

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAÏD-TLEMCCEN
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS



Département de Biologie
Laboratoire Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de Nutrition

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie

Option : physiologie cellulaire et physiopathologie

Etude in vitro des activités anti-hémolytiques et anti-inflammatoires des extraits du grignons d'olive

Présenté par :

Mlle Boulenuar Sara

Mlle Lakehal Imane

Soutenu le : 25/06/2020

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme LOUKIDI B.

MCA Université de Tlemcen

Examinatrice : Mme MEDJDOUB A.

MCB Université de Tlemcen

Promotrice : Mme GUERMOUCHE B.

MCA Université de Tlemcen

Année universitaire : 2020-2021

Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour à :

Mon cher père, Mustapha Lakehal, source de vie et de joie, pour son soutien et son encouragement.

Ma très chère et douce mère, Zohra Lakehal, source de bonheur, pour son amour et ses sacrifices.

Mon cher frère Boubaker pour son précieux soutien et l'amour qu'il me réserve.

Ma sœur Amina, je n'oublierais jamais son encouragement et son soutien le long de mes études

Mon frère Mohamed

Ma chère nièce kawthar

Mes chers petits neveux : Houssam, Fares.

Ma chère binôme Boulenouar Sara et à toute sa famille.

Ma belle-famille pour leur soutien tout au long de ces années

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

LAKEHAL IMANE

Dédicace

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

A ma sœur, Ikram pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,

A mes chers frères, Toufik et Mohammed, pour leur appui et leur encouragement,

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Remerciements

Ce travail est l'aboutissement d'un dur labeur et de beaucoup de sacrifices

Nos remerciements vont d'abord au Créateur de l'univers qui nous a dotés
d'intelligence

Notre gratitude s'adresse à **Dr Guermouche Bouayad Agha Baya** Maître de
conférence A Membre du laboratoire PPABIONUT Physiologie, Physiopathologie et
Biochimie de la Nutrition Faculté SNVTU, Université Abou Bekr Belkaid , pour son
encadrement, son orientation, ses conseils et la disponibilité qu'elle nous a témoignée
pour nous permettre de mener à bien ce travail.

Nous exprimons nos profonds remerciements à notre adorable Co-encadreur
doctorante **Melle Badi Zoulikha** pour accepter de diriger et de Co-encadrer ce travail
et pour ses compréhensions, ses conseils et ses aides, pour ses gentillesse et ses
orientations efficaces.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Mme loukidi Bouchra qui a
accepté de présider et de juger ce travail de Master.

Aussi nous remercions Mme Madjdoub Amel de bien vouloir accepter d'examiner
ce travail.

Enfin, on remercie tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin dans l'élaboration
de ce travail.

Lakehal Imane

Boulenouar Sarra.

Liste des Figures

Figure 1 : Le fruit de l'olivier.....	05
Figure 2 : Structure du noyau phénol.....	12
Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes.....	13
Figure 4 : Structure de la membrane érythrocytaire.....	16
Figure 5 : Les échanges de la membrane érythrocytaire.....	17
Figure 6 : Grignon d'olive en poudre fine.....	19
Figure 7 : La filtration de la macération de grignon d'olive.....	20
Figure 8 : Photographie du Rotavapor utilisé.....	20
Figure 9 : Extraits de grignon d'olive après séchage.....	21
Figure 10 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique.....	26
Figure 11 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'extrait méthanolique des grignons d'olive.....	26
Figure 12 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'extrait éthanolique des grignons d'olive.....	27
Figure 13 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'extrait éthanolique et méthanolique des grignons d'olive.....	27
Figure 14 : Comparaison des pourcentages d'hémolyse des globules rouges entre l'acide gallique et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.....	28
Figure 15 : Activité anti-hémolytique de l'acide gallique et du Diclofénac.....	29
Figure 16 : Activité anti-hémolytique des extraits méthanolique et éthanolique des grignons	

d'olive.....	30
Figure 17 : Comparaison de l'activité anti-hémolytique entre l'acide gallique et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.....	30
Figure 18 : Comparaison de l'activité anti-hémolytique entre le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.....	31
Figure 19 : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac.....	32
Figure 20 : Inhibition de la dénaturation protéique par les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.....	32
Figure 21 : Comparaison de l'inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.....	33

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification botanique de l'olivier.....	04
Tableau 2 : Les différents composants du grignon d'olive	07
Tableau 3 : Composition chimique indicatif des différents types de grignon	08
Tableau 4 : Caractéristiques des constituants pariétaux des grignons	09
Tableau 5 : Caractéristiques de l'huile brute de grignon.....	11
Tableau 6 : Les étiologies de l'inflammation	15
Tableau 7 : Rendements de la macération du grignon d'olive dans différents solvants.....	25

Liste des abréviations :

GO : grignon d'olive.

GRh : globule rouge.

Hb : hémoglobine.

PP : les polyphénols.

CP : les composés phénoliques.

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdiens.

AGMI : acide gras mono insaturés.

AGPI : acide gras polyinsaturés.

SOD : Superoxy de dismutase

CAT : catalase.

GPX-PX : Glutathion peroxydase

Ca²⁺ : calcium.

NaCl : chlorure de sodium.

K⁺ : potassium.

KOH : bicarbonate.

H₃PO₄ : acide phosphorique.

CT : cholestérols totales.

TG : triglycérides.

AG : acide gras.

ROS : espèces réactives oxygénées.

SBA : albumine sérique bovine.

ATPase : pompe sodium-potassium.

CO₂ : dioxyde de Carbone.

LDH : lactate déshydrogénase.

CK : créatinine kinase.

Sommaire

INTRODUCTION

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.	L'olivier	03
1.	description du végétal	03
2.	historique	03
3.	Classification botanique de l'olivier	04
4.	Le fruit (l'olive)	05
II.	Généralités sur les sous-produits de l'oléiculture	05
1.	Production oléicole en Algérie	05
2.	Huile d'olive	06
3.	Extraction d'huile d'olive	06
4.	Les sous-produits de l'oléiculture	06
4.1.	Déchets liquides (margines)	06
4.2.	Déchets solides (grignons d'olive)	06
III.	Grignon d'olive	06
1.	Définition	06
2.	Types de grignon d'olive	07
2.1.	Les grignons bruts	07
2.2.	Les grignons épuisés	07
2.3.	Les grignons issus des huileries modernes	07
2.4.	Le grignon partiellement dénoyauté	07
3.	Valorisation du grignon d'olives	07
3.1.	Caractéristiques de grignon d'olive	07
3.1.1.	Caractéristiques physique du grignon d'olive	07
3.1.2.	Caractéristiques Chimiques des grignons d'olives	08
4.	Utilisations concurrentielles des grignons	10
4.1.	Utilisation des grignons comme combustible	10
4.2.	Utilisations possibles de la coque	10
4.3.	L'extraction d'huile restante	10
4.4.	Savon	11
4.5.	Charbon actif	11
4.6.	Ingrédient des matériaux de construction	11

IV.	Les polyphénols	12
	1. Définition	12
	1.1 Les acides phénoliques	12
	1.2 Les flavonoïdes	13
	1.3 Les tanins	13
	1.4 Les lignanes	13
	2. Les effets biologiques des polyphénols	13
	2.1.Effet antioxydant	13
	2.2.Effet des polyphénols sur les muscles lisses	13
	2.3.Activité anti-inflammatoire	14
	2.4.Activité anticancéreuse	14
	2.5.Polyphénols et les maladies cardiovasculaires	14
	2.6.Polyphénols et les maladies hormono-dépendantes	14
V.	L'inflammation	14
	1. L'inflammation et la dénaturation protéiques	15
VI.	Processus d'hémolyse	16
	1. La membrane érythrocytaire	16
	2. Echanges membranaires du globule Rouge	16
	3. Hémolyse	17
	4. Hyper-hémolyse	18

MATERIELS ET METHODES

I.	Préparation des extraits des grignons d'olive	19
	1. Préparation du matériel végétal	19.
	2. Extractions hydro-alcooliques	19
II.	Détermination, in vitro, de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire du grignon d'olive	21
	1. Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRH)	21
	2. Test de cytotoxicité des extraits	22
	3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique	22

4. Evaluation de l'activité Anti-inflammatoire	23
------------------------------------------------------	----

RESULTATS ET INTERPRETATION

1. Rendements d'extraction des composés phénoliques du grignon d'olive	25
2. Etude des activités biologiques in vitro des extraits de grignon d'olive	25
2.1. Test de cytotoxicité.....	25
2.2. Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges) des extraits bruts des grignons d'olive.	28
2.3. Activité anti-inflammatoire des extraits des grignons d'olive	31

DISCUSSION	34
-------------------------	----

CONCLUSION	38
-------------------------	----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	39
------------------------------------------	----

Introduction

Introduction

I. Introduction :

La culture de l'olivier est concentrée dans le bassin méditerranéen qui représente 98 % de la surface et des arbres en production et 97 % de la production totales d'olive. L'importance de la production oléicole mondiale peut être illustrée par les 600 millions d'arbres qui occupent 7 millions d'ha et produisent annuellement quelque 8,4 millions de tonnes d'olives.

(Nefzaoui, 1988).

L'olive est le fruit de l'olivier (*Olea europaea* L.) (COI, 2011) contenant de l'oleuropeine, ce qui justifie l'amertume qu'il dégage à l'état frais. L'olive atteint son poids maximal après 08 mois suivant la période de floraison et subit des modifications physiologiques et des Changements de couleur indiquant sa maturité et son développement morphologique final

(Bouaziz et al., 2004)

L'huile d'olive est un aliment naturelle équilibré en sa composition chimique est l'une des huiles végétales les plus anciennes et la seule qui peut être consommée sous sa forme brute sans traitement préalable (Boskou, 2006). Les effets bénéfiques de l'huile d'olives vierge ont été attribués à sa teneur élevée en AGMI, particulièrement l'acide oléique, et ses composés mineurs tels que les CP, les tocophérols et les caroténoïdes (Visioli et Galli, 1998).

