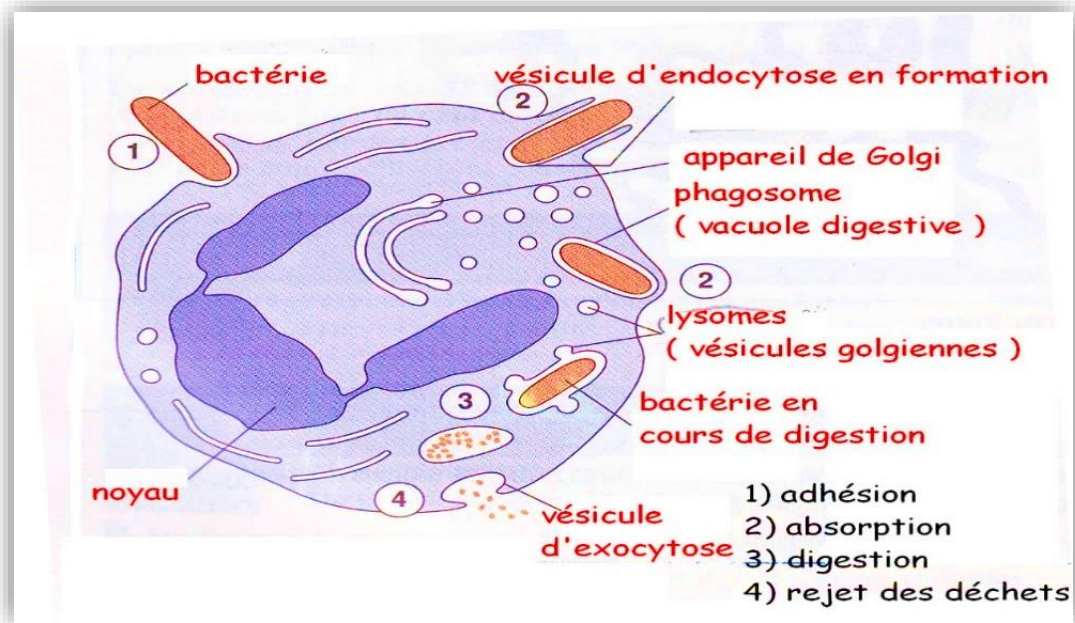


Figure 4 : Les étapes de la phagocytose. D'après FLANNAGAN *et al.*, 2012.

5-2- La bactéricidie

Lors de l'internalisation des pathogènes dans la vacuole phagocytaire, une séquence coordonnée d'événements a lieu menant à l'activation du système bactéricide. Deux grands types de mécanismes interviennent de façon coopérative : d'une part les mécanismes de dégranulation indépendant de l'oxygène conduisant au déversement de substances bactéricides dans le phagosome, et d'autres par la production de FROs par activation d'un système enzymatique mené par la NADPH oxydase (RUSSO-MARIE *et al.*, 1998) :

5-2-1- La dégranulation :

La capacité des cellules à détruire les micro-organismes dans des conditions d'anaérobioses montre l'existence de mécanismes bactéricides indépendants de l'oxygène. La dégranulation en fait partie (LEW, 1998). Elle a lieu parallèlement avec l'explosion respiratoire (RUSSO-MARIE *et al.*, 1998). Ce système met en jeu la libération de protéines microbicides à activité protéolytique. L'acidification de la vacuole de phagocytose favorise la destruction des micro-organismes par l'action de molécules effectrices déversées lors de la fusion des granules avec

la membrane du phagosome. Les PN peuvent dégranuler sous l'action de substances appelées « sécrétagogues » (WITKO-SARSAT, 2012).

Après stimulation du PN par la présence de calcium (Ca^{2+}), une hiérarchie de libération des granules s'opère en réponse à des concentrations élevées de Ca^{2+} . L'ordre de libération est le suivant : vésicules sécrétoires > granules tertiaires > granules secondaires > granules primaires (SENGELOV *et al.*, 1993).

L'exocytose de chacun des types de granules s'effectue de façon séquentielle. Les premiers granules à décharger leur contenu sont les granules spécifiques et les granules tertiaires. Les granules spécifiques assurent la disponibilité du cytochrome b558, constituant majeur de la NADPH oxydase, quant aux granules tertiaires, ils permettent d'avoir une migration efficace vers le site inflammatoire, et facilitent le recrutement d'autres neutrophiles grâce à leur réserve de récepteurs et de métalloprotéases. (FAURSCHOU et BORREGAARD, 2003).

Finalement, alors que la concentration en sécrétagogues augmente, c'est au tour des granules primaires de se décharger, Ils fusionnent de manière prédominante avec la membrane de la vacuole phagocytaire pour détruire les micro-organismes ingérés à l'aide d'un arsenal enzymatique, entre autres, de la MPO (CHERTOV *et al.*, 2000).

Les vésicules sécrétoires possèdent une variété de récepteurs membranaires nécessaires aux étapes précoces d'activation des neutrophiles et à l'adhésion ferme sur l'endothélium activé (FAURSCHOU et BORREGAARD, 2003).

5-2-2- L'explosion oxydative

Lorsqu'ils sont stimulés, les PN produisent de façon extrêmement rapide des formes réactives de l'oxygène qui exercent une activité bactéricide puissante. Ce phénomène est appelé explosion oxydative (GOUGEROT-POCIDALO, 1997).

La NADPH oxydase comprend plusieurs sous-unités distinctes, présentes sur la membrane plasmique, sur la membrane des granules spécifiques, et dans le cytoplasme. L'assemblage des différents constituants de ce complexe enzymatique se fait lors de la phagocytose (EDWARDS, 1994).

Une fois activée, la NADPH oxydase produit une quantité importante d'anions superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot -}$) par une réduction monovalente de l' O_2 en utilisant le NADPH cellulaire qui sert de

donneur d'électrons. Ce radical est à l'origine de nombreuses autres FROs de réactivité variables (figure 5) (HAMPTON et *al.*, 1998).

Le $O_2^{\cdot-}$ peut subir une réaction spontanée de dismutation en présence de la superoxyde dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (TOUSSAINT, 2008). Ce dernier réagit avec l' $O_2^{\cdot-}$ donnant ainsi le radical hydroxyle ($\cdot OH$) au cours de la réaction de Haber-Weiss. Cette réaction est lente, sauf quand elle est catalysée par le fer selon la réaction de Fenton (O'DOWD, 2004).

La fusion des granules spécifiques avec les granules azurophiles contenant la MPO est à l'origine de nouvelles FROs, notamment l'acide hypochloreux (HOCl) formé à partir d' H_2O_2 en présence de Cl^- (KARLSSON et DAHLGREN, 2002).

Avec les lipides membranaires, le HOCl forme des amines chlorés et des chlorhydrines et perturbe la perméabilité des membranes (CARR et *al.*, 1998). En oxydant les structures hémiques, il altère de nombreuses fonctions enzymatiques, notamment celles de la chaîne respiratoire entraînant une mort bactérienne (ROSEN et KLEBANOFF, 1985 ; RAKITA et *al.*, 1990).

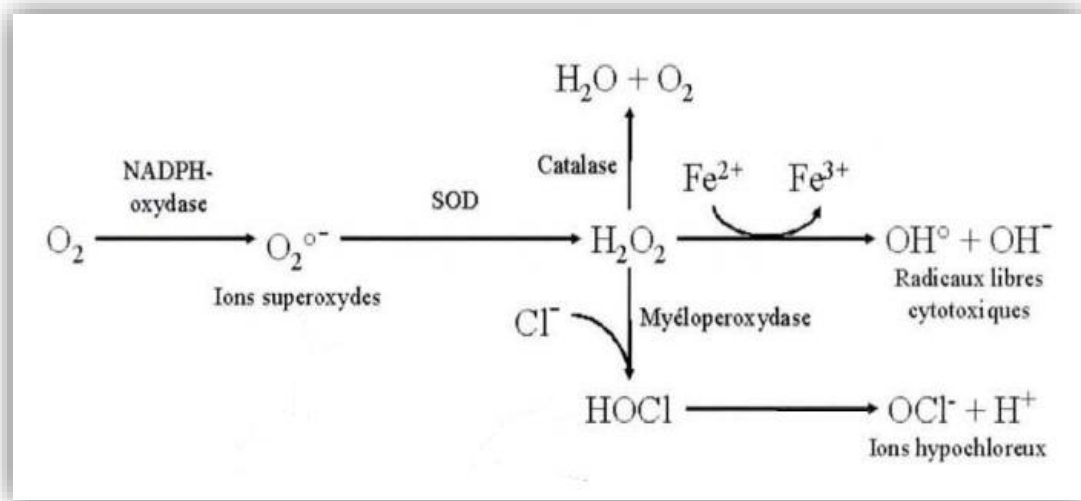


Figure 5 : Métabolismes des Formes réactives de l'oxygène. D'après DELBOSC et *al.*, 2001.

5-2-3- La bactéricidie médiée par les filets extracellulaires

Les PN sont également dotés d'un autre mécanisme de défense dit « *Neutrophil Extracellular Traps* ou NETs ». Ce système est basé sur la production dans le milieu extracellulaire d'un ensemble de fibres composées de protéines et d'ADN susceptibles de détruire les toxines et les bactéries (BRINKMANN et *al.*, 2004). Ils permettent d'augmenter l'efficacité microbicide des

PNs sur les pathogènes, puisqu'ils pourraient ainsi agir sur ces derniers présents dans leur environnement mais non englobés et poursuivre leur lutte antimicrobienne post mortem (GOUGEROT-POCIDALO et HURTADO-NEDELEC, 2011).

Ces différentes fonctions sont illustrées dans la figure 6.

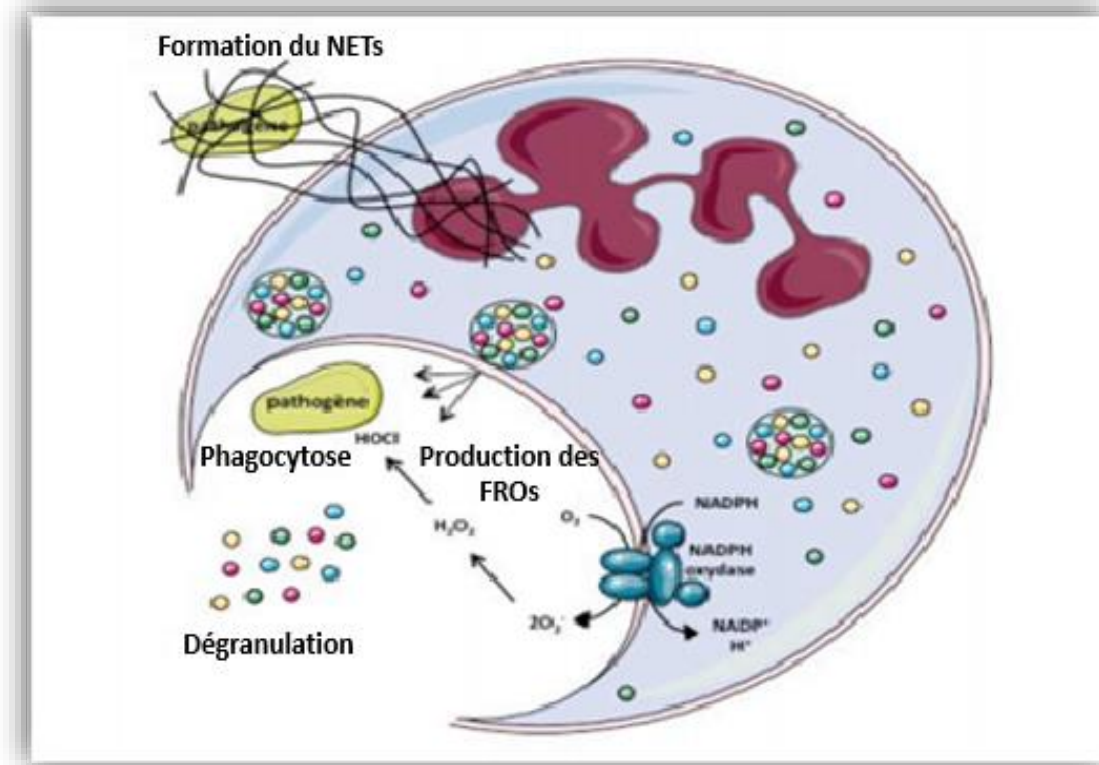


Figure 6 : Arsenal antimicrobien des polynucléaires neutrophiles. D'après FOURNIER et PARKOS, 2012.

6- Le mécanisme de mort cellulaire

Les fonctions des PNs sont régulées par le mécanisme de mort cellulaire programmée ou l'apoptose. Ce dernier assure un équilibre entre leurs fonctions effectrices et leur renouvellement contrôlé vue le danger potentiel des molécules qu'ils libèrent. L'apoptose constitue donc un processus nécessaire pour le maintien de l'homéostasie cellulaire dans des conditions physiologiques (FIEVEZ *et al.*, 2005).