Donc est une huile Gourmet, très agréable pour la cuisine, un ingrédient excellent et inégalable pour une alimentation saine ou un plan de perte de poids, car elle inhibe l'accumulation de matière adipeuse dans la zone abdominale (Benlemlih et Ghanam, 2012).

Au cours de ces dernières années, l'intérêt porté sur les CP de l'huile d'olive a augmenté à cause de leurs activités biologiques potentielles, jouant ainsi un rôle important dans la santé humaine (Laribi, 2015).

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile (huile d'olive vierge et huile de grignons) laisse deux résidus : l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons). De plus, l'olivier, à travers la taille (annuelle, bisannuelle, de rajeunissement, etc.) engendre des feuilles, des brindilles et du gros bois.(Nefzaoui,1988).

La valorisation de ces résidus est devenue une nécessité pour éviter une pollution de plus en plus sérieuse, contribué à amélioration de la rentabilité de secteur et contribué à combler les déficits fourragers surtout des pays de sud de la méditerranée.

Les champs d'application des sous-produits de l'

Introduction

Olivier sont nombreux et variés. Les possibilités suivantes peuvent être évoquées :

Utilisation des grignons comme aliments pour le bétail, combustible ou pour d'autres fins industrielles, dans le tannage des peaux, Il est encore en service dans quelques petites tanneries a vocation touristique. Utilisation des grignons et des margines comme fertilisants ou comme matières premières pour la production de biogaz, de protéine unicellulaire et voir même d'antioxydants.(**Sebban,2004 ; Nefzaoui, 1991**).

D'autres utilisation des GO dans le domaine thérapeutique, ils ont exercent des effets hypolipémians en abaissant les taux sériques de CT, TG et ont également un effet protecteur contre la graisse de foie. Le traitement aux extraits de GO a permis de rétablir les niveaux d'analyse biochimique du sérum et les activités enzymatiques. (**Jun et al, 2011**).Les GO induit a une diminution de la glycémie et stimule la défense antioxydante tissulaire, en augmentant l'activité enzymatique endogène en particulier, de la SOD, CAT et GPX-Px et non enzymatique tel que l'acide urique et la vitamine C. (**Cherrad et Bouderbala, 2019**). Les GO atténuent les marqueurs du stress oxydant induits par l'hypercholestérolémie et le diabète, en stimulant les activités des enzymes antioxydantes tissulaires. (**Bouderbala, 2016**). Notre travail est pour objectif de déterminer in vitro la cytotoxicité des extraits éthanoliques et méthanolique du GO, et leurs activités biologiques à savoir leur activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire. Le but de cette étude est de valoriser le GO et de l'exploiter dans plusieurs domaines comme la nutrition, la cosmétique et la pharmacologie.

Synthèse

bibliographique

Synthèse bibliographique

I. L'olivier :

1. Description du végétal :

L'olivier (*Olea europea L*) est un arbre méditerranéen par excellence, originaire d'un climat subtropical sec (Lavee, 1997). Il s'adapte bien à des conditions d'environnement extrêmes telles que : la sécheresse, la salinité (Maas et Hoffman, 1977). La chaleur et à des basses températures mais il craint le gel et il s'accommode d'une pluviométrie d'environ 220 mm par an. L'olivier peut atteindre en moyenne 10 à 15m de hauteur et un tronc de 1.50 à 2 m de diamètre dans les régions relativement chaudes, à forte pluviométrie ou abondamment irriguées en été Tandis que, dans les climats froids, les arbres sont généralement plus petits. A l'état naturel, il se maintient en boule compacte et épineuse (Loussert et Brousse, 1978).

2. Historique :

L'olivier, comme la plupart des plantes naturalisées dans le bassin méditerranéen, est Originaire de la région caucasienne où sa culture commença il y a 6 000 ou 7 000 ans, puis il se diffusa sur les côtes de la Syrie, de la Palestine et en Egypte (Villa ,2006).

L'olivier est cité dans le saint Coran comme étant un arbre béni, symbole de l'homme universel et l'huile d'olive, est source de la lumière divine pour guider les hommes.

L'origine de l'olivier se perd dans la nuit des temps, son histoire se confond avec des civilisations qui ont vu le jour autour de bassin méditerranéen, et ont pendant longtemps régi les destinées de l'humanité et marqué de leur empreintes la culture occidentale (COI ,2007).

En Algérie, la culture de l'olivier remonte à la plus haute antiquité. Nos paysans s'y consacraient avec art durant plusieurs siècles (Alloum, 1974). L'olivier et ses produits constituaient alors l'une des bases essentielles des activités économiques de nos populations rurales. L'huile d'olive faisait l'objet d'un commerce intense entre l'Algérie et Rome, durant l'époque romaine. Depuis cette époque, l'histoire de l'olivier se confond avec l'histoire de l'Algérie et les différentes invasions ont eu un impact certain sur la répartition géographique de l'olivier dont nous avons hérité à l'indépendance du pays (Mendil et Sebai, 2006).

3. Classification botanique de l'olivier :

Tableau 1: classification botanique de l'olivier (Strikic et al, 2010).

Règne :	Plantes
Sous- règne :	Tracheobionate
Division :	Magnoliphytes
Embranchement :	Spermaphytes
Sous- Embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Astéridées
Ordre :	Gentianales
Famille :	Oléacées
Genre :	Olea
Espèce :	Oleauropea

- OleauropeaL .est un complexe formé de six sous espèces dont Oleauropeasubsp. europaea qui correspond à l'olivier méditerranéen (Green et Wickens, 1989). Ce dernier comprend la forme cultivée, O. europaea var. europaea et la forme sauvage ou oléastre, O.europaea var. sylvestris.

4. Le fruit (l'olive) :

Est une drupe variable, globuleux, ovoïde (ellipsoïde).en allant de l'extérieur vers l'intérieur, elle est constitué de l'épicarpe (peau), mésocarpe (pulpe ou chair), très riche en lipides, l'endocarpe (paroi de noyau) et le noyau à amande huileuse (**Bonnet, 1960**). ses dimensions sont très variables selon les variétés (il pèse de 2 à 12 g) (**Loussertet brousse,1978**), elle est composée de : l'eau(50%) , huile(22%),les sucres(19.1%),cellulose(5.8%),protéine(1.6%), et les cendres(1.5%).(**COI ,2002**).C'est un aliment et source d'une huile alimentaire issue de son enveloppe charnue riche en graisses lors de la trituration des fruits (**Paris et Moysse, 1971**).

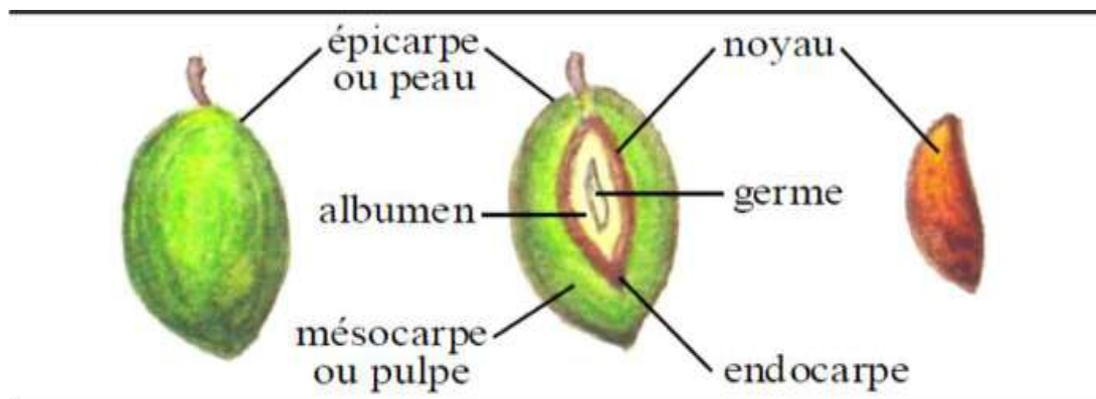


Figure 1 : Le fruit de l'olivier (**Amouretti et Comet, 2000**).

II. Généralités sur les sous-produits de l'oléiculture :

1. Production oléicole en Algérie :

L'Algérie est l'un des premiers producteurs mondiaux d'huile d'olive, elle se positionne après l'Espagne, l'Italie, la Grèce, la Tunisie, le Maroc et la Turquie (**Bensemmane, 2009**).

l'olivier occupe en Algérie une superficie de 165000 ha de plantation en rapport soit 36% la superficie arboricole.(**M.C,1973**).

La production d'huile d'olives est une activité traditionnelle en Algérie. L'activité Compte près de 1650 huileries, dont seulement 165 huileries modernes (**Vossen, 2013**).

L'Algérie vise à moderniser le secteur de l'huile d'olive afin d'améliorer la qualité et la quantité du produit.(**CIO, 2014**).

Durant la campagne 2012/2013, la production oléicole algérienne était de 66 000tonnes d'huile soit 2.72% de la production mondiale (**Barjol, 2014**). Alors que la production d'huile d'olive durant la campagne 2014-2015, atteignait 200 000 tonnes (**COI, 2015**).

2. Huile d'olive :

L'huile d'olive est obtenue par trituration des péricarpes des fruits et pas de leurs graines, dans un moulin à huile spécifique. La teneur en huile varie en fonction du terroir, de la variété (cultivar), du stade de maturité à la récolte et des pratiques agronomiques locales. (**Ben Sassi et al, 2006**).

3. Extraction d'huile d'olive :

Le schéma de l'extraction récemment mis en œuvre comprend quatre opérations principales :

1. Nettoyage des fruits (défoliation, lavage des olives);
2. Préparation de la pâte (broyage, malaxage);
3. Séparation de la phase solide (grignons) et liquide (huile et eau de végétation);
4. Séparation des phases liquides (huile / eau de végétation). (**Carluccio et al., 2003**).

4. Les sous-produits de l'oléiculture :

4.1. Déchets liquides (margines) :

Le procédé d'extraction de l'huile d'olive engendre la production d'effluents liquides, nommés margines ou parfois eaux de végétation. Le pressage de 1 tonne d'olives produit en moyenne 1,5 tonnes de margines avec les modes de production modernes. Les variations constatées dépendent des processus d'extraction à savoir le lavage préalable ou non des olives et l'humidification des pâtes durant le pressage (**Benyahia et Zein, 2003**).

4.2. Déchets solides (grignon d'olive) :

Le GO est un déchet solide résulte de l'extraction d'huile des olives entières broyées. Issus par pression (système discontinu) ou par centrifugation (système continu) (**Benyahia et Zein, 2003**).

III. Grignon d'olive :

1. Définition :

Les grignons sont les résidus solides issus de la première pression ou centrifugation et sont formés des pulpes et noyaux d'olives. Ce produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite de GO après extraction chimique. (**Benyahia et Zein, 2003**). Selon le procédé d'extraction et l'équipement des huileries, il est possible de distinguer trois types de grignons (**Chaabane et al, 1997**) : le grignon brut, le grignon épuisé, le grignon partiellement dénoyauté.

2. Types de grignon d'olive :

Les GO sont disponibles en quantités importantes dans de nombreux pays méditerranéens. En fonction du procédé d'extraction et l'équipement des huileries, il est possible de distinguer quatre types de grignons :

- 2.1. *Les grignons bruts* : issus des huileries utilisant le système traditionnel de presses hydrauliques et les scourtins, ses teneurs relativement élevés en eau et en huile favorisent son altération rapide lorsqu'ils sont laissés à l'air libre.
- 2.2. *les grignons épuisés*, obtenus après traitement des grignons bruts aux solvants qui est généralement de l'hexane pour l'obtention d'huile utilisée en savonnerie.
- 2.3. *les grignons issus des huileries modernes* : utilisant le procédé d'extraction en chaîne continue ou super presses. Ils sont particulièrement riche en eau et fermentent très rapidement (Chaabane et al,1997).
- 2.4. *le grignon partiellement dénoyauté* : provient de la séparation partielle du noyau de la pulpe par tamisage ou ventilation
 - si son huile n'est pas extraite par solvant, il est dit « gras »
 - si son huile est extraite par solvant, il est dit « dégraissé ou épuisé » (Nefzaoui,1987).

3. Valorisation du grignon d'olives :

3.1. Caractéristiques de grignon d'olive :

3.1.1 Caractéristiques physique du grignon d'olive :

La composition physique des grignons varie en fonction de la variété des olives triturées, de leur degré de maturation et du système employé lors de l'extraction de l'huile. (Sansoucy, 1984).

Synthèse bibliographique

Tableau 2 : Les différents composants du grignon d'olive (Sansoucy, 1984).

Composants	Olive(%)	GO brut (%)	GO épuisé (%)
Eau	49	27	17
Huile	27	9	2
Coque	14	43	55
Pulpe	9	21	26

3.1.2 Caractéristiques Chimiques des grignons d'olives :

La composition chimique du GO varie selon La variété et stade de maturité d'olives triturées (facteurs intrinsèques), du procédé d'extraction de l'huile et de l'épuisement par solvant. (Nefzaoui,1985).

Tableau 3 : composition chimique indicatif des différents types de grignon (Olhde et Becker, 1982).

Type	Matière sèche	%de la matière sèche			
		Matières minérales	Mat. azotées totales	Cellulose brute	Matières grasses
Grignon brut	75-80	3-5	5-10	35-50	8-15
GO. Gras part. dénoyauté	80-95	6-7	9-12	20-30	15-30
Grignon épuisé	85-90	7-10	8-10	35-40	4-6
GO. épuisé pat. dénoyauté	85-90	6-8	9-14	15-35	4-6
Pulpe grasse	35-40	5-8	9-13	16-25	26-33

- ***La cellulose brute :***

Le taux de cellulose brute est élevé dans les grignons non dénoyauté. Le dénoyautage partiel réduit cette teneur, mais la pulpe pure contient autour de 20% de cellulose brute. L'analyse des fibres par la méthode de Van Soest et al (1975) révèle que les ont

Synthèse bibliographique

des teneurs très élevées en constituants pariétaux (NDF), en lignocellulose (A en lignine (ADL) (**tableau5**).

Tableau 4 : Caractéristiques des constituants pariétaux des grignons. (1) Nefzaoui, 1979 ;(2) Alibes et al, 1983 ; (3) Ohlde et Becker,1982.

	GO épuisé(Tunisie)(1)	GO épuisé partiel dénoyauté		
		Tunisie(1)	Espagne(2)	Grèce(3)
N.D.F	72	55	70	83
A.D.F	60	45	-	64
A.D.L	31	29	31	24

Le tamisage paradoxalement réduit donc surtout la cellulose et très peu la lignine. Cette composition en constituants pariétaux des GO est comparable à celle des pailles de céréales avec un degré de lignification apparemment plus élevé.(Sansoucy,1984).

- **Les matières azotées totales :**

Leurs teneurs varient selon le type de grignon (**tableau5**) mais restent relativement modestes. L'azote protidique constitue plus de 95% de l'azote total et sa solubilité est particulièrement faible (1.5%de l'azote total selon Zelter 1968, cité par Theriez et Boule, 1970, et Gomez –Cabrera, 1983, (communication personnelle), 3%selon Nefzaoui 1983). D'ailleurs une grande partie des protéines (80-90%) est liée à la fraction lignocellulosique (ADF –N) (**Sansoucy, 1984**).

- **Matières grasses (les lipides) :**

La teneur en matière grasse est relativement élevée et demeure tributaire du mode d'extraction de l'huile. Selon **Sansoucy, 1984**; elle représente de 8 à 15% de la matière sèche.

La matière grasse des grignons est très riche en AG en C16 et C18 insaturés et qui constituent 96% du total des AG. Les grignons sont très vulnérables à l'oxygène atmosphérique responsable en grande partie de l'altération des propriétés organoleptiques.

Synthèse bibliographique

Les matières grasses du grignon brut peuvent constituer un apport d'énergie important, mais dans le cas des grignons épuisés, cet apport est limité (**Alibes et al, 1983**).

- ***Les matières minérales (cendres) :***

Les teneurs des matières minérales (cendres brutes) sont faible (3 a 5%). L'augmentation des teneurs est due a l'absence de lavage et aux contaminations prévenant du sol.(**Nefzaoui, 1988**).

- ***Les polyphénols :***

le GO n'est pas riche seulement en lignocellulose mais également en divers CP avec une faible teneur : des PP solubles dans les solvants, des PP s'attachés aux parois cellulaires, des flavonoïdes et des tanins (hydrolysables et condensés).(**Zaidiet al,2009**).

4. Utilisations concurrentielles des grignons :

4.1. Utilisation des grignons comme combustible :

Elle a représenté et représente encore dans la majorité des payes, l'application la plus courante. En réalité le GO est un combustible de valeur calorifique moyenne (2950K cal/Kg). Cette quantité de chaleur est apportée principalement par la coque qui représente 60% du total et qui a un pouvoir calorifique relativement élevé (4000K cal/Kg). La pulpe n'apporte que peu de calories (1400K cal/Kg). De plus la coque représente une fraction sans intérêt pour l'animal, ce qui corrobore tout l'intérêt du tamisage. (**Nefzaoui, 1991**).

4.2. Utilisations possibles de la coque :

Après séparation, la coque peut être utilisée comme combustible ou comme matière première pour la fabrication du furfural. Elle peut aussi être utilisée dans l'industrie du bois (fabrication de panneaux de particules).

Les informations dignes d'intérêt sont celles relatives à l'industrie du furfural. La coque séparée des grignons a un contenu en pentosanes de 26% ce qui représente 15% de furfural de la matière première humide (**Nefzaoui , 1987**). Le procédé d'obtention du furfural peut être continu ou discontinu, mais de toute façon l'obtention d'un rendement adéquat pour rentabiliser l'opération n'est pas encore atteinte. La principale difficulté de ce procédé reste le prix de la coque (cout de la séparation, utilisation concurrentielle comme combustible,...). (**Nefzaoui, 1991**).

Synthèse bibliographique

4.3. L'extraction d'huile restante :

Quand les GO bruts ne sont pas destinés à la fermentation, La première étape de leurs valorisations est l'extraction de l'huile résiduelle à l'aide d'un solvant organique (l'hexane). Cette technique permet la récupération d'au moins 6% d'huile appelée souvent « huile de grignons ». (Yacoub, 1997). Cette huile ne peut pas et réutilisée dans l'alimentation parce que, en plus d'une forte acidité, elle contient du benzo(a)pyrène dont la teneur dépasse parfois les 260 mg/kg[10], valeur largement supérieure au seuil de la norme internationale pour l'huile de table qui est de 2mg/l. L'huile de grignon obtenue a partir d'une extraction a l'hexane rentre dans la fabrication du savon et de la glycérine. Les caractéristiques de l'huile sont données dans le tableau. (Sebban et al.2004).

Tableau 5 : caractéristiques de l'huile brute de grignon. (Sebban et al.2004).

Paramètre	valeur
Indice d'acidité	68
Indice d'iode	83
Indice de saponification	171
Indice de peroxyde	9.6
Indice de réfraction	1.4618
Benzo(a)pyrène	260/kg

4.4. Savon :

L'obtention de savon a partir de l'huile extraite se fait en traitant par hydrolyse l'huile en présence de soude a 30 %.Nous obtenons deux phases, une phase solide qui est le savon, et une phase aqueuse, riche en glycérine. Le savon lave et sèche a l'air a une couleur beige. Il est lisse au toucher et sa mousse est abondante et consistante. (Sebban et al.2004).