Après avoir quitté la moelle osseuse, les PNs patrouillent dans le flux sanguin. L'absence de cytokines générant des signaux de survie dans la circulation, limite leur durée de vie (WEBB *et al.*, 2000). C'est pourquoi en absence d'inflammation, les PNs sénescents sont éliminés par apoptose passive (voie intrinsèque) au niveau de la moelle osseuse ou du foie (SURATT *et al.*, 2001). Lors d'une infection, les PNs migrent vers les tissus en direction du site inflammatoire,

après élimination de l'agent pathogène, la réponse s'autolimité, ceci implique la diminution de l'accumulation des PN dans le site inflammatoire et l'induction d'une apoptose retardée (voie extrinsèque) (SCHWAB *et al.*, 2007 ; SERHAN *et al.*, 2008). Ces deux voies apoptotiques nécessitent l'activation d'une cascade de caspases déclenchant le programme de mort cellulaire (MAIANSKI *et al.*, 2004). Les neutrophiles inactifs, vont alors être phagocytés par les macrophages (RAVICHANDRAN et LORENZ, 2007).

7- Les mécanismes de défense antioxydant

Les systèmes antioxydants de l'organisme mettent en œuvre des mécanismes complexes pour neutraliser, inhiber, et contrôler les niveaux des FROs, afin de les maintenir à un taux non cytotoxique. Ces systèmes peuvent être enzymatiques ou non (DROGE, 2002).

7-1- Les antioxydants enzymatiques

Les systèmes de défense enzymatique sont reconnus comme étant les plus performants, Les principales enzymes antioxydantes sont citées dans le tableau ci-dessous :

Tableau II : Antioxydants enzymatiques endogènes.

Enzymes	Fonctions	Références
La superoxyde dismutase (SOD)	<ul style="list-style-type: none"> - Métalloenzyme antioxydante "anti-O₂^{•-} ; - Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée (H₂O₂) : <p style="text-align: center;">SOD</p> $2 \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	ZELKO <i>et al.</i> , 2002.
La catalase (CAT)	<ul style="list-style-type: none"> - Catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ : <p style="text-align: center;">CAT</p> $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	GRISHAM et GRANGER, 1988.
Les glutathions peroxydases (GPx)	<ul style="list-style-type: none"> - Enzymes Sélénium (Se)-dépendante - Catalyse la réduction des H₂O₂ et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène <p style="text-align: center;">GSH</p> $\text{GPx}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$	HYARDAN <i>et al.</i> , 2008

7-2- Les antioxydants non-enzymatiques

Cette catégorie d'antioxydants peut être endogène ou apportée par l'alimentation :

Parmi les substances antioxydantes présentes dans l'organisme, il convient de citer la bilirubine, les groupes thiol-protéines, l'acide urique, l'albumine, les œstrogènes et surtout le glutathion réduit qui protège non seulement contre les FROs, mais aussi contre les peroxydes ou les monoxydes d'azote (BORS *et al.*, 2009).

En outre, les molécules antioxydantes exogènes, telle que la vitamine E (tocophérol), la vitamine C (ascorbate), l'ubiquinone et les caroténoïdes, agissent en piégeant les radicaux par liaison aux électrons célibataires afin de les transformer en molécules ou ions stables (KINSKY, 1989). Sachant que la vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes : les ascorbates réductases.

De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir les mêmes propriétés antioxydantes notamment les polyphénols et les alcaloïdes (FAVIER, 2003).

8- Le stress oxydatif et les dysfonctionnements du neutrophile

8-1- Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié, soit à une surproduction d'FROs, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante due aux carences alimentaires, ou aux mutations (FEVIER, 2003). Si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses (DEFRAIGNE et PINCEMAIL, 2008). Ainsi La production excessive de FROs provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) en agissant selon trois modes d'actions : en arrachant soit un électron, soit un atome d'hydrogène ou encore en s'additionnant sur les doubles liaisons (JACOB, 1995). Le tableau III montre les conséquences du stress oxydatif.

Tableau III : Conséquences de la production excessive des FROs sur les macromolécules

Macromolécules	Conséquences des FROs	Références
Les acides nucléiques (ADN)	<ul style="list-style-type: none"> - Perturbation des mécanismes de réplication d'ADN ; - Mutations ponctuelles dans le génome ; - Déclenchement du phénomène de mort cellulaire programmée (carcinogénèse) 	<ul style="list-style-type: none"> - CADET et <i>al.</i>, 2002 ; - FAVIER, 2003.
Les protéines	<ul style="list-style-type: none"> - Perte des propriétés biologiques ; - Sensibilité à l'action des protéases ; - Acquisition d'un caractère hydrophobe causant la formation de dépôts « lipofishines » responsables de l'accélération du vieillissement. 	<ul style="list-style-type: none"> - HUNT et WOLFF, 1991; - THANNICKAL et FANBURG, 2000; - FAVIER, 2003.
Les lipides	<ul style="list-style-type: none"> - Peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés formant la plaque d'athérosclérose. 	<ul style="list-style-type: none"> - ESTERBAUER et <i>al.</i>, 1992 ; - UNO et <i>al.</i>, 2010.
Les glucides	<ul style="list-style-type: none"> - Oxydation du glucose et libération des catoaldéhydes, H₂O₂, et OH[·] entraînant la coupure de protéines ou leur glycation. 	<ul style="list-style-type: none"> - FAVIER, 2003.

8-2- Les dysfonctionnements du neutrophile

Les neutrophiles ont pour rôle de défendre l'hôte contre diverses agressions., cependant tout dysfonctionnement de ces cellules peut conduire à plusieurs pathologies et une sensibilité accrue aux infections (BOXIO, 2005). Certains défauts qualitatifs sont la conséquence d'altérations fonctionnelles qui peuvent affecter les capacités liées à l'adhérence cellulaire ainsi que la bactéricidie, quant aux déficits quantitatifs ou neutropénies, ils désignent la diminution du nombre des PNs due à diverses mutations génétiques ou prises médicamenteuses (PAPADAKI et ELIOPOULOS, 2003).



Les feuilles d'olivier

1- La description de l'olivier et de ses feuilles

L'olivier est un arbre polymorphe, de taille moyenne, très rameux, au bois dur et dense. Il s'adapte aux conditions extrêmes de l'environnement ou sa résistance exige une intensité lumineuse importante et un sol aéré (GHEDIRA, 2008). Cet arbre est le seul arbre fruitier à feuilles persistantes d'une durée de vie de trois ans. Ces feuilles sont simples, lancéolées, pointues à pétiole court (figure 7). En moyenne, les feuilles d'olivier mesurent de 2 à 8 centimètres de long et de 0.5 à 1.5 centimètres de large (COXAM et *al.*, 2010).



Figure 7 : Morphologie de l'olivier et de ses feuilles.

2- La composition chimique des feuilles d'olivier

La composition chimique des feuilles d'olivier varie en fonction de nombreux facteurs : variété, conditions climatiques, époque de prélèvement, et âge des plantations (NEFZAOU, 1995). La matière organique est constituée principalement de polysaccharides (tel que cellulose, hémicelluloses), de monomères et polymères phénoliques, et de lipides. La teneur en protéine reste faible.

Tableau IV : Composition chimique globale des feuilles d'olivier (exprimé en g par 100 g)

Composition en %	GARCIA-GOMEZ <i>et al.</i> , 2003	MARTIN-GARCIA <i>et al.</i> , 2006	BOUDHRIOUA <i>et al.</i> , 2009	ERBAY <i>et ICIER</i> , 2009
Eau	nd	41,4	46,2- 49,7 a	49,8 a
Protéines	nd	nd	5,0-7,6 a	7,0 b
Lipides	6,2 b	3,2 b	1,0- 1,3 a	6,5 a
Minéraux	26,6 b	16,2 b	2,8- 4,4 a	3,6 b
Glucides	nd	nd	37,1- 42,5 a	27,5 a
Fibres brutes	nd	nd	nd	7,0 a
Cellulose	19,3 b	nd	nd	nd
Hémicellulose	25,4 b	nd	nd	nd
Lignine	30,4 b	nd	nd	nd
Polyphénols totaux	nd	2,5 b	1,3- 2,3 b	nd

a : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse fraîche des feuilles d'olivier.

b : correspond aux valeurs exprimées par rapport à la masse sèche des feuilles d'olivier.

nd : valeur non déterminée.

3- Les composés phénoliques des feuilles d'olivier

Les composés phénoliques sont définis comme des métabolites secondaires très intéressants pour la santé humaine grâce à leurs propriétés antioxydantes (annexe 2). La teneur en composés phénoliques dans les feuilles d'olivier varie de 2,8 mg/g MS (ALTIOK *et al.*, 2008) à 250 mg/g MS (MYLONAKI *et al.*, 2008).

Les composés phénoliques (monomères et polymères phénoliques) dans les feuilles d'olivier sont très divers et leurs structures sont très variables (AOUIDI, 2012). Les données quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait de feuilles d'olivier sont présentées dans le Tableau V.

Tableau V : Données qualitatives et quantitatives des principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait des feuilles d'olivier. D'après BENAVENTE-GARCIA et *al.*, 2000).

Composés phénoliques	Temps de rétention (min) en HPLC	Pourcentage d'abondance dans un extrait (%)	Activité antioxydante TEAC (mM)
Hydroxytyrosol	4,80	1,46	1,57
Tyrosol	5,83	0,71	0,35
Catéchine	8,41	0,04	2,28
Acide caféique	11,56	0,34	1,37
Acide vanillique	14,17	0,63	0,67
Vanilline	14,79	0,05	0,13
Rutine	17,22	0,05	2,75
Luteolin-7-glucoside	18,10	1,38	0,71
Verbascoside	20,06	1,11	1,02
Apigenin-7-glucoside	21,28	1,37	0,42
Diosmetin-7-glucoside	21,95	0,54	0,64
Oleuropéine	22,76	24,54	0,88
Lutéoline	28,61	0,21	2,25
Diosmetin	31,59	0,05	1,42
Extrait de feuille d'olivier			1,58

L'oleuropéine est un ester d'acide élénolique et de trycol hydroxylé et glycosylé d'une masse molaire de 539g/mol, se trouvant dans le fruit, la feuille, et l'écorce. Ce composé phénolique est le grand principe actif des feuilles d'olivier, il varie de 17% à 23% en fonction du temps et du lieu de récolte (SYED, 2010). Il est responsable du goût amer des feuilles, de l'huile et des olives non fermentées (DE LEONARDIS et MACCIOLA, 2010). La structure chimique de l'oleuropéine est illustrée dans la figure 8.

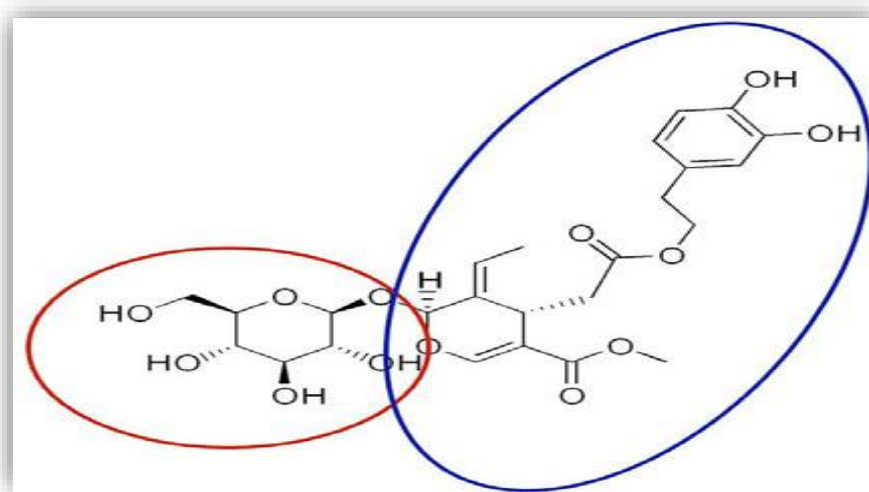


Figure 8 : Structure chimique de l'oleuropéine, montrant le glucose en rouge et l'oleuropéine aglycone en bleu. D'après De LEONARDIS et MACCIOLA, 2010.

4- Les intérêts des extraits de feuilles d'olivier

Depuis l'antiquité, les feuilles d'olivier sont employées en phytothérapie, ces feuilles et leur extrait font partie des plantes médicinales qui ont été et continuent à être étudiées.

Par leurs pouvoir antimicrobien et antiviral, les feuilles d'olivier peuvent être bénéfiques dans le traitement des infections causées par un virus, un rétrovirus, une bactérie ou un protozoaire tel que la grippe, le rhume, le VIH...etc. (SUDJANA et *al.*, 2009 ; BAO et *al.*, 2007).

Les feuilles d'olivier, contiennent des flavonoïdes, ces antioxydants aident à neutraliser les radicaux libres, prévenir et traiter l'hypertension et l'artériosclérose (AYDOGAN, 2008). Aussi ils leur procurent des propriétés anticancérigènes et radio-protectives (AOUIDI, 2012).