4.5. Charbon actif :

La préparation des charbons actifs a partir des GO par activation chimique .L'avantage de l'activation chimique est d'opérer a des températures faibles et des temps de séjours courts. Des charbons actifs de bon qualité et développant une structure poreuse importante avec des grandes surfaces spécifiques, sont préparés à partir des matériaux lignocellulosiques en utilisant des agents chimiques comme H₃PO₄ et KOH.(Ounas et al ,2009).

4.6. *Ingrédient des matériaux de construction :*

L'usage de GO dans la fabrication de la brique constitue une percée Intéressante à plusieurs points de vue. Il présente l'avantage d'utiliser une matière première renouvelable.

L'ajout des matières organiques qui brûlent pendant la cuisson, fait diminuer la masse volumique de la brique. Les briques sous cet effet deviennent plus légères et contribuent à baisser la charge morte dans les bâtiments. L'emploi de briques légères permet de réduire les dépenses de transport et le coût des murs. **(Djadouf et al ,2011).**

IV. *Les polyphénols :*

1. *Définition :*

Les PP sont des métabolites secondaires des végétaux. Ils sont l'un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques. La structure fondamental qui les caractérisent est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction chimique **(Bruneton ,1999).**

Les CP (acide phénoliques, flavonoïdes simples et pro anthocyanidines) constituent les groupes des composés phytochimiques le plus important des plantes **(Beta et al, 2005).** Ils sont impliqués dans la croissance cellulaire, ils sont utilisés dans le domaine thérapeutique comme vasoconstrictrice, Anti-inflammatoire, inhibitrice enzymatiques, antioxydants et antimicrobiens **(Djemai, 2008).**

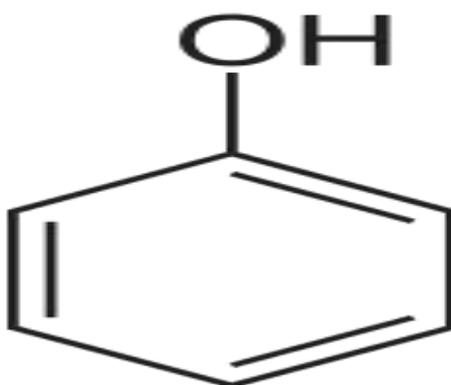


Figure 2 : Structure du noyau phénol. **(Stookey , 1970).**

Synthèse bibliographique

1.1. Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont les dérivés principaux de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique, ils comportent un radical COOH. Ils se trouvent souvent sous la forme de glycosides ou d'esters. Ils sont largement répandus chez les plantes. (Dacosta, 2003).

1.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux. Ils sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Le noyau flavone est lui-même un dérivé du noyau flavane de base (Milane, 2004). Les flavonoïdes se divisent en plusieurs classes:

- Chalcone Flavanone Flavone
- Dihydroflavonol Flavanol Flavonol
- Isoflavone Anthocyanidol.

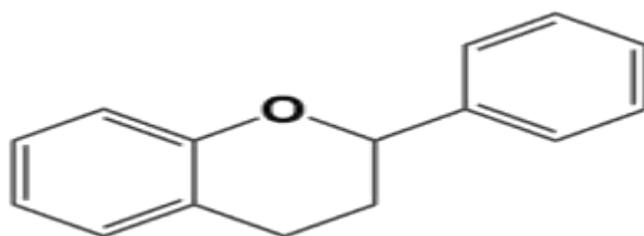


Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes (Korkina, Afanas'ev, 1997).

1.3. Les tanins :

Les tanins sont des PP qu'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres, les fruits, etc..... Les tanins sont des PP solubles dans l'eau et les solvants polaires (Hagerman, 2002). Ce sont un des polymères phénoliques, ils forment des complexes avec les protéines et aussi les polysaccharides (Okuda et Ito, 2011).

1.4. Les lignanes :

Ils sont des composés qui possèdent deux noyaux phénoliques sont reliés par quatre atomes de carbone. Les lignanes se trouvent souvent dans les tissus soumis à lignification chez les Angiospermes et le bois des Gymnospermes. (Krief, 2003). Ils ont la propriété de tanner la peau. (Ghestem et al., 2001).

2. Les effets biologiques des polyphénols :

2.1. Effet antioxydant :

L'activité antioxydante est la propriété la mieux décrite des PP, ainsi, leur capacité à piéger les radicaux libres. D'après Halliwell (1994), les mécanismes d'action d'un

Synthèse bibliographique

antioxydant peuvent comprendre : le piégeage direct des ROS, et l'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS.

2.2. Effet des polyphénols sur les muscles lisses :

Les pp exercent des effets relaxants sur la contraction de divers muscles lisses, tels que les muscles lisses vasculaires (**Ajay et al, 2003; Herrera et al, 1996**), les muscles de la vessie (**Dambros et al, 2005**) et les muscles de l'utérus (**Revuelta et al, 1997**).

2.3. Activité anti-inflammatoire :

L'acide arachidonique est converti en prostaglandines et leucotriènes sous l'action de deux enzymes (la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase) induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Dans l'activité anti-inflammatoire, les pp impliquent des mécanismes moléculaires incluent : l'inhibition des enzymes liées à l'inflammation comme la cyclo-oxygénase et la lipooxygénase, comme ils peuvent agir sur d'autres niveaux moléculaires. (**Yoon et Baek, 2005**).

2.4. Activité anticancéreuse :

La prévention du cancer est parmi les propriétés biologiques intéressantes des pp. En effet, des recherches ont montré que les pp pourraient être utilisés comme des agents de prévention des différentes maladies cancéreuses (**Stagoset al, 2012**)

2.5. Polyphénols et les maladies cardiovasculaires :

Les pp préviennent de l'oxydation des lipoprotéines de faible Densité (LDL) au niveau des artères, évitant ainsi l'athérosclérose. Ils empêchent l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui provoque l'occlusion des artères. Ainsi ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (**Akroum, 2010 et al**).

2.6. Polyphénols et les maladies hormono-dépendantes :

La prévention contre l'ostéoporose est l'exemple le plus important. Ceci en modulant la réponse aux œstrogènes endogènes. Certains pp et plus particulièrement les isoflavones du soja ont une affinité importante pour les récepteurs d'œstrogènes et sont qualifiés pour cela de phyto-œstrogène (**Gerber et al, 2006**).

Synthèse bibliographique

V. L'inflammation :

L'inflammation est la réponse du système immunitaire à des stimuli nocifs, tels que les agents pathogènes, les cellules endommagées, les composés toxiques ou l'irradiation (Medzhitov, 2010), et agit en éliminant les stimuli nuisibles et en initiant le processus de guérison (Ferrero-Miliani et al, 2007). Habituellement, lors de réactions inflammatoires aiguës, les événements et interactions cellulaires et moléculaires minimisent efficacement les blessures ou infections imminentes. Ce processus d'atténuation contribue à la restauration de l'homéostasie tissulaire et à la résolution de l'inflammation aiguë. Cependant, une inflammation aiguë non contrôlée peut devenir chronique, contribuant ainsi à diverses maladies inflammatoires chroniques (Zhou et al, 2016).

Au niveau des tissus, l'inflammation se caractérise par une rougeur, un gonflement, une chaleur, une douleur et une perte de fonction tissulaire, qui résultent des réponses immunitaires, vasculaires et inflammatoires locales des cellules à l'infection ou à la blessure (Takeuchiet al, 2010). Les événements microcirculatoires importants qui se produisent pendant le processus inflammatoire comprennent les changements de perméabilité vasculaire, le recrutement et l'accumulation de leucocytes et la libération de médiateurs inflammatoires (Chertov, 2000, Ferrero-Miliani et al ,2007).

Les étiologies de l'inflammation peuvent être infectieuses ou non infectieuses (Tableau 7). En réponse à une lésion tissulaire, l'organisme déclenche une cascade de signalisation chimique qui stimule des réponses visant à cicatriser les tissus affectés. Ces signaux activent la chimiotaxie des leucocytes de la circulation générale vers les sites de lésions. Ces leucocytes activés produisent des cytokines qui induisent des réponses inflammatoires (Jabbour et al ,2009).

Tableau 6 : les étiologies de l'inflammation. (Jabbour et al ,2009).

Facteurs non infectieuses	Facteurs infectieuses
<p>-Physique : brûlures, gelures, blessures physiques, corps étrangers, traumatismes, radiations ionisantes.</p> <p>-Chimique : glucose, acides gras, toxines, alcool, irritants chimiques (y compris fluorure, nickel et autres oligo-éléments).</p> <p>-Biologique : cellules endommagées.</p> <p>-Psychologique : l'excitation.</p>	Bactéries, virus et autres microorganismes.

Synthèse bibliographique

1. L'inflammation et la dénaturation protéiques :

Une réaction inflammatoire non immune peut conduire à une inflammation immune après dénaturation des protéines endogènes devenues auto-antigéniques (Clos, 2012). L'exposition d'une cellule au choc thermique provoque : l'altération des protéines (Les protéines sont dénaturées lorsqu'elles perdent leur structure tridimensionnelle (conformation spatiale) et donc le repliement caractéristique de leur structure, la réponse au choc thermique et la ou l'élimination des protéines dénaturées (Nguyen et al, 1989 in Lanneau, 2010).

VI. Processus d'hémolyse :

1. La membrane érythrocytaire :

Les GRh ou érythrocytes aussi hématies, sont des cellules dépourvues de noyau (anucléées) en forme de disque biconcave contenant essentiellement l'Hb, un pigment respiratoire qui assure le transport d'un élément indispensable à la vie, l'oxygène, des poumons aux tissus, et aussi le transport du CO₂ des tissus aux poumons. (Girasole et al, 2012). Le bon fonctionnement de la cellule dépend de l'intégrité de la membrane cellulaire et le maintien de sa structure.

La membrane érythrocytaire comporte une bicouche lipidique constituée de cholestérol, des sphingolipides et des phospholipides (Mohandas et Gallagher, 2008). Cette bicouche est traversée de part en part par des protéines transmembranaires, sur ces protéines se fixent des glucoses qui déterminent les groupes sanguins, le cytosquelette renferme plusieurs protéines dont la spectrine, l'ankyrine et l'actine (Manaargadoo et al, 2016).

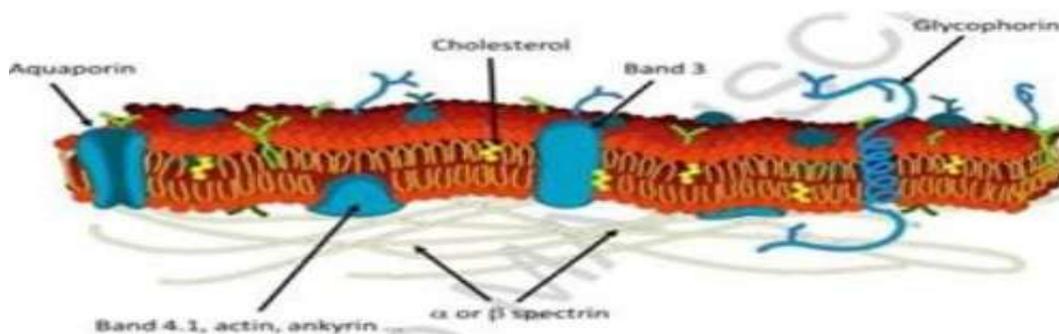


Figure4 : Structure de la membrane érythrocytaire (Dodge et al, 1963).

2. Echanges membranaires du globule Rouge :

Les transports transmembranaires peuvent être regroupés en deux mécanismes (**Figure 5**) : selon le gradient de concentration (les transports passifs), contre le gradient de concentration (les transports actifs). La pompe à sodium est analogue à une ATPase magnésium dépendante qui permet la sortie de 3 Na⁺ du GRh et l'entrée de 2 K⁺. Le fonctionnement de cette pompe nécessite la présence l'ATP issu de la glycolyse anaérobie. Il existe également une pompe ATPase magnésium-dépendante qui permet le passaged'un ion Ca²⁺hors de l'hématie. Au niveau de la protéine 3 transmembranaire se dérouleLe transport des anions, notamment les ions Cl⁻ et HCO³⁻. La sortie d'acide carbonique est contrebalancée par une entrée d'ions Cl⁻. (**Lenormand, 2001 ; Portier et al, 2007**).

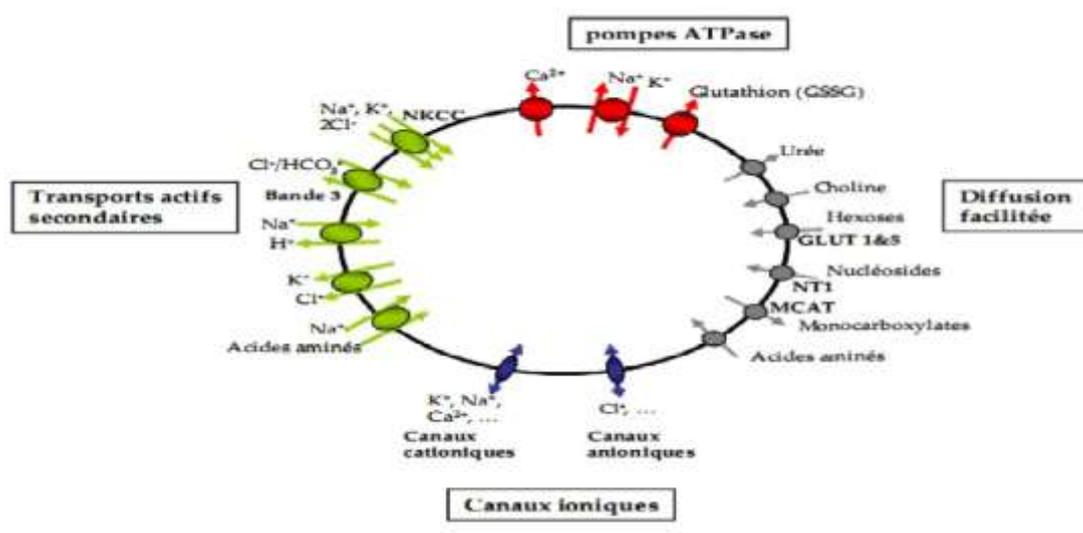


Figure 5 : les échanges de la membrane érythrocytaire (**Jauréguiberry, 2015**).

3. Hémolysé :

L'hémolyse (hemo : sang, lyse : perturbation) est un phénomène physiologique irréversible qui provoque une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'Hb, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des GRh (**Lippi et al, 2011**). Ce processus est détecté visuellement en montrant une teinte rose à rouge dans le plasma après centrifugation où en mesurant la densité optique d'Hb par

Synthèse bibliographique

spectrophotométrie (Mezzou et al, 2006). L'hémolyse est exprimée par une augmentation des taux sériques en hémoglobine avec une augmentation du LDH, de phosphate et de la CK(Ali et al, 2014).

4. Hyper-hémolyse :

L'hyper hémolyse est le dépassement du processus physiologique de lyse des hématies qui devient pathologique, ce phénomène est dû à une destruction excessive des GRh ou à un raccourcissement de leur durée de vie. Il peut être intra vasculaire (dans les vaisseaux) ; l'Hb libérée se lie alors à l'haptoglobine. Comme, il peut être extravasculaire (hors des vaisseaux), notamment au niveau de la rate (Béraud, 2014).

Ce phénomène peut se produire par l'introduction d'agents chimiques (médicaments), capables de modifier l'intégrité cellulaire en induisant une réorganisation et des changements morphologiques qui résultent d'une cascade d'effets à partir de l'altération de la membrane lipidique conduisant finalement à la formation de sphérocytes et par conséquent à la lyse des hématies.(Portier et al, 2007 ; Manaargadoo et al, 2016).

Matériels

Et

Méthodes

Matériels et méthodes

L'étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de recherche " Ppabionut " Faculté des Sciences de la Nature et de la vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen..

I. Préparation des extraits des grignons d'olive :

1. Préparation du matériel végétal :

Les GO utilisés dans notre expérimentation sont collectés au niveau d'une huilerie locale de la région d'OUZIDENE wilaya de Tlemcen.

Après séchage du GO brut pendant à l'air libre (dans un endroit sec, ventilé et ombragé), celui-ci a été broyé à l'aide d'un Moulinex pour obtenir une poudre.

2. Extractions hydro-alcooliques :

Les tests biologiques sont réalisés sur des extraits hydro-méthanoliques et hydro-éthanoliques :

1. Dans deux béchers différents mettre 5g de la poudre du GO avec 20 ml d'eau distillé puis 80ml du solvant méthanol sont ajoutés dans le premier bécher et 80ml du solvant éthanol sont ajoutés au deuxième bécher.



Figure 6: grignon d'olive en poudre fine.

1. macération : laisser les mélanges macérer pendant 24 heures à l'obscurité, et à une température ambiante.
2. Filtration : Filtrer sur papier filtre (**figure7**).

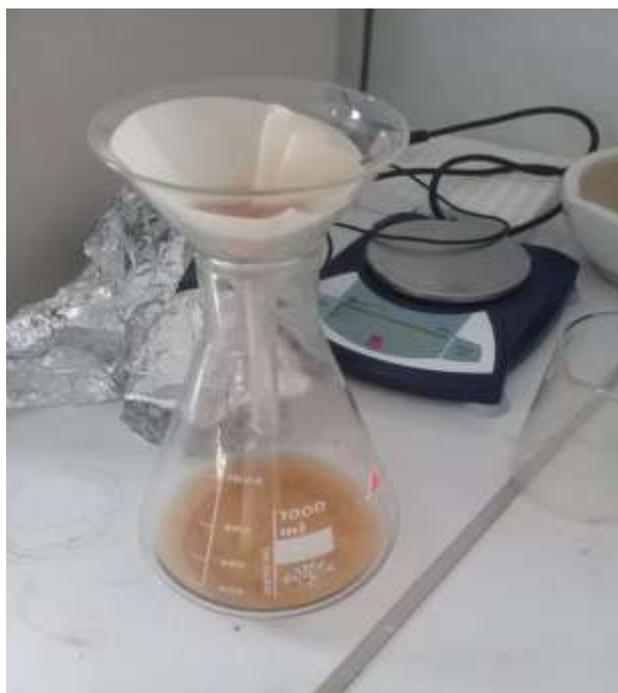


Figure7 : la filtration de la macération de grignon d'olive.

3. L'évaporation : Le filtrat placé dans un rotavapeur à 40 °C (**figure8**) pour assurer l'évaporation du solvant.



Figure 8 : Photographie du Rotavapor utilisé.

Matériels et méthodes

Le rendement en pourcentage de grignon d'olive en extrait sec a été calculé par la formule :

$$R(\%) = (M / M0).100$$

- R(%) : rendement en pourcentage.
- M : masse en gramme de l'extrait sec résultant.
- M0 : masse en gramme du matériel végétal de départ.



Figure 9 : Extraits de grignon d'olive après séchage.

II. Détermination, in vitro, de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire du grignon d'olive :

1. Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRH) :

Des échantillons de sang frais (environ 8 ml) ont été récupérés dans des tubes héparinisés, au niveau du laboratoire, où la prise de sang a été effectuée, sur des volontaires (20-45 ans).