Par leurs effets sur certains enzymes métaboliques, les feuilles d'olivier possèdent des propriétés hypolipidimientes et sont aussi indiquées pour le traitement du diabète (CHERIF et *al.*, 1996).

L'intérêt thérapeutique des feuilles d'olivier a été corrélé, principalement, à sa teneur en oleuropéine. En effet des études différentes ont prouvé que ce composé phénolique possède une activité antioxydante (VISIOLI et *al.*, 1994 ; CONI et *al.*, 2000 ; ZBAKH et EL-ABBASSI, 2012), antimicrobienne (BISIGNANO et *al.*, 1999), anti-inflammatoire (PUEL et *al.*, 2006), hypoglycémique (AL AZZAWIE et ALHAMDANI, 2006), hypotensive (PANIZZI, 1960), hypolipidimiente (ANDREADOU et *al.*, 2006), anti-mycoplasmal (FURNERI et *al.*, 2002), immuno- modulateur (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et *al.*, 2006 ; BEDOUHENE et *al.*, 2017) et anti-tumeur (HAMDI et *al.*, 2005).

A decorative frame with a grey border and rounded corners. A grey ribbon is draped across the frame, with its ends extending to the left and right edges. The text is centered within the frame.

Partie

Expérimentale



Matériel
et
Méthodes

1- Matériel et méthodes

Le stage pratique a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de biochimie au sein de l'université de Mouloud Mammeri à Tizi Ouzou

1-1- Matériel

Appareils :

- Hotte à flux laminaire (BIOBASE) ;
- Microscope photonique (hund-WETZLAR) ;
- Microscope inversé (hund-WETZLAR) ;
- Centrifugeuse (SIGMA) ;
- Etuve (MAMMERT) ;
- Bain marie (MAMMERT) ;
- Balance de précision analytique (DENVER) ;
- Plaque chauffante (LABINCO) ;
- pH mètre.

Produits chimiques :

- Dextran T500 (2%) ;
- KH_2PO_4 ; KCl ; NaCl et $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$;
- Ficoll ;
- Colorant : bleu de trypan, cristal violet ;
- HBSS ;
- Éthanol.

Matériel biologique

- Du sang frais humain prélevé à partir de donneurs sains sur un anticoagulant « EDTA » ;
- Un extrait de feuilles d'olivier : préparé par madame BEDOUHENE en utilisant un système d'extraction composé de 70% d'éthanol avec sonication, en ayant macéré 10g

de poudre de feuilles dans 100ml de mélange éthanol/eau pendant 3H. L'éthanol est ensuite évaporé au speed vac, l'extrait prêt est conservé à -20°C.

1-2- Méthodes

1-2-1- La préparation des solutions

Solutions	Protocole de préparation
Ficoll et NaCl 0.9%	Prêt à l'emploi
Dextran 2%	La solution est préparée à 2% dans du NaCl 0.9%, puis filtrée à l'aide d'un micro-filtre de 0.22µm. Cette solution prête à l'utilisation est conservée à 4°C.
NaCl 1.8%	Dilution de NaCl (FLUKA) dans 250ml de NaCl 0.9%.
PBS	Diluer du KCl (2.68 mM) + Na ₂ HPO ₄ 2(H ₂ O) (8.10 mM) + KH ₂ PO ₄ (1.21 mM) + NaCl (0.14mM), dans 250 ml d'eau distiller, puis ajuster le pH à 7,4, fileter et conserver à 4°C.

Toutes les solutions doivent être à température ambiante avant utilisation, et manipulées sous hotte de façon stérile.

1-2-2- Le protocole expérimental d'isolement des neutrophiles

Avant de procéder à l'isolement des PNs, nous avons réalisé un frottis du sang total sur une lame de verre en utilisant le cristal violet afin de visualiser ses différentes composantes sous microscope photonique.

Le principe de la méthode d'isolement est basé sur la séparation des PNs des autres cellules sanguines par la technique Dextran/Ficoll grâce au phénomène de sédimentation par gradient de densité tout en apportant des optimisations des conditions de travail.

L'isolement des PNs (figure 9) commence par le mélange d'un volume de sang à un volume de Dextran T 500 2% stérile. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la majorité

des hématies précipitent, le surnageant contenant les globules blancs est donc récupéré et centrifugé à 400g pendant 12 minutes.

Le culot obtenu est suspendu dans un volume de tampon phosphate (PBS) égal au volume initial du sang, puis déposé sur un coussin de Ficoll et centrifugé pendant 30 minutes à 400g et à 15°C au lieu de 20°C pour s'échapper des contaminations monocytaires. Après cette étape, trois phases se distinguent : un culot correspondant aux PNs et hématies contaminantes, un anneau gris entre le culot et le surnageant contenant les lymphocytes et les monocytes et un surnageant formé d'un mélange de plasma, PBS et Ficoll.

La lyse des hématies contaminantes est réalisée par l'ajout d'eau distillée glacée au culot en mélangeant durant 30 secondes, suivie de l'ajout de NaCl 1.8%. Le volume initial est rétabli par l'ajout du PBS afin d'arrêter la réaction. Les PNs sont récupérés, après une centrifugation à 400g pendant 12 minutes, dans un petit volume de PBS puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

Récolte de sang à partir de donneurs sains sur un Anti coagulant (EDTA).

Ajout de Dextran 2% V/V
Incubation à température ambiante.

Récupération du surnageant.

+
Centrifugation (400g/12min/20°C).

Dépôt sur coussin de ficoll.

+
Centrifugation (400g/30min/15°C)

Lyse des hématies.

Élimination des hématies par centrifugation (400 g/12min).

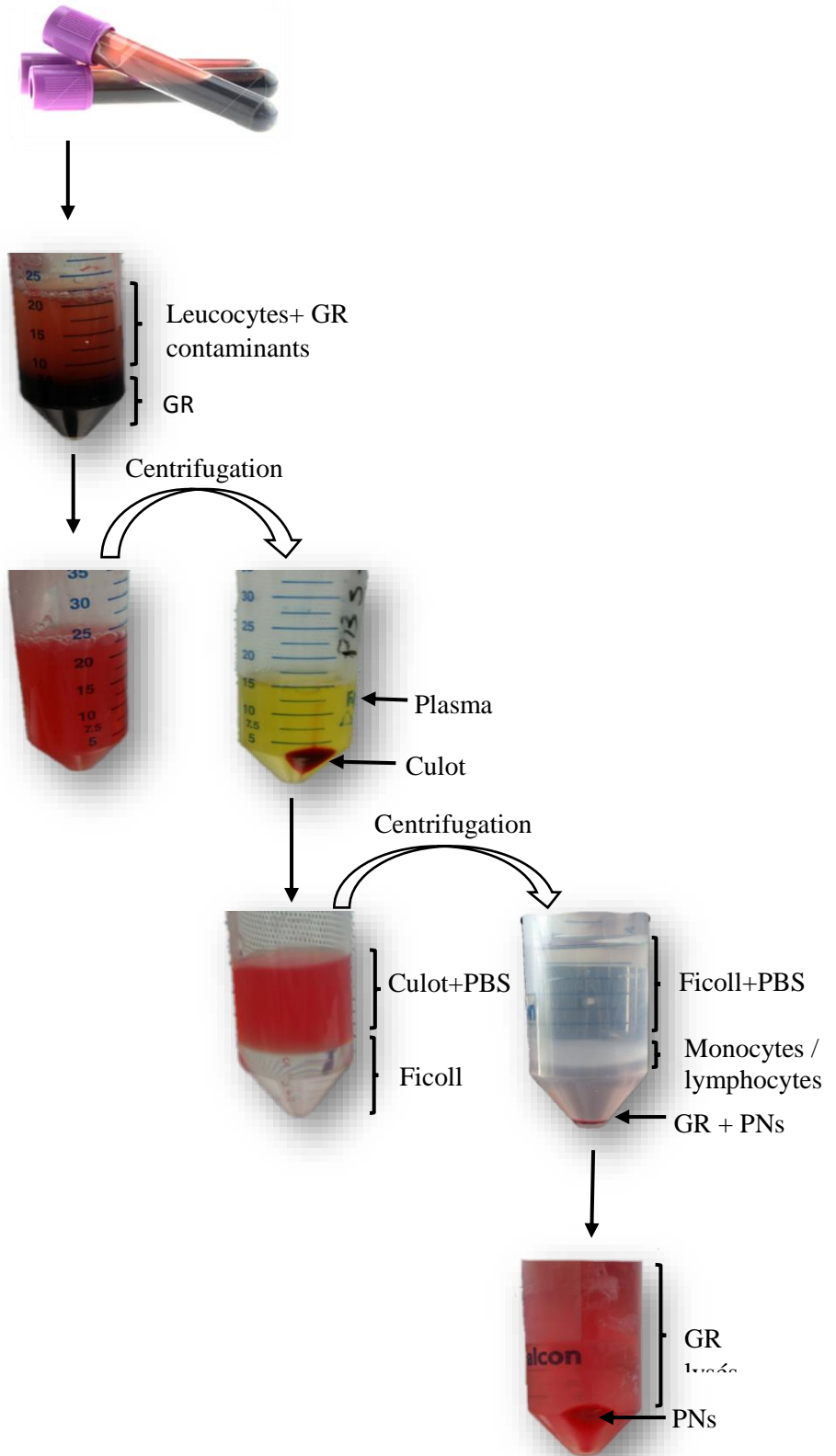


Figure 9 : Les étapes de purification des neutrophiles.

1-2-3- Le dénombrement des PNs au bleu de trypan

Le dénombrement des cellules est réalisé par la dilution d'un volume de PNs au PBS, et l'ajout du bleu de trypan. Ce mélange est déposé sur une cellule MALASSEZ (figure 10) afin de faire le comptage au microscope photonique.

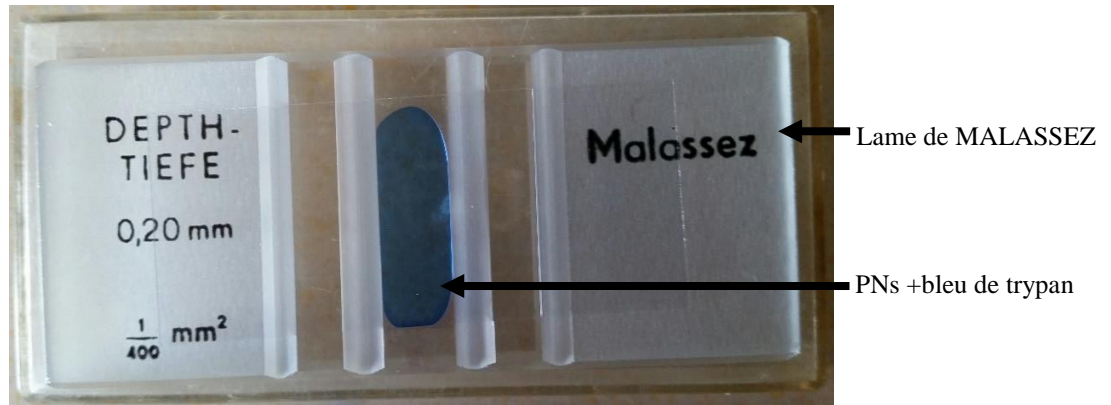


Figure 10 : Cellule de MALASSEZ préparée pour observation sous microscope.

Le dénombrement se fait en comptant les cellules vivantes non colorées, suite à l'exclusion du bleu de trypan hors du cytoplasme, en allant de gauche à droite (figure 11). Cette opération s'effectuera le long de trois lignes pour obtenir une moyenne, et appliquer la formule suivante :

$$N = n \times 10 \times 1000 \text{ (ml)} \times F \times V$$

N = nombre de PNs, **n** = moyenne des trois lectures, et **V** = volume total des PNs préparés.

F = facteur de dilution.

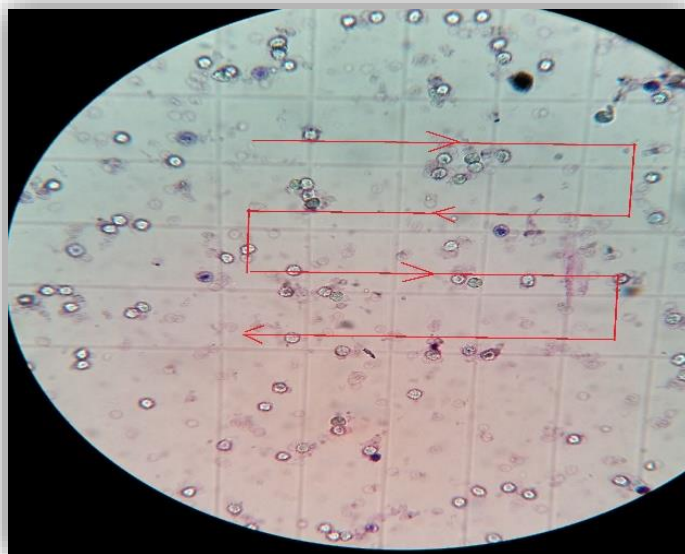


Figure 11 : Schéma montrant le comptage avec une cellule de MALASSEZ sous microscope photonique au grossissement X 40.