Les différents échantillons de sang humain récupérés sont centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min, afin d'éliminer le plasma et les cellules polynucléaires. Ensuite, le culot de GRH est lavé trois fois, avec un volume équitable de solution iso-saline. Après cette étape, le volume a été mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10% (v/v) (GRH), avec une solution iso-saline et utilisé immédiatement.

2. Test de cytotoxicité des extraits :

Avant d'entreprendre le test de l'activité anti-hémolytique des extraits du GO, un test de toxicité est nécessaire, afin de cibler les concentrations à utiliser.

Le principe de ce test est de mettre en contact des hématies avec les extraits méthanolique, éthanolique, à différentes concentrations, dans une solution isotonique et de suivre le taux d'Hb libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de ces extraits, vis-à-vis, des GRh.

- *Mode opératoire :*

Le protocole suivi est celui de Bulmus et ses collaborateurs (2003), où un volume de 1.6 ml de l'extrait méthanolique, éthanolique ou et l'acide gallique, molécule de référence de CP a été mélangé avec un volume de 0.4 ml de la suspension de GRH (10%)

- Deux contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait avec de l'eau physiologique (contrôle négatif) ou avec de l'eau distillée (contrôle positif correspondant à 100% d'hémolyse).

Le mélange réactionnel a été incubé à 37⁰C, pendant 30 min, ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min et l'absorbance de l'Hb libérée a été mesuré à 560 nm.

- *Expression des résultats :*

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\%d'hémolyse = (At/Ac) \times 100$$

Où : Ac = Absorbance du contrôle ; At = Absorbance du test.

3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique :

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des extraits à empêcher l'hémolyse des GRh, induite par l'hypotonie et la chaleur et donc prévenir la libération de l'Hb. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par (Sadique et al, 1989 ; oyedapo et al, 2010).

Matériels et méthodes

- **Mode opératoire :**

Le milieu réactionnel contenant 0,5 ml de l'extrait des GO, du Diclofénac sodique ou l'acide gallique à différentes concentrations, mélangé avec 1,5mL du tampon phosphate (0,9% NaCl, pH=7,4) et 2ml d'une solution hypo-saline (0,36% NaCl), est incubé à 37°C pendant 20 min. Ensuite 0,5 ml de la suspension de GRh (10%) sont ajoutés à chaque concentration et une deuxième incubation est réalisée à 56°C pendant 1h. Au final, les tubes sont refroidis sous l'eau courante et suivis par une centrifugation à 2500rpm pendant 5min. Les absorbances du surnageant sont mesurées à 560 nm. En parallèle, un contrôle est réalisé en remplaçant l'extrait avec 0,5 ml du tampon phosphate.

- **Expression des résultats :**

Le pourcentage de stabilité membranaire a été estimé à partir de l'expression suivante :

$$\% \text{ de stabilité membranaire} = (Ac - At / Ac) \times 100$$

Où : Ac = Absorbance du contrôle. At = Absorbance du test.

4. Evaluation de l'activité Anti-inflammatoire :

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Williams et al, 2008**). De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plantes sur l'activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode de la dénaturation des protéines (**Bouhlali et al, 2016**). L'activité anti-inflammatoire in vitro des extraits de GO a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (**Chandra et al, 2012**). La méthode consiste à préparer quatre solutions.

1. La solution d'essai (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de SBA 5 % et 0,05 ml d'extrait avec une concentration de 250 pg/ml (*test solution*).
2. La solution control test (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé (*test control*).
3. La solution contrôle produit (0,5 ml) composée de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml d'extraits avec une concentration de 250 pg/ml (*control*).

Matériels et méthodes

4. La solution standard test (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodium avec une concentration de 250 pg/ml (*étalon*).

Toutes les solutions au-dessus ont été ajustées à pH 6,3 par une solution d'HCl (1N).

Les échantillons ont été incubés à 37 ° C pendant 20 min, ensuite la température était augmentée pour garder les échantillons à 57° pendant 3 min.

Après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution phosphate buffer saline (Ph=6,3) a été ajouté aux solutions ci-dessus. L'absorbance a été lue par le spectrophotomètre UV – visible à 416 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\%d'inhibition = 100 - [(DO \text{ test solution} - DO \text{ control} / DO \text{ test control}) \times 100].$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le diclofénac sodium (250ug/ml).

Résultats

Et

Interprétations

Résultats et interprétations

1. Rendements d'extraction des composés phénoliques du grignon d'olive :

Le calcul des rendements est réalisé pour les deux macérations ; le grignon sec dans le solvant méthanol, le grignon sec dans le solvant éthanol. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau 8.

Tableau 7 : Rendements de la macération du grignon d'olive dans différents solvants :

Macérations	Extrait méthanolique	Extrait éthanolique
Rendements (%)	9%	8%

Les résultats montrent que l'extraction des PP par le méthanol est meilleure avec un rendement de 9% par rapport à l'éthanol qui représente un rendement de 8%.

2- Etude des activités biologiques in vitro des extrais de grignon d'olive :

2.1. Test de cytotoxicité

Le test in vitro de cytotoxicité représenté par le pourcentage d'hémolyse des GRh est effectué en utilisant des GRh d'un donneur sain en bonne santé.

Différentes concentrations de l'extrait brute de GO méthanolique et éthanolique , ainsi qu'une molécule de référence, l'acide gallique, ont été testés. Le pourcentage de l'hémolyse est évalué pour chaque extrait, en mesurant l'absorbance de l'Hb libérée des GRh par hémolyse, en comparaison au contrôle négatif (C-, solution de GRh dans de l'eau physiologique, ayant un taux d'hémolyse très faible, 15%) et au contrôle positif (C+, solution de GRh dans de l'eau distillée afin de provoquer une hémolyse totale, 100% d'hémolyse).

Les résultats obtenus sont représentés dans les Figures 10, 11, 12,13 et 14.

Résultats et interprétations

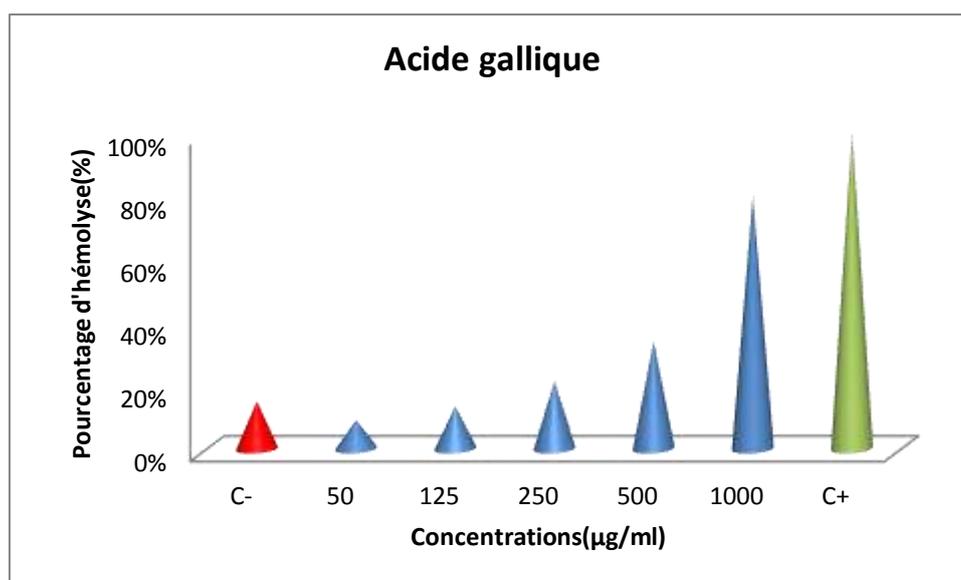


Figure 10. Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique.

C- : 15% ; C+ : 100%

Nos résultats montrent que l'acide gallique représente un effet hémolytique faible (13.40 %) à la concentration de 125 $\mu\text{g/mL}$ en comparaison avec le contrôle négatif (C- : 15 %). Cet effet hémolytique augmente à un taux de 21.30%, à la concentration de 250 $\mu\text{g/mL}$ et un taux de 34% à la concentration 500 $\mu\text{g/ml}$ et atteint un maximum de 80 % à la concentration 1 mg/mL (Figure 10).

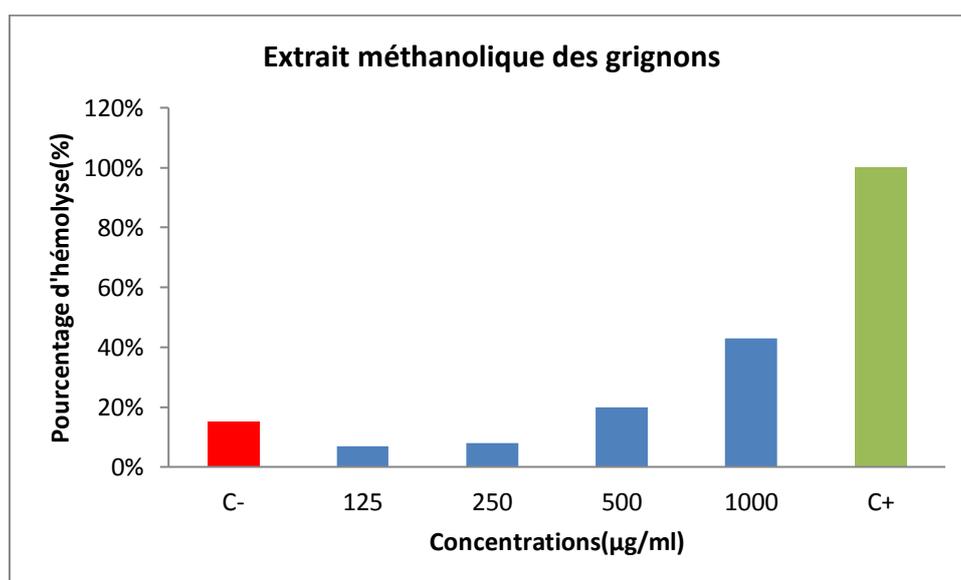


Figure 11. Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'extrait méthanolique des grignons d'olive.