1-2-4- L'évaluation de l'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur la viabilité des PNs

Pour déterminer l'effet cytotoxique de l'extrait de feuilles d'olivier sur les PNs, nous avons préparé une série de solutions contenant : un volume (V_C) de cellules équivalent à 1 million, un volume de l'extrait correspondant aux dilutions souhaitées [0, 10, 20, 40, 80, 100] et un volume (V_P) de PBS pour avoir au final un total (V_t) de 500 μ l.

$$V_C = 10^6/N \times 1000 \quad \text{et} \quad V_P = V_t - (V_C + \text{Volume de l'extrait})$$

Les cellules mélangées à différentes concentrations de l'extrait sont ensuite incubées pendant 60 minutes dans un bain marie à 37°C.

Afin de nous affranchir des erreurs due à la présence de traces d'éthanol dans l'extrait après évaporation, nous avons prévu un contrôle à l'éthanol où les PNs ont été traité avec de l'éthanol seul et dans les mêmes conditions expérimentales.

L'effet cytotoxique est évalué en dénombrant sous microscope photonique les cellules mortes colorées au bleu de trypan se trouvant dans un champ de 100 cellules.

1-2-5- La mise en évidence de l'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur l'adhérence des PNs

Pour déterminer l'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur l'adhérence des PNs, les mêmes solutions que le test précédant sont préparées, puis incubées pendant une heure à 37°C dans un bain marie. Une fois l'incubation terminée les solutions sont déposées dans des boites Petri en polypropylène moins collant pour les cellules de 3,5 cm de diamètre (figure 12) auxquelles est ajouté 500 μ l d'HBSS contenant du magnésium et calcium nécessaires pour les PNs. Ces boites sont ensuite incubées pendant 60 minutes à 37°C dans une étuve.

Après incubation, le mélange est récupéré afin d'évaluer l'effet sur l'adhérence en dénombrant les cellules mortes et vivantes par la méthode d'exclusion au bleu de trypan, tout en observant les cellules adhérentes sur les boites sous microscope inversé.

Un contrôle à l'éthanol est également réalisé dans les mêmes conditions du test d'adhérence.

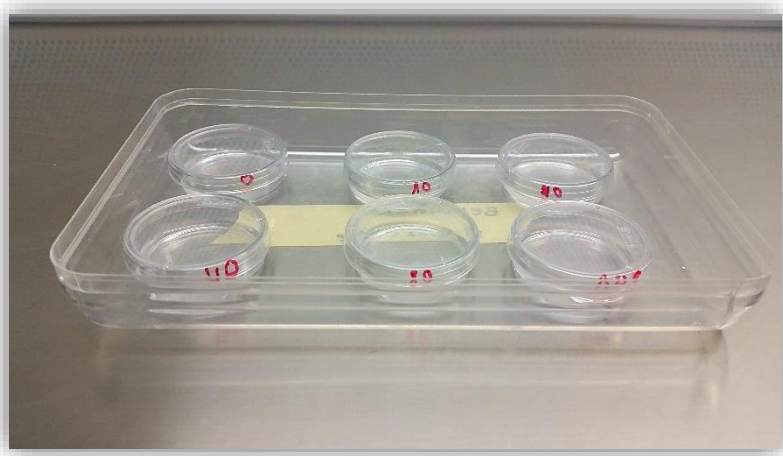


Figure 12 : Boites de Petri contenant les cellules, l'extrait à différentes concentrations, et l'HBSS.

Analyse statistique

Afin de vérifier l'effet observé des extraits sur la viabilité et l'adhérence des cellules, nous avons réalisé une analyse statistique en utilisant ANOVA Prisme. Une probabilité de 5% a été fixée comme étant significative.



Résultats

et

Discussion

1- L'isolement et le dénombrement des polynucléaires neutrophiles

Avant de procéder à isolement des neutrophiles, nous avons réalisé un frottis du sang total afin de visualiser ses différentes composantes représentées sur le figure 13.

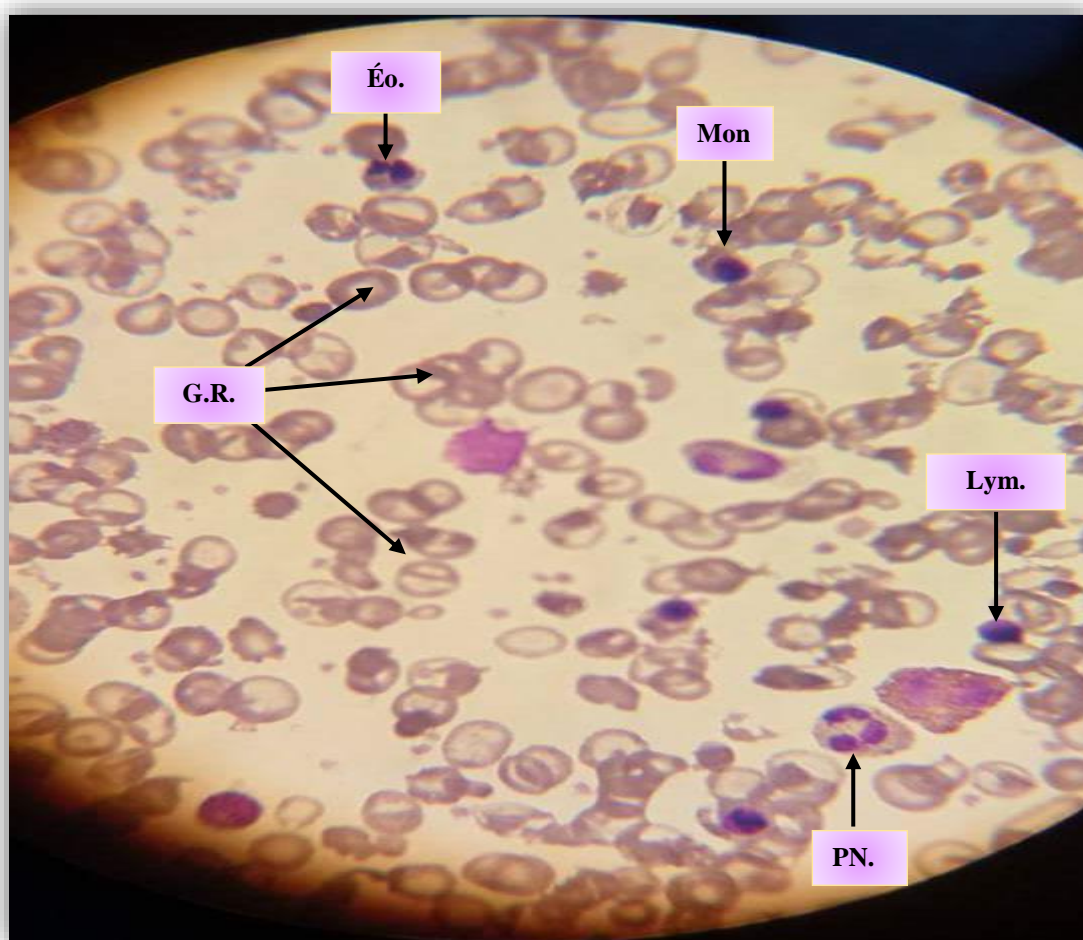


Figure 13 : Morphologie des cellules sanguines révélées au cristal violet sous microscope photonique au grossissement X 100. Éo. : Éosinophile ; Mono : Monocyte ; Lym : Lymphocyte ; PN : polynucléaire neutrophile ; G.R : Globule rouge.

À l'issue de l'isolement, les neutrophiles sont dilués au cristal violet qui permet de visualiser la forme du noyau et vérifier ainsi la pureté des cellules. Ces dernières sont observées sous microscope photonique et prises en photos comme montré sur la figure 14. L'examen de la pureté des cellules est assuré après chaque isolement.

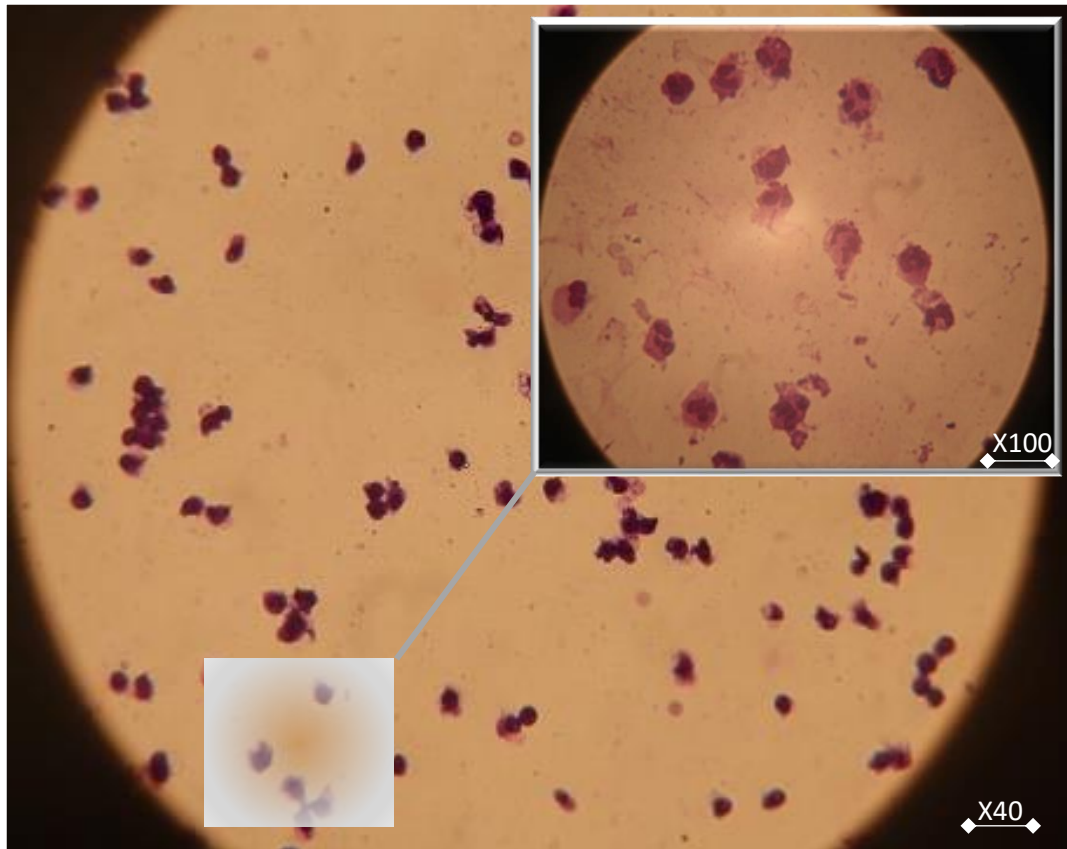


Figure 14 : Morphologie des PNs isolés, révélés au cristal violet vue sous microscope photonique.

2- L'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur la viabilité des neutrophiles

Le test de cytotoxicité a été réalisé en diluant les cellules au bleu de trypan avant de les observer au microscope photonique. Les neutrophiles morts apparaissent complètement colorés en bleu foncé suite à la pénétration irréversible du colorant, contrairement aux cellules vivantes qui restent non colorées (Figure 15).

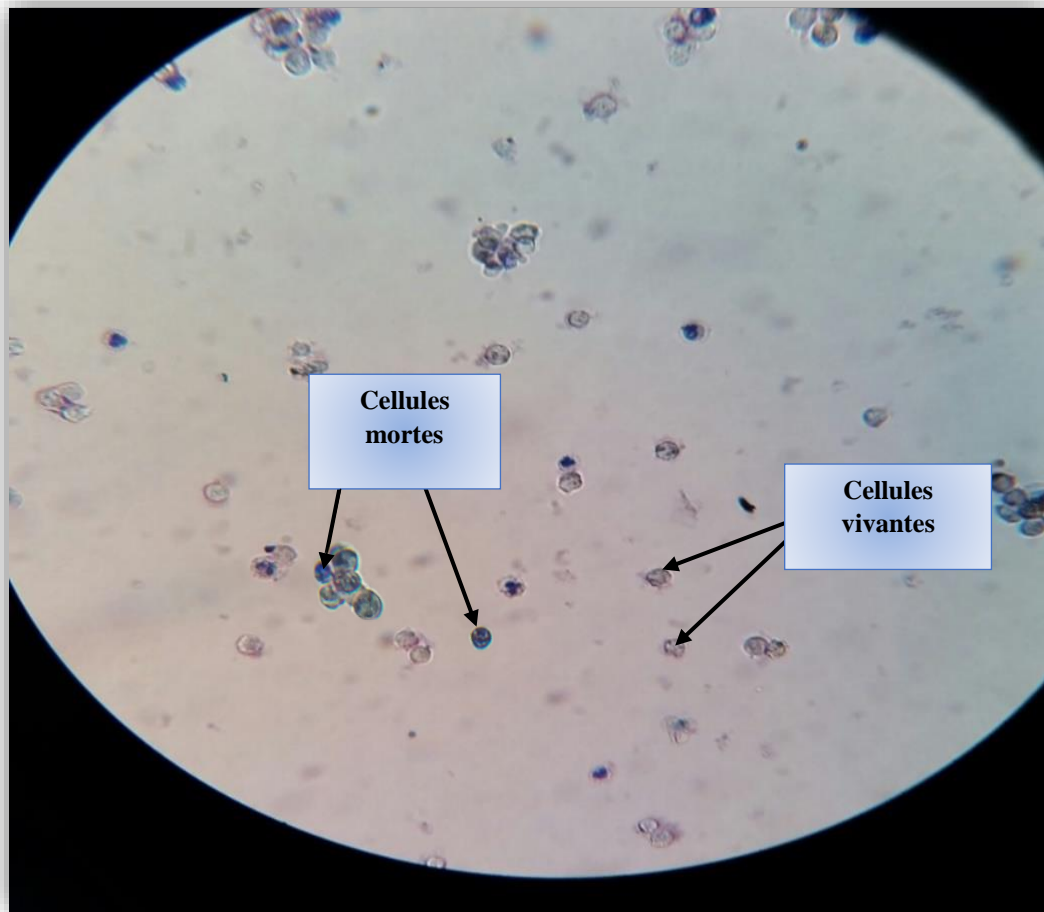


Figure 15 : Observation sous microscope photonique des PNs morts et vivants dilués au bleu de trypan sous microscope photonique au grossissement X40 en présence d'extrait de feuilles.

Après traitement des cellules à l'extrait de feuilles d'olivier, un dénombrement sur 100 cellules est effectué pour chaque échantillon, où nous comptant les PNs morts apparaissant en bleu foncé. Le nombre de cellules comptabilisées est représenté en pourcentage et reflète la moyenne de 4 répétitions.

L'effet de l'extrait de feuille d'olivier sur les neutrophiles sont représentés sur l'histogramme de la figure 16.

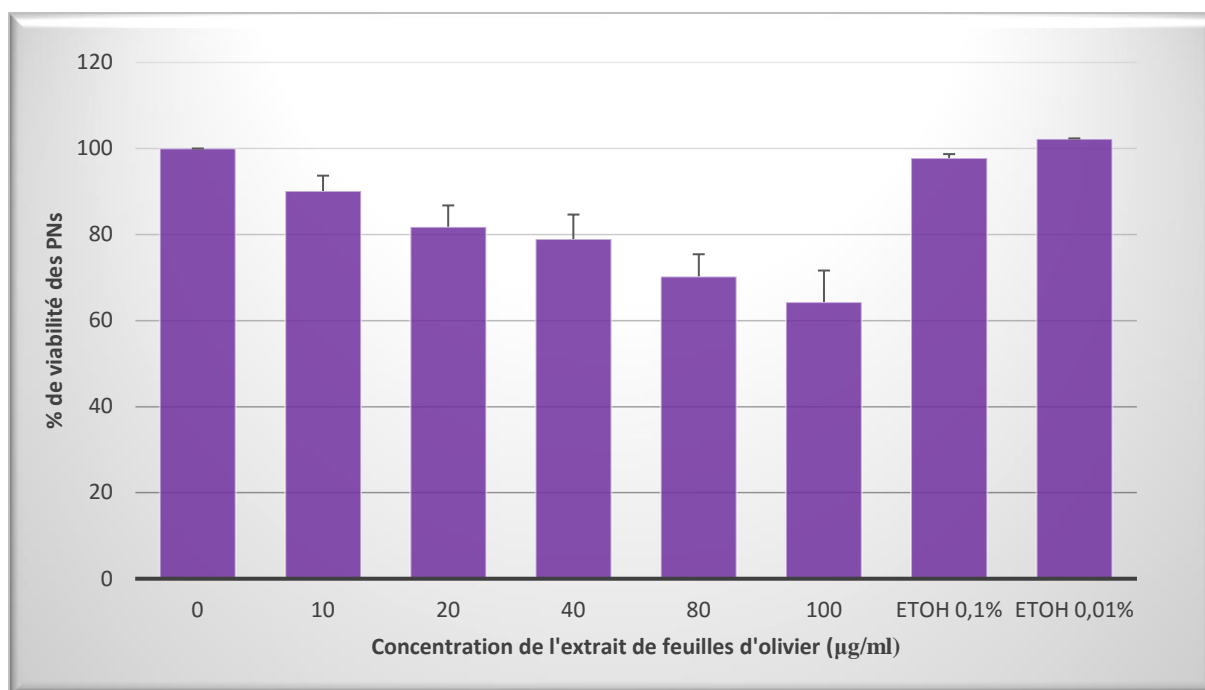


Figure 16 : Effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur la viabilité des PNs. Les neutrophiles ont été incubés avec des concentrations croissantes de l'extrait de feuilles d'olivier [0, 10, 20, 40, 80, 100 µg/ml] et de l'éthanol [0.1 %, 0.01%], pendant 60 min à 37°C. Le taux de viabilité est déterminé par dénombrement sous microscope photonique des cellules vivantes. Ce résultat représente la moyenne de quatre essais.

Les résultats montrent qu'en comparaison avec le contrôle négatif [0µg/ml], le nombre de PNs vivants diminue à mesure que les concentrations de l'extrait de feuilles d'olivier augmentent ; sachant qu'on atteint le maximum de mortalité cellulaire aux plus fortes concentrations [80 et 100 µg/ml] dont la mortalité des cellules avoisine les 40%. Du côté du contrôle à l'éthanol, où les cellules n'ont pas été traitées à l'extrait, nous n'avons pas eu de mortalité ce qui suggère que l'éthanol ne serait pas à l'origine de la cytotoxicité observée avec les cellules traitées à l'extrait.

D'après l'analyse statistique réalisée avec ANOVA Prisme (annexe 5), il s'est avéré que les résultats obtenus ne sont pas significatifs.

En effet, il existe une relation étroite entre la cytotoxicité et la composition en métabolites secondaires de l'extrait de feuilles d'olivier, Certains auteurs ont rapporté que les feuilles d'olivier sont plus riches en composés phénoliques bioactifs en comparaison à l'huile d'olive et aux fruits (CAPONIO et *al.*, 2001 ; LALAS et *al.*, 2011).

Selon l'étude phytochimique de feuilles d'*Olea europaea* menée par KASKOOS (2013), les extraits de ces feuilles sont composés de stérols, de tritérpènes, de quinones libres et de flavonoïdes notamment les flavones, flavonols, isoflavones, ...etc (annexe 6). Ceci est en accord avec l'étude de HIMOUR et *al.* (2016), qui confirme effectivement la présence d'une teneur importante en flavonoïdes, dont 7 types qui ont été mis en évidence parmi lesquels : Flavonols, Flavones (dont le 2-3-dihydroxylupinifoline et 4,5-dihydroxy-8-hydroxyméthyl-6,6- diméthylpyrano [2,3 :7,6] flavanone), Chalcones, Dihydroflavonols, Flavanones Dihydroflavonols, Isoflavones.

D'après nos résultats, l'extrait de feuilles d'olivier exerce un léger effet cytotoxique sur les PNs ce qui est montré par la diminution du pourcentage cellulaire en fonction de la dose. Ceci est probablement dû à l'action de certains types de flavonoïdes tel que les Flavones (2-3-dihydroxylupinifoline et 4,5-dihydroxy-8-hydroxyméthyl-6,6- diméthylpyrano [2,3:7,6] flavanone) doté d'un fort pouvoir cytotoxique sur les cellules cancéreuses tout en ayant une influence sur les cellules normales (MOREL, 2011 ; HIMOUR et *al.*, 2016).

3- L'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur l'adhérence des PNs

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur l'adhérence des neutrophiles, nous avons réalisé un test d'adhérence neutrophile, en présence d'HBSS, par l'ajout de concentrations croissantes de l'extrait de feuilles d'olivier.

Après incubation, les échantillons composés de cellules, d'extrait et d'HBSS présents dans les boîtes de Pétri sont aspirés pour un dénombrement, sous microscope photonique, des cellules non adhérentes qu'elles soient mortes ou vivantes en allant de gauche à droite. Cette opération s'effectuera le long de trois lignes pour obtenir une moyenne.

Un contrôle à l'éthanol est également préparé dans les mêmes conditions expérimentales que le test d'adhérence.

Bien que nous ayons constaté que le nombre de cellules adhérentes augmentait légèrement avec les concentrations de l'extrait de feuilles ajoutées, il peut différer entre les expériences en raison de divers facteurs qui rentrent en jeu tels que les variations entre donneurs (âge, sexe), la différence d'expression des récepteurs d'adhésion suite à une inflammation, et la sensibilité des neutrophiles vis-à-vis de l'extrait de feuilles d'olivier.

Le résultat du dénombrement est représenté en pourcentage reflétant la moyenne de 4 répétitions. Ceci est représenté sur l'histogramme de la figure 17.

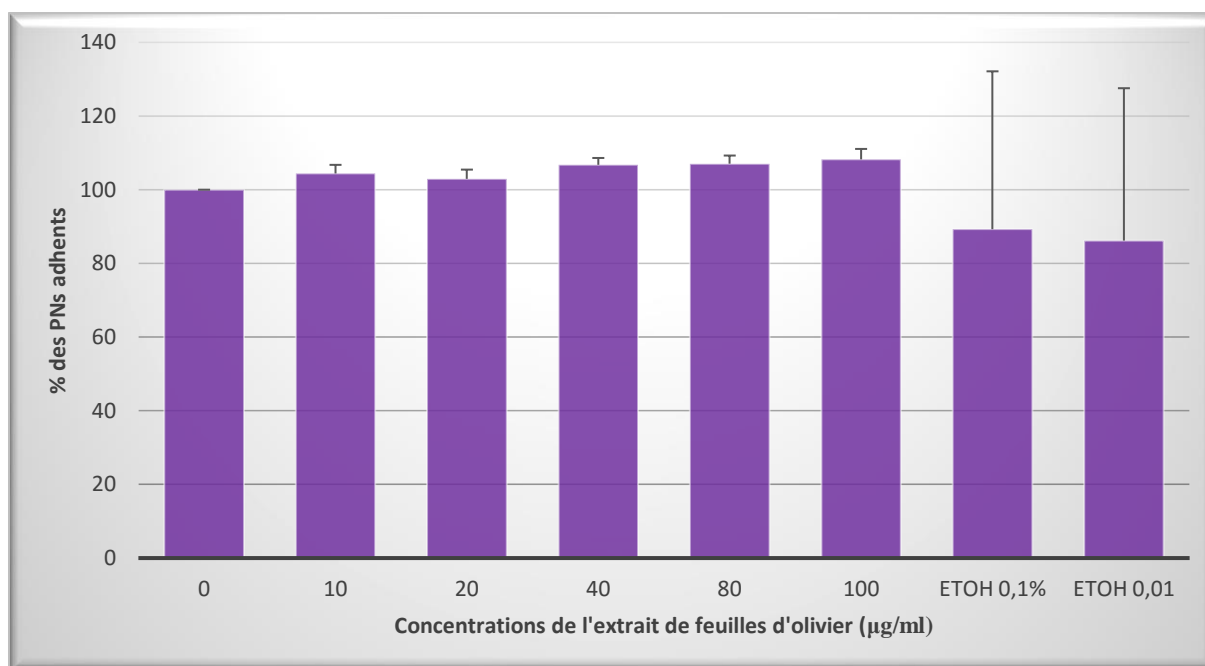


Figure 17 : Effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur l'adhérence des neutrophiles. Les neutrophiles ont été incubés avec des concentrations croissantes de l'extrait de feuilles d'olivier [0, 10, 20, 40, 80, 100] µg/ ml et de l'éthanol [0.1 %, 0.01%], pendant 60 min à 37°C. Le taux de cellules adhérentes est déterminé par un dénombrement sous microscope photonique des cellules vivantes et mortes avec le bleu de trypan. Ce résultat représente la moyenne de quatre essais.

En plus du dénombrement des cellules en suspensions et qui sont non adhérentes, nous avons observé sous microscope inversé les fonds des boîtes de Pétri où se trouvent les cellules adhérentes. Les tapis des cellules adhérentes pour tous les traitements sont pris en photos et représentés dans la figure 18.