C- : 15% ; C+ : 100%

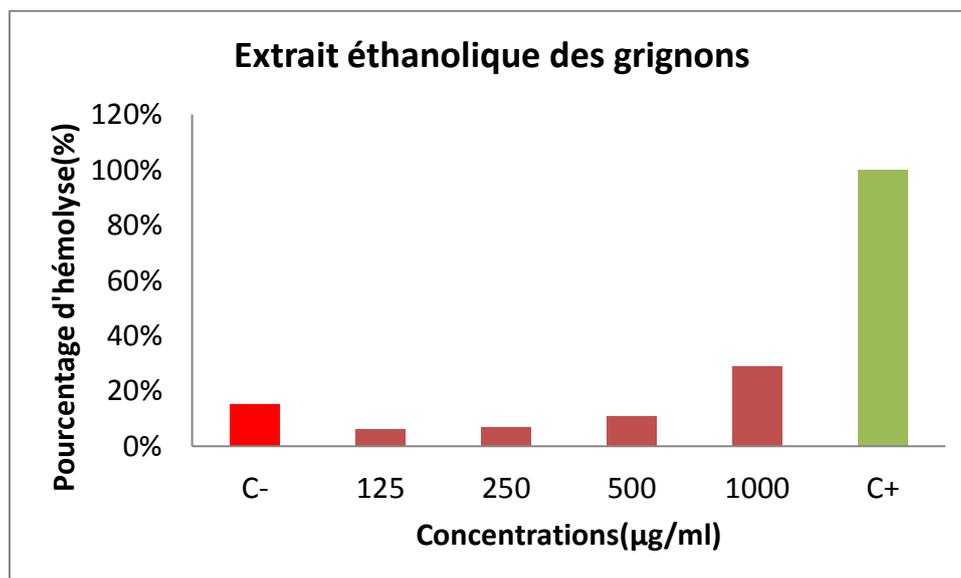


Figure 12. Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'extrait éthanologique des grignons d'olive.

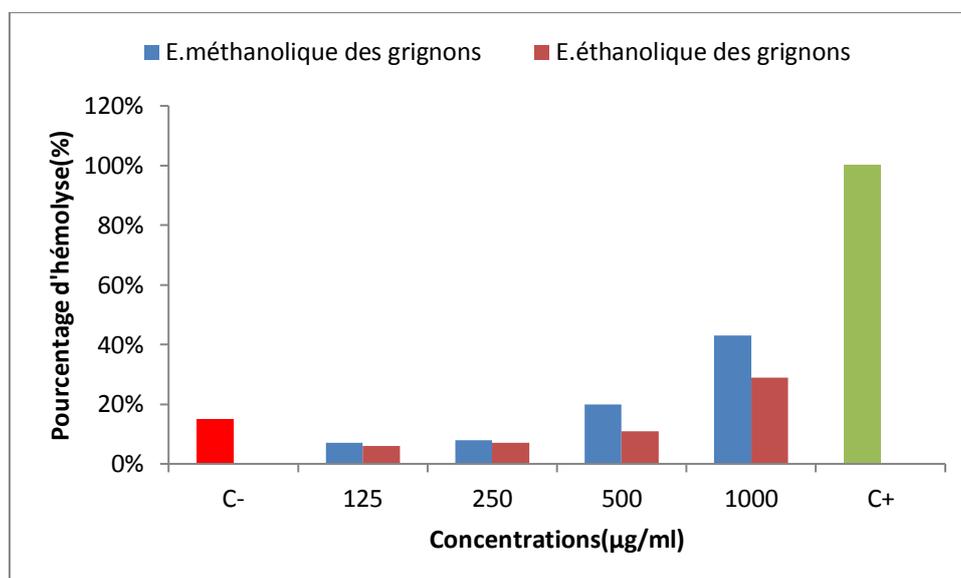


Figure 13. Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'extrait éthanologique et méthanologique des grignons d'olive.

C- : 15% ; C+ : 100%

Résultats et interprétations

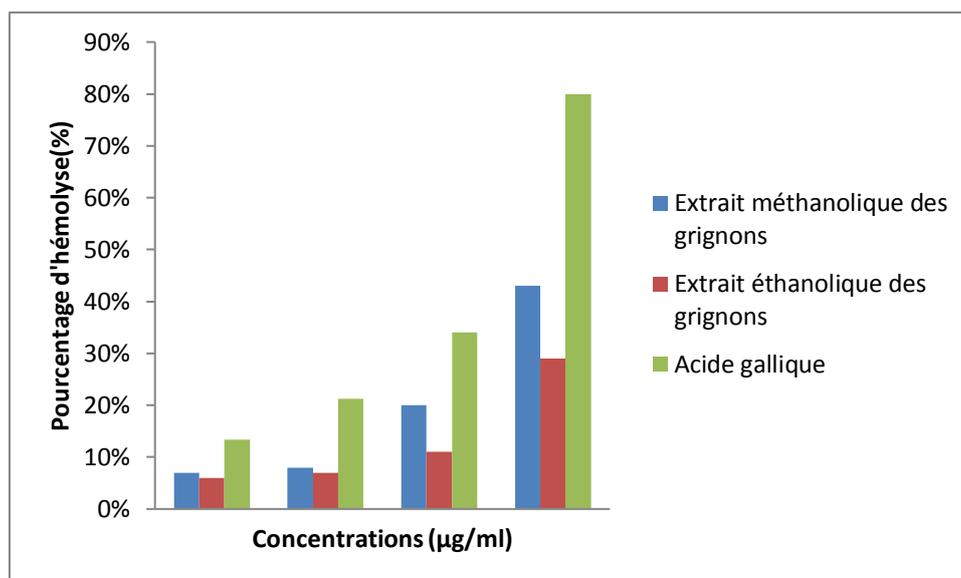


Figure 14. Comparaison des pourcentages d'hémolyse des globules rouges entre l'acide gallique et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.

L'extrait méthanolique des GO montre un taux d'hémolyse des GRh faible à la concentration 125µg/ml et 250µg/ml (7% ,8%) comparé au contrôle négatif (15%). Ce taux augmente avec la concentration 500 µg/mL pour atteindre 20% d'hémolyse. A la concentration 1 mg/ml, le pouvoir de cytotoxicité contre les GRh montre un taux d'hémolyse plus important (43%) (Figure11).

L'extrait éthanolique des GO exerce un effet hémolytique léger aux concentrations ; 125 µg/ml ,250 µg/ml et 500µg/ml avec un pourcentage d'hémolyse qui est en moyenne de (6% à 11%) et atteint 29% d'hémolyse à la concentration 1mg/ml (Figure12).

On remarque aussi que l'extrait éthanolique des GO est moins cytotoxique par rapport à l'extrait méthanolique (Figure 13).

De plus, les résultats montrent que les deux extraits éthanolique et méthanolique exercent un effet cytotoxique faible par rapport à l'acide gallique (molécule de référence) quelque soit la concentration utilisé (Figure 14).

2.2Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges) des extraits bruts des grignons d'olive.

L'étude de l'activité in vitro anti-hémolytique des extraits méthanolique et éthanolique des GO réalisée en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des GRh

Résultats et interprétations

L'évaluation de la stabilisation membranaire est mesurée par le taux de libération de l'Hb à 560 nm pour chaque concentration des extraits utilisés et en les comparant à deux molécules de référence, le Diclofénac qui est un médicament anti-inflammatoire et anti-hémolytique et l'acide gallique étant un PP à activité anti-hémolytique. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 15, 16, 17 et 18.

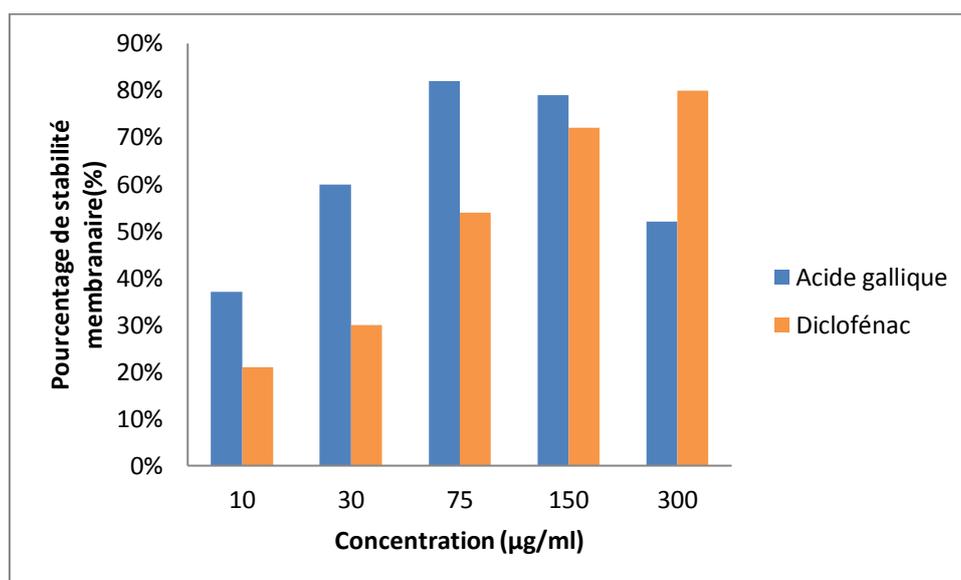


Figure 15. Activité anti-hémolytique de l'acide gallique et du Diclofénac.

Nos résultats montrent que l'acide gallique à faible concentrations de 10, 30 et 75 µg/mL présente un effet anti-hémolytique, protecteur et stabilisateur des membranes des GRh, important qui représente 82 % à la concentration 75 µg/mL. À partir de la concentration 150 µg/mL cet effet protecteur commence à diminuer en atteignant un taux de 52% à forte concentration (300 µg/mL) (Figure 15).