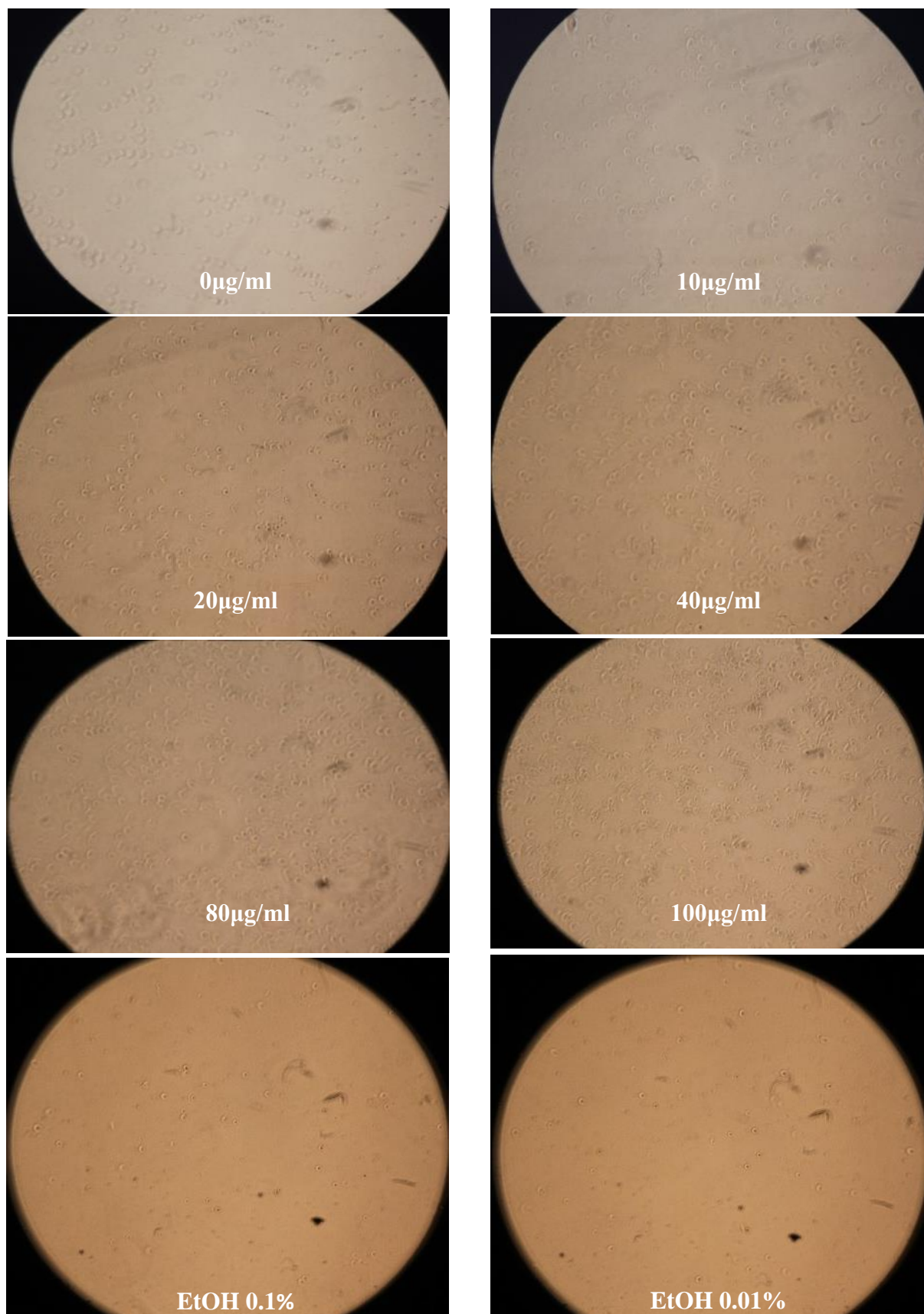


Figure 18 : PNs adhérents traités à l'extrait de feuilles d'olivier à concentrations croissantes observés sous microscope inversé au grossissement X40.

L'histogramme de la figure 17 montre une faible augmentation du pourcentage des PNs adhérents ne dépassant pas les 10%, par opposition aux résultats du contrôle à l'éthanol où le nombre de cellules adhérentes avait faiblement diminué de façon non significative. Ces résultats obtenus suggèrent que l'extrait de feuilles d'olivier n'avait pas d'effet significatif sur l'adhérence des cellules (annexe 7).

Si l'on regarde dans la bibliographie, on trouve généralement que les polyphénols inhibent l'adhérence des cellules, et plus particulièrement le tanin (annexe 8), en effet ce dernier a la capacité de créer des complexes avec les protéines membranaires par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, permettant alors de désactiver l'adhésion cellulaire (COWAN, 1999). Cependant selon MEBIROUK-BOUDECHICHE et *al.* (2014) la teneur en tanins est très faible pour l'*Olea europea* (0,39 et 0,77 g), ceci est confirmé par NAHAL-BOUDERBA et *al.* (2012) qui ont mentionné l'absence de tanins dans les feuilles d'olivier. Aussi nous avons découvert dans une autre étude que les résidus d'acide gallique (annexe 9) interagissaient avec les lipides et couvrait la bicouche membranaire des cellules, augmentant ainsi l'adhésion grâce à des interactions de Van Der Waals (EVANS, 1991). L'étude menée par BOUABDALLAH (2014) a affirmé la présence d'acide gallique dans les feuilles d'olivier ; ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'adhésion avec les concentrations croissantes de l'extrait et confirmer notre hypothèse.

A decorative frame with a grey border and rounded corners. Two grey ribbons are attached to the left and right sides of the frame, each with a black shadow effect.

Conclusion

Les polynucléaires neutrophiles représentent un puissant système de défense contre les agents pathogènes, intervenant dans les réactions inflammatoire. Bien que bénéfique, l'inflammation peut devenir néfaste notamment en causant de nombreux dommages tissulaires suite à une libération accrue d'espèces réactives oxygénées. De nos jours, l'athérosclérose, et le cancer peuvent être associés à une inflammation chronique. Le traitement de telles maladies, long, coûteux et inaccessible à la plupart des populations dont l'Algérie, nécessite l'utilisation d'anti-inflammatoires synthétiques qui peuvent parfois avoir des effets secondaires nocifs pour l'organisme ; pour remédier à cela, la recherche de molécules bioactives s'avère nécessaire. Ces dernières peuvent être présentes dans les plantes, dont par exemple l'olivier et ses dérivés utilisés traditionnellement dans le pourtour méditerranéen. De façon générale les composés impliqués dans l'activité anti-inflammatoire des plantes comprennent les dérivés phénoliques.

Faisant suite aux études antérieures, le présent travail a porté sur l'évaluation de l'effet cytotoxique et l'effet sur l'adhérence de l'extrait de feuilles d'olivier vis-à-vis des neutrophiles. Les résultats de l'évaluation *in vitro* de l'effet cytotoxique porté par cet extrait ont montré une baisse du pourcentage des cellules vivantes qui ne dépassait pas les 40% pour les plus fortes concentrations, ce résultat reste tout de mêmes non significatif. D'après certains auteurs cet effet cytotoxique serait probablement dû sa composition phénolique riche en flavonoïdes, qui pourrait avoir un effet protecteur contre le cancer.

Quant à l'effet de l'extrait sur l'adhérence cellulaire, les résultats ont montré qu'il y'avait une légère hausse des cellules adhérentes d'environ 10% sans que cela soit significatif. Selon la bibliographie, on a pu relier cet effet observé à la composition des feuilles d'olivier en acide gallique qui permet le renforcement des interactions intercellulaires.

Notre travail nous a permis, d'une part, de mettre au point la technique d'isolement des neutrophiles en portant certaines modifications pour une meilleure maîtrise, d'autre part, d'explorer l'effet cytotoxique de l'extrait de feuilles d'olivier sur les PNs ainsi que son effet sur l'une des propriétés essentielles de ces cellules qu'est l'adhérence, sachant que cette application n'a pas été déjà réalisée avec cet extrait.

Toutefois, cette étude reste préliminaire et d'autres recherches plus développées dans cette thématique sont nécessaires.

Dans l'état actuel des connaissances acquises, une caractérisation de la composition phénolique de l'extrait de feuilles d'olivier utilisé, par une Chromatographie sur couche mince, s'avère utile pour mieux cerner les effets observés.

Nous pensons, également, qu'il serait intéressant d'identifier les différents clusters de différenciations impliquées dans l'adhérence par cytométrie en flux, Comme il serait possible de tester l'effet de l'extrait de feuilles d'olivier sur d'autre fonction des PNs et même sur d'autres lignées cellulaires.

Pour mieux évaluer le pouvoir exercer pas notre extrait de feuilles, il serait souhaitable d'adopter une approche *in vivo* par l'intermédiaire d'un modèle animal afin de comprendre le comportement des composés phénoliques à l'intérieur de l'organisme et aussi dépasser une des limites rencontrées qu'est la courte durée de vie des PNs.

Dans cette optique, les extraits issus de feuilles d'olivier ayant prouvé *in vitro* leur efficacité et leur bioactivité sont des candidats potentiel qui devraient être plus exploités. Il est donc d'un grand intérêt que la communauté scientifique trouve de nouvelles perspectives pour valoriser ce sous-produit, notamment en faisant des études plus approfondies sur les investigations phytochimiques et biologiques de ces derniers ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base de feuilles d'olivier.



Références
bibliographiques

A

- **AL-AZZAWIE H.F. et ALHAMDANI M.S. (2006).** Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Science*, 78(12), 1371-1377.
- **ALTIOK E., BAYCIN D., BAYRAKTAR O. et ULKU S. (2008).** Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Sep. and Purif. Tech.*, 62(2), 342-348.
- **ANDREADOU I., ILIODROMITIS E.K., MIKROS E., CONSTANTINO M., AGALIAS A., MAGIATIS P., SKALTSOUNIS A.L., KAMBER E., TSANTILIKAKOULIDOU A. et KREMASTINOS D.T. (2006).** The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J. of Nutr.*, 136(8), 2213-2219.
- **AOUDI F. (2012).** Étude et valorisation des feuilles d'olivier *Olea europaea* dans l'industrie agroalimentaire. Thèse de doctorat, université de Carthage, Carthage, Tunisie.
- **AYDOGAN C. (2008).** Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. *Phyt. Res.*, 22(9), 1239-1242.

B

- **BAINTON D. F. et FARQUHAR M. G. (1966).** Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. *The J. of Cell Bio.*, 28 (2), 277-301.
- **BAINTON D.F., ULLYOTL L. et FARQUHAR M. G. (1971).** The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *The J. of Exp. Med.*, 134(4), 907-934.
- **BAO J., ZHANG D.W., ZHANG J.Z.H., LEE HUANG P., LIN HUANG P., et LEE-HUANG S. (2007).** Computational study of bindings of olive leaf extract (OLE) to HIV-1 fusion protein gp41. *FEBS Lett.*, 581 (14), 2737-2742.

- **BEDOUHENE S., MOULTI-MATI F., DANG P.M. et EL-BENNA J. (2017).** L'oleuropein et l'hydroxytyrosol inhibent la degranulation et la chimiotaxie des neutrophiles induites par la N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine par inhibition de l'AKT, p 38 et ERK1/2/PAM-Kinase. *Inflammopharmacologie*, 25(06), 673-680.
- **BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., LORENTE J., ORTUNO A. et DEL-RIO J. A. (2000).** Antioxidant activity of phenolic extracted from *Olea europaea* L-leaves. *F. Chem.*, 68(4), 457-462.
- **BISIGNANO G., TOMAINO A., LO CASCIO R., CRISAFI G., UCCELLA N., et SAIJA A. (1999).** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Pharm. Pharmacol.*, 51(8), 971-974.
- **BJERREGAARD M.D. (2003).** The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. *Blood.*, 101, 4322–4332
- **BORREGAARD N., SORENSEN O.E. et THEILGAARD-MÖNCH K. (2007).** Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Tre. In Immun.*, 28, 340–345.
- **BORS W., HELLER W., MICHAEL C. et SATAN M. (2009).** Flavoids as antioxidants : determination of radical scavenging efficiencies. *Meth. in Enzymol.*, 186-343.
- **BOUABDALLAH A., (2014).** Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europea sylvestris*), Université Abou Bekr Belkaïd -Tlemcen.
- **BOUAOUINA M. et HALBWACHS-MACAIELLI L. (2006).** Activation des intégrines et adhérence des leucocytes et des plaquettes. *Hématol.*, 12 (1), 21-33.
- **BOUDHRIOUA N., BAHLOUL N., BEN SLIMEN I. et KECHAOU N. (2009).** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Indus. Crop. and prod.*, 29, 412– 419.
- **BOXIO R. (2005).** Signalisation intracellulaire dans la régulation des fonctions chez les polynucléaires neutrophiles de souris. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy 1, France.
- **BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMANN C., FAULER B., UHLEMANN Y. et WEISS D.S. (2004).** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Scie.*, 303(5663), 1532-1535.

C

- **CADET J., BELLON S., BERGER M., BOURDAT A.G., DOUKI T., DUARTE V., FRELON S., GASPARUTTO D., MULLER E., RAVANAT J.L. et SAUVAIGO S. (2002).** Recent aspects of oxidative DNA damage : Guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Bio. Chem.*, 383, 933-943.
- **CAPANIO F., GOMES T., et PASQUALONE A. (2001).** Phenolic compounds in virgin olive oils : influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelft-life. *Europ. Food Res. and Tech.*, 212, 329-333.
- **CHERIF S., RAHAL N.A., HAOUALA M., HIZAOUI B., DARGOUTH F., GUEDDICHE M., KALLEL Z., BALANSARD GA. et BOUKEF K. (1996).** Clinical trial of a titrated Olea extract in the treatment of essential arterial hypertension. *J Pharm Belg*, 51(2), 69-71.
- **CHERTOV O., YANG D., HOWARD O.M. et OPPENHEIN J.J. (2000).** Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol. Rev.*, 177, 68-78.
- **CONIE., DI-BENEDETTO R., DI PASQUALE M., MASELLA R., MODESTI D., MATTEI R. et CARLINI E.A. (2000).** Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low-density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*, 35(1), 45-54.
- **COWAN M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- **COXAM V., PUEL C. et DAVICCO M.J. (2010).** Olives et huile d'olive dans la prévention de l'ostéoporose ; In : « Olives et huile d'olive dans la santé et la prévention des maladies ». Ed. Academic Press, Elsevier, Etats-Unis.

D

- **DAVOUST N. (2015).** Immunité et vaccination, ENS de Lyon, institut français de l'éducation.
- **DE LEONARDIS A. et MACCIOLA V. (2010).** Biophénols d'olive en tant que compléments alimentaires et additifs In : « Olives et huile d'olive dans la prévention de

l'ostéoporose ; In : « Olives et huile d'olive dans la santé et la prévention des maladies ». Ed. Academic Press, Elsevier, Etats-Unis.

- **DEFRAGNE J.O. et PINCEMAIL. J. (2008).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalité. *Rev. Med. Liège.*, 63, 10-19.
- **DELBOSC S., CRISTOI J. P., DESCOMPS B., CHENARD J., et SIROIS P. (2001).** Oxygen and the superoxide anion. Modulation of NADPH oxidase. *ISoc..Biol.*, 195(4), 401-411.
- **DROGE W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82, 47-95.

E

- **EDWARDS S.W. (1994).** Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge : Cambridge University Press, 320p.
- **ELAINE-HARDMAN W. (2014).** Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. Marshall University Joan C. Edwards School of Medicine, 1600 Medical Center Dr., Huntington, West Virginia 25701-3655, USA.
- **ERBAY Z. et ICIER F. (2009).** Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *J. of Fo. Eng.*, 91, 533-541.
- **ESTERBAUER H., GEBICKI J., PUHL H. et JURGENS G. (1992).** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Bio. and Med.*, 13, 341-390.
- **EVANS, E. (1991).** Entropy-driven tension in vesicle membranes and unbinding of adherent vesicles. *Langmuir*, 7, 1900-1908.

F

- **FAURSCHOU M. et BORREGAARD N. (2003).** Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Micr. Infect.* 5(14), 1317-1327.
- **FAVIER A. (2003).** Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actu. Chim.*, 108-115.

- **FIEVEZ A., SEUMOIS G., LEKEUX P. et BUREAU F. (2005).** L'apoptose du neutrophile. *Ann. Méd. Vét.*, 149, 10-19
- **FOURNIER BM. et PARKOS CA. (2012).** The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*, **5**, 354–366
- **FURNERI P.M., MARINO A., SAIJA A., UCCELLA N. et BISIGNANO G. (2002).** In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob Agents.*, 20(4), 293-296.

G

- **GACIA-GOMEZ A., ROIG A. et BERNAL M.P. (2003).** Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity. *Bio. Tech.*, 86, 59-64.
- **GERMAIN D., GENTILHOMME O., BRYON P A. et COIFFIER B. (1981).** Le polynucléaire neutrophile. In *Physiologie Humaine (cellules sanguines et organes hématopoïétiques)*. Edition SIMEP S.A., Villeurbanne. France.
- **GHEDIRA K. (2008).** L'olivier, *Phytothérapie*, 6: 83–89.
- **GIAMARELLOS-BOURBOULIS E.J., GELADOPOULOS T., CHRISOFOU M., KOUTOUKAS P., VASSILIADIS J., ALEXANDROU I., TSAGANOS T., SABRACOS L., KARAGIANNI V., PELEKANOU E., TZEPI I., KRANIDIOTI H., KOUSSOULAS V. et GIAMARELLOU H. (2006).** Oleuropein: a novel immunomodulator conferring prolonged survival in experimental sepsis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Shock*, 26(4), 410-416.
- **GOLDSBY R., KINDT T.J. et OSBORNE B.A. (2001).** *Immunologie*. 4e ed., Dunod, Paris.
- **GOUGEROT-POCIDALO M.A (2002).** Les polynucléaires neutrophiles ; in « immunologie » éd. Technique et documentation, 4^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- **GOUGEROT-POCIDALO M.A. (1997).** Le polynucléaire neutrophile. In « Biologie Médicale », *Immunologie*, 3^{ème} édition, Paris.
- **GOUGEROT-POCIDALO M.A. et HURTADO-NEDELEC M. (2011).** Déficiences primitives de la fonction des polynucléaires neutrophiles. *Hématologie*, 1984(11), 56403-9.

- **GRISHAM M.B. et GRANGER D.N. (1988).** Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci.*, 86, 36-42.
- **GRONDAHL G., JOHNANNISSON A., JESEN-WAERN M. et EKDHIL K.N. (2001).** Opsonization of yeast cells with equine iC3, C3b, and IgG. *Veter. Immune. and immunopath.*, 80, 209-223.

H

- **HAMDI K.H. et CASTELLON R. (2005).** Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an antitumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 769-778.
- **HAPTON J.E., KETTLE A.J. et WINTERBOURN C.C. (1998).** Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92, 3007-3017.
- **HENRY S. (2003).** L'huile d'olive, son intérêt nutritionnel, ses utilisations en pharmacie et en cosmétique. These de doctorat. Université de Henry Poincaré - Nancy 1, Nancy, France.
- **HERANT M., HEINRICH V. et DEMBO M. (2006).** Mechanics of neutrophil phagocytosis experiments and quantitative models. *J. Cells. Sci.*, 119, 1903-13.
- **HIMOUR S., YAHIA A., BELATTAR H., et BELLEBCIR L. (2016).** Etude phytochimique de feuilles d'Olea europaea L. var Chemlel d'Algérie, Vol. 1 (1), pp (34-38).
- **HUNT J. et WOLFF S. (1991).** The role of histidine residues in the non-enzyme covalent attachment of glucose and ascorbic acid to protein. *F. Rad. Res.*, 14(4), 279-87
- **HYARDIN A. (2008).** Etude de la fonctionnalité alimentaire de plats industriels. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine école supérieure d'agronomie et des industries alimentaires, Nancy, France.

J

- **JACOB R.A. (1995).** The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, 15 (5), 755-766.
- **JANEWAY C.A., TRAVERS P., WAIPORT M. et SHLOMCHIK M. L. (2001).** *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. Garland Science Publishing. New York.

K

- **KANG T., YI J., GUO A., WANG X., OVERALL C.M., JIANG W., ELDE R., BORREGAARD N. et PEI D. (2001).** Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 276, 21960–21968.
- **KAPLAN G. (1977).** Differences in the mode of phagocytosis with Fc and C3 receptors III macrophages. *SeandJ.Immunol.*, 6(8), 797-807.
- **KOBAYASHI S.D., VOYITCH J.M., BURLAK C. ET DELEO F.R. (2005).** Neutrophils in the innate immune repons. *Arch immunol.*, 53, 505-517.
- **KASKOOS R.A. (2013).** Pharmacgnostic Specifications of leaves of *Olea europea* Collected from Iraq. *Americ. J. of phytomed. and clinic. Therap.* 2: 153-160.

L

- **LALAS S., ATHANASIADIS V., GORTIZI O., BOUNITSI M., et GIOVANOUDIS I. (2011).** Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Fo. Chem.*, 127, 1521-1525.
- **LEW D.P. (1998).** Neutrophiles, In : PELTIER A, RUSSO-MARIE F, POLLA BS, editors. *L'inflammation.* . Libbey Eurotext, Paris.

M

- **MAIANSKI N.A., MAIANSKI A.N., KUIJPERS T.W. et ROOS D. (2004).** Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol.*, 111, 56–66
- **MARTIN-GARCIA A.I., MOUMEN A., YÁÑEZ RUIZ D.R., et MOLINA-ALCAIDE E. (2003).** Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Anim. Fee. Sci. and Tech.*, 107, 61-74.
- **MEBIROUK-BOUDECHICHE1 L., CHERIF M., BOUDECHICHE L. et SAMMAR F. (2014),** Teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide d'Algérie, Université d'El Tarf, B.P 73, 36000, EL Tarf, ALGERIE.
- **MEDZHITOV R. (2007).** Recognition of microorganisms and activation of the immune reponse. *Nature*, 449 :819-26
- **MOREL S. (2011),** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae), Biochimie, Biologie Moléculaire. Université d'Angers
- **MOSER R., SCHLEIFFENBAWN B., GROSCURTH P. et FEHR L. (1989).** Interleukin 1 and tumor necrosis factor stirnulate hwnan vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J. Clin. Invest .*, 83(2), 444-455.
- **MYLONAKI S., KIASOS E., MAKKRIS D.P. et KEFALAS P. (2008).** Optimization of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolic using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. and Bio. Chem.*, 392(5), 977-985.

N

- **NAHAL BOUDERBA N., KADI H., MOHGTET S., MEDDAH B. et MOUSSAOUI A. (2012).** Antibacterial Activity and Phutochemical Screening of *Olea Europaea* Leaves from Algeria. The open conference procedngs journal ,3,(suppl 1- M 11). Pp 66-69.
- **NEFZAOUI A. (1995).** Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced course, 12-23.

- **NUSSE O. et LINDAU M. (1988).** The dynamics of exocytosis in human neutrophils. *The J. of Cell Bio.*, 107, 2117–2123.

Q

- **O'DOWD Y. M., EL BENNA J., PERIANIN A. et NEWSHOLME P. (2004).** Inhibition of formyl- methionyl-leucyl-phenylalanine-stimulated respiratory burst in human neutrophils by adrenaline: inhibition of Phospholipase A2 activity but not p47phox phosphorylation and translocation. *Biochem. Pharmacol.*, 67(1), 183-190.

P

- **PANIZZIL. (1960).** The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazz. Chim. Ital.*, 90, 1449-1485.
- **PAPADAKI H.A. et ELIOPOULOS G. D. (2003).** The role of apoptosis in the pathophysiology of chronic neutropenias associated with bone marrow failure. *Cell Cyc.*, 2(5), 447-451.
- **PERRIN J. (2009).** Étude de l'impact des polynucléaires neutrophiles et de deux enzymes dérivée cathepsine G et élastase sur la coagulation. Thèse doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy, France.
- **PUEL C., MATHEY J., AGALIAS A., KATI-COULIBALY S., MARDON J., OBLED C., DAVICCO M.J., LEBECQUE P., HORCAJADA M.N., SKALTSOUNIS A.L. et COXAM V. (2006).** Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clin Nutr.*, 25(5), 859-868.

Q

- **QUINN M.T. et GAUSS K.A. (2004).** Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with non-phagocyte oxidases. *J. Leukoc. Biol.*, 76(4), 760-781.

R

- **RAINARD P. (1993).** Les polynucléaires neutrophiles. veterinary research. *Bio Med central*, 24(4), 351-358.
- **RAVICHANDRAN K.S. et LORENZ U. (2007).** Engulfment of apoptotic cells : signals for a good meal. *Nat rev immunol.*, 16, 597-621.
- **RUSSO-MARIE F., PELTIER, A., et POLLA, B.S. (1998).** L'inflammation. John Libbey Eurotext. Lavoisier, Paris.

S

- **SCHWAB J.M., CHIANG N., ARITA M. et SERHAN C.N. (2007).** Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*, 447,869-875.
- **SENGELOV H., KJELDEN L. et BORREGAARD N. (1993).** Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol.*, 150, 1535–1543.
- **SERHAN C.N., CHIANG N. et VAN DYKE T.E. (2008).** Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Rev. Immunol* ; 8,349-361.
- **SORENSEN O., BRATT T., JOHNSEN A.H., MADSEN M.T. et BORREGAARD N. (1999).** The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is bound to lipoproteins in plasma. *J. Biol. Chem.*, 274, 22445–22451.
- **SUDJANA A.N., D'ORAZIO C., RYAN V., RASOOL N., ISLAM N., RILEY, T.V. et HAMMERA, K.A. (2009).** Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Inter. J. of Antimi.l Agen.*, 33, 461-463.
- **SURATT B.T., YOUNG S. K., LIEBER J., NICK J. A., HENSON P. M., et WORTHEN G. S. (2001) .** Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am.l. Physiol Lung Cell. Mol. Physiol.* 281(4), 913-921.
- **SYED-HARIS O. (2010).** Oleuropein in Olive and Its Pharmacological Effects. *Sci. Pharm.*, 78, 133-154.

T

- **TAUROG A., et DORRIS M.L. (1992).** Myeloperoxidase-catalyzed iodination and coupling. *Arch. Biochem* , 296, 239-246.
- **THANNICKAL V.J. et FANBURG B.L (2000).** Reactive oxygen species in cell signaling. *Amer. J. of Physio. - Lung Cell. and Mol. Physio.*, 279, 1005-1028.
- **TOUSSAINT B. (2008).** Oxygène et stress oxydant. Thèse de doctorat. PCEM 1. Grenoble, France.

V

- **VIEIRA O.V., BOTELHO R.J. et GRINSTEIN S. (2002).** Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem J.*, 366, 689-704.
- **VISIOLI F. et GALLI C. (1994).** Oleuropein protects lowdensity lipoprotein from oxidation. *Li. Sci.*, 55(24), 1965-1971

W

- **WALKER R.I. et WILLEMZE R., (1980).** Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. *Rev. Infect. Dis.*, 2, 282-292.
- **WEBB P.R., WANG K. Q., SCHEEL-TOELLNER D., PONGRACZ I., SALMON M. et LORD J. M. (2000).** Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. *Apop.*, 5(5), 451-458.
- **WEISS S.J. (1989).** Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, 320, 365-376.
- **WITKO-SARSAT V. (2012).** « Les cellules de l'immunité innée » In : Immunologie. 6e éd. Paris.
- **WITKO-SARSAT V., RIEU P., DESCAMPS-LATSCHA B., LESAVRE P., et HALBWACHS-MECARELLI L. (2000).** Neutrophils : molécules, fonctions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 80(5), 617-653.
- **WOODFIN A., VOISIN M.B. et NOURSHARGH S. (2010).** Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr opin hematol.*, 17, 9-17.

Z

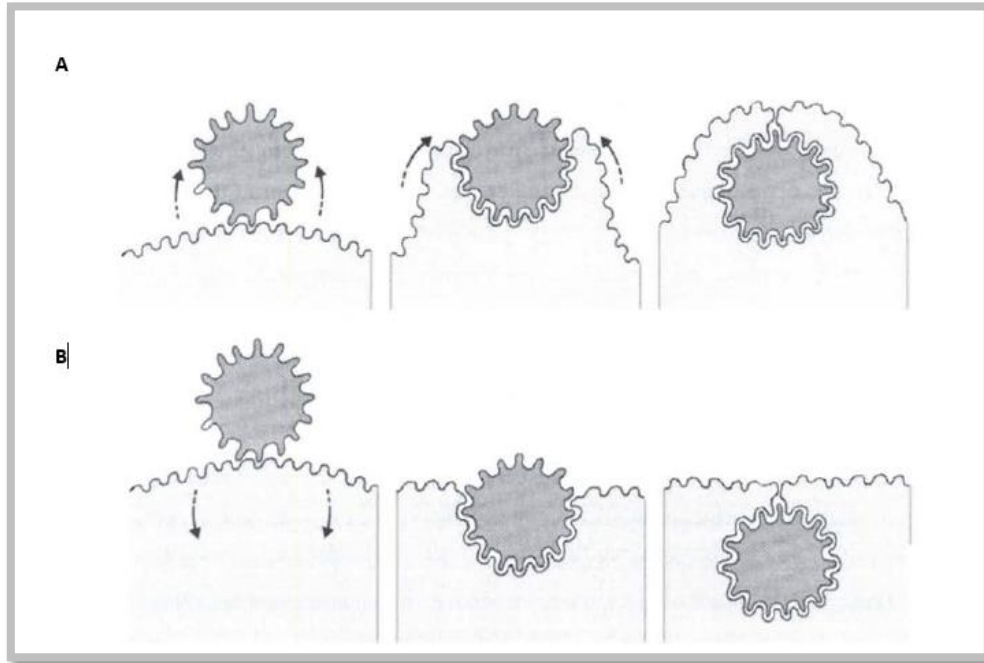
- **ZBAKH N. et EL-ABBASSI A. (2012).** Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: a review. *J Funct Foods*, 4, 53-65.
- **ZELKO I.N., MARIANI T.J. et FOLZ R.J. (2002).** Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad. Bio. and Med.* 33, 337-349.

A decorative frame with a grey border and rounded corners. Two grey ribbons are attached to the left and right sides of the frame, appearing to wrap around it. The word "Annexes" is centered within the frame.

Annexes

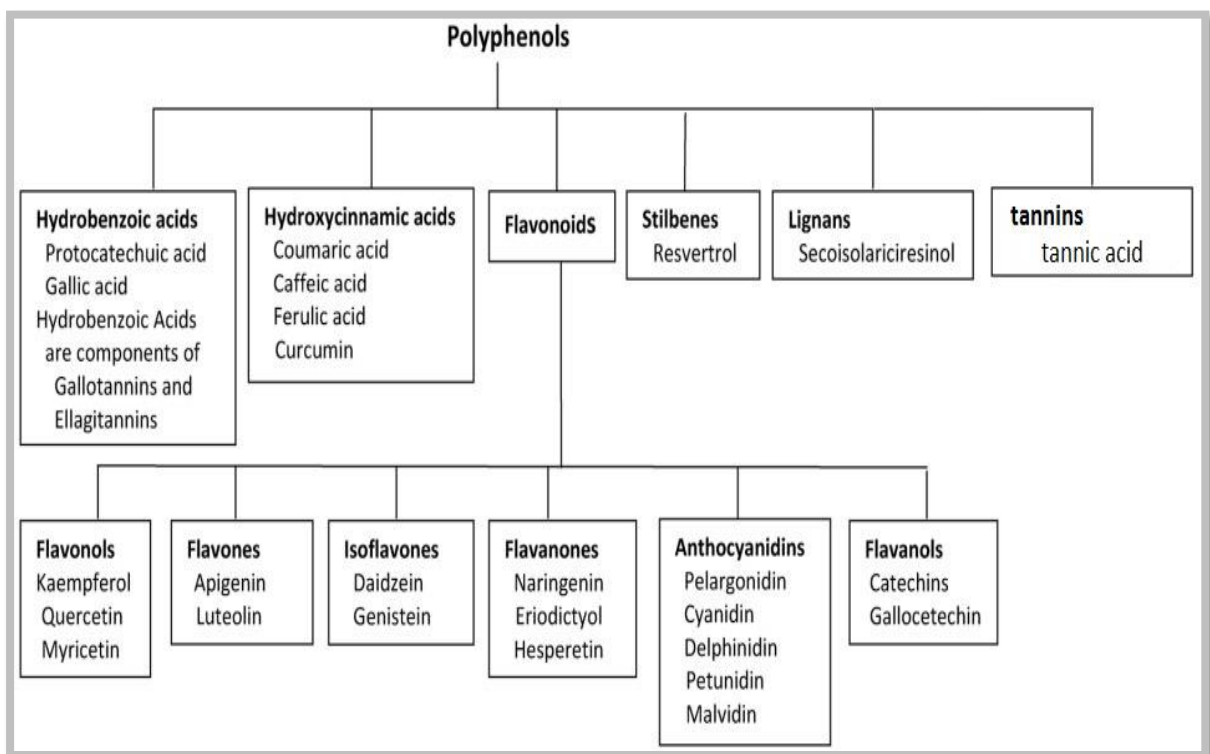
Annexe 1 :

Aspect morphologique de la phagocytose médiée par les immunoglobulines (A), et par les molécules C3b du complément (B) d'après GERMAIN *et al.*, 1981.



Annexe 2 :

Classification des polyphénols d'après ELAINE-HARDMAN, 2014.



Annexe 3 :

Appareillages utilisés au cours de la pratique



Hotte à flux laminaire



Microscope photonique



Microscope inversé



Centrifugeuse



Étuve



Bain marie



Balance de précision analytique



plaque chauffante



pH mètre

Annexe 4 :

Poids moléculaires des différentes molécules chimiques composants le PBS

Molécules	Poids moléculaires (g/mol)
NaCl	58.4
KCl	74,5513
KH ₂ PO ₄	136,086
Na ₂ HPO ₄ 2(H ₂ O)	141,96

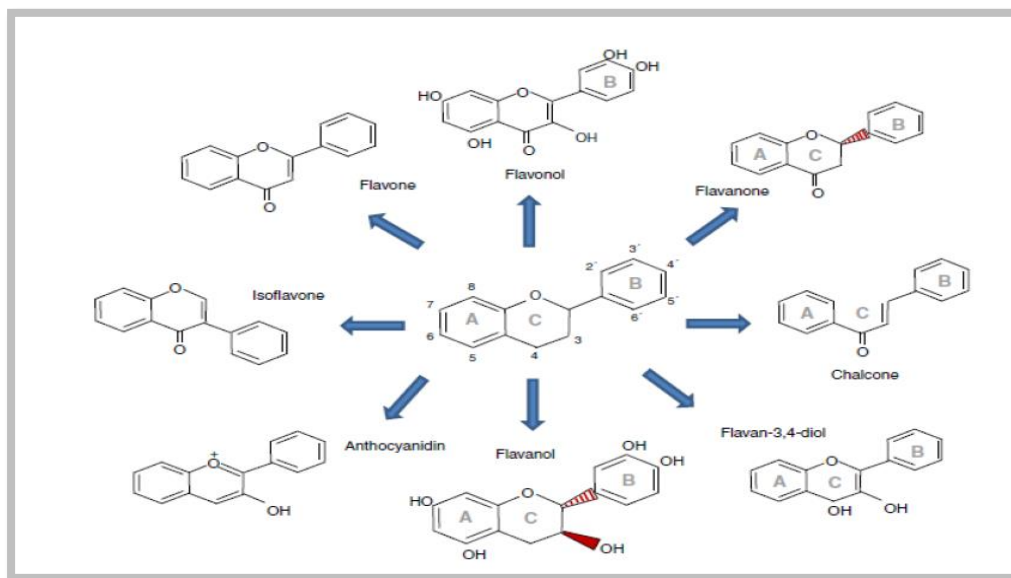
Annexe 5 :

Résultat statistique du test de cytotoxicité réalisé par ANOVA prisme.

0 vs 10	-4.500	2.904	No	ns	-11.86 to 2.857
0 vs 20	-2.750	1.774	No	ns	-10.11 to 4.607
0 vs 40	-6.750	4.355	No	ns	-14.11 to 0.6068
0 vs 80	-7.250	4.676	No	ns	-14.81 to 0.1068
0 vs 100	-8.250	5.323	Yes	*	-15.61 to -0.8932
0 vs EtOH 0,1	6.500	4.194	No	ns	-0.8568 to 13.88
0 vs Et OH 0,01	13.00	8.388	Yes	***	5.643 to 20.36

Annexe 6 :

Les structures chimiques des principales familles de flavonoïdes (FRAGA et OTEIZA, 2011).



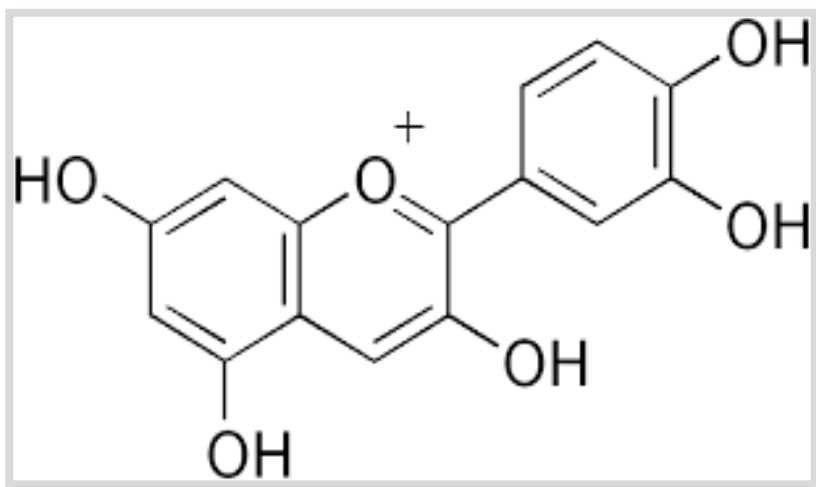
Annexe 7 :

Résultat statistique du test de l'effet sur adhérence réalisé par ANOVA prisme.

0 vs 10	3.750	2.130	No	ns	-4.645 to 12.14
0 vs 20	2.500	1.420	No	ns	-5.895 to 10.89
0 vs 40	5.750	3.266	No	ns	-2.645 to 14.14
0 vs 80	6.250	3.550	No	ns	-2.145 to 14.64
0 vs 100	7.250	4.118	No	ns	-1.145 to 15.64
0 vs EtOH 0,1%	-6.750	3.130	No	ns	-17.03 to 3.532
0 vs EtOH 0,01	-11.25	5.217	Yes	*	-21.53 to -0.9684

Annexe 8 :

Structure chimique du tannin



Annexe 9 :

Structure chimique de l'acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque)