Par ailleurs, le Diclofénac possède un effet anti-hémolytique faible aux concentrations 10 et 30 µg/mL. Cet effet protecteur augmente avec la concentration du Diclofénac et atteint 80 % de protection à la concentration de 300 µg/mL (Figure 15)

Résultats et interprétations

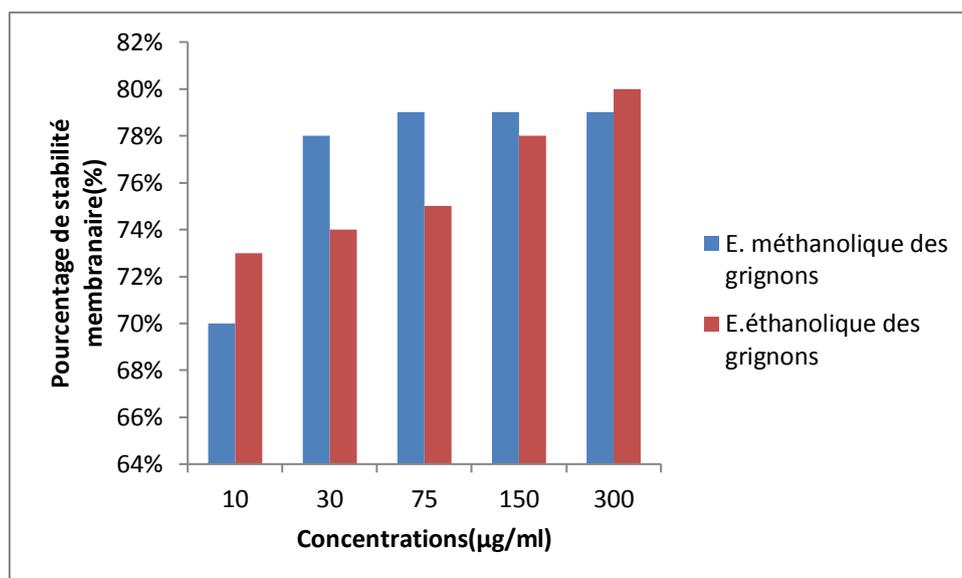


Figure 16. Activité anti-hémolytique des extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.

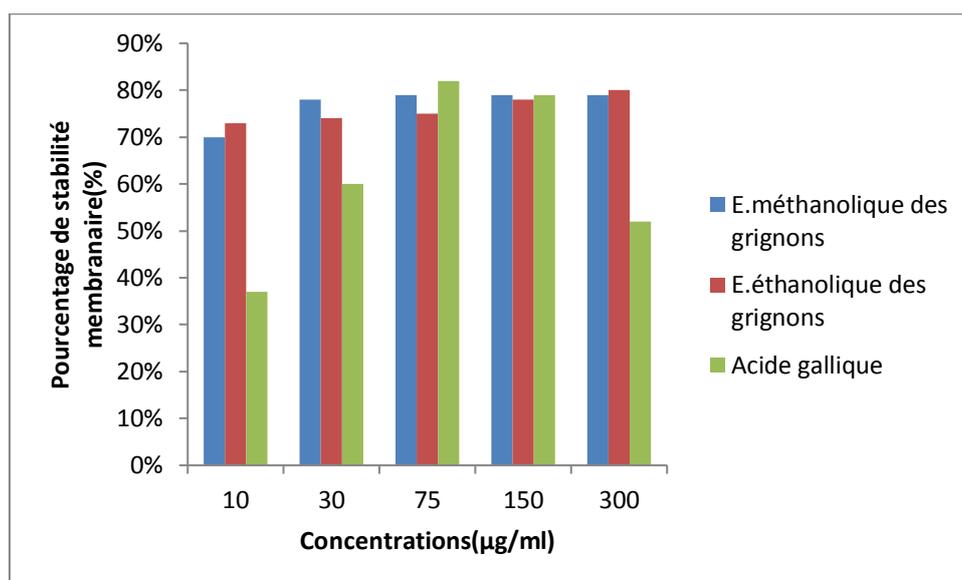


Figure 17. Comparaison de l'activité anti-hémolytique entre l'acide gallique et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.

Résultats et interprétations

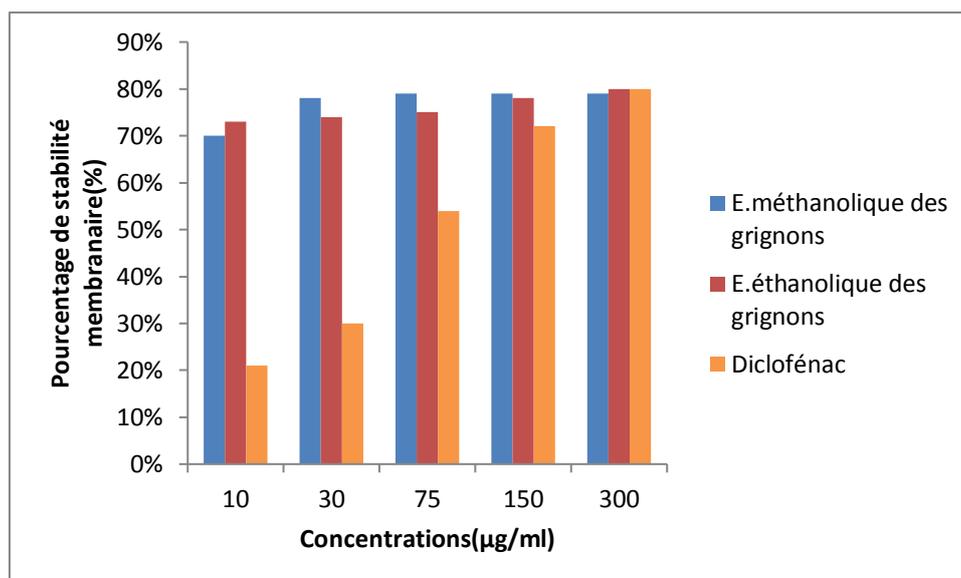


Figure 18. Comparaison de l'activité anti-hémolytique entre le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.

D'après les résultats de nos extraits (méthanolique et éthanolique) des GO, on remarque une activité importante à faible concentration 10µg/ml avec un pourcentage important ; 70% pour l'extrait méthanolique et 73% pour l'extrait éthanolique.

Cette activité stabilisatrice de la membrane des GRh continue d'augmenter avec la concentration d'extrait éthanolique pour atteindre 80 % lorsque la concentration est de 300 µg/mL (Figure 17) ; et cet effet protecteur augmente aussi avec la concentration d'extrait méthanolique mais se stabilise à la concentration 75µg/ml (79%) en atteignant un effet identique à la concentration 150 et 300 µg/ml (Figure 16).

Après la comparaison de l'activité anti-hémolytique des extraits avec l'acide gallique et Diclofénac, les résultats montrent un effet anti-hémolytique plus important que celui du Diclofénac aux concentrations (10, 30, 75 et 150 µg/mL) et presque identique à la concentration 300µg/ml (Figure 18). Cet effet est aussi plus élevé que l'effet de l'acide gallique à la concentration 10, 30 et 300µg/ml (forte concentration) et plus proche à la concentration 75µg/ml et 150µg/ml (Figure 17).

2.2. Activité anti-inflammatoire des extraits des grignons d'olive :

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire in vitro de nos extraits, on a utilisé la méthode de l'inhibition de la dénaturation protéique.

Résultats et interprétations

Afin de réaliser ce test, on a utilisé la protéine SBA. Les résultats de l'inhibition de la dénaturation de la SBA par nos extraits méthanolique et éthanolique sont représentés dans les figures 19,20et 21.

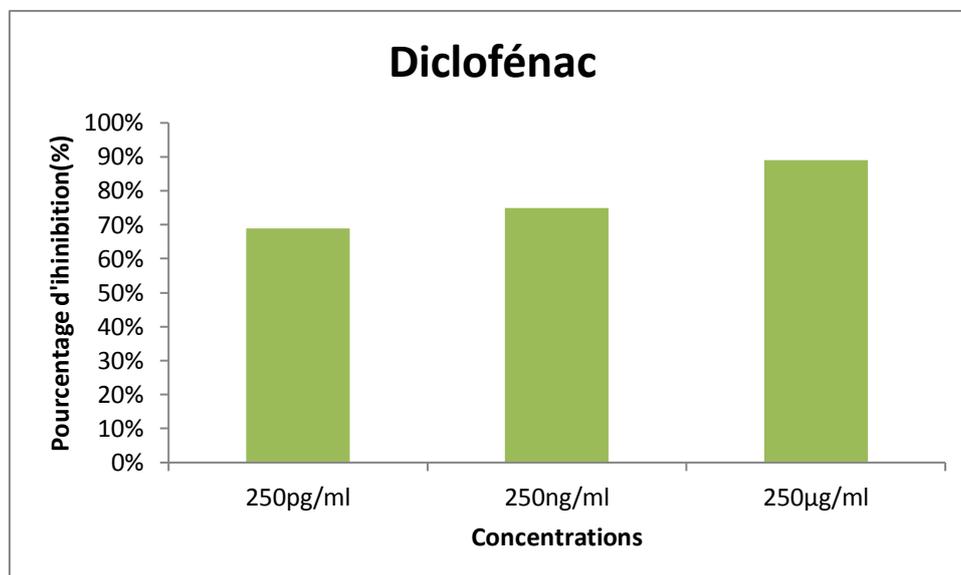


Figure 19. Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac.

Les résultats montrent que le Diclofénac assure une bonne inhibition de la dénaturation Protéique, même à faible concentration 250pg/ml (69%) allant jusqu'à 89% à la concentration 250µg/ml marquant ainsi son effet anti-inflammatoire. (Figure19)

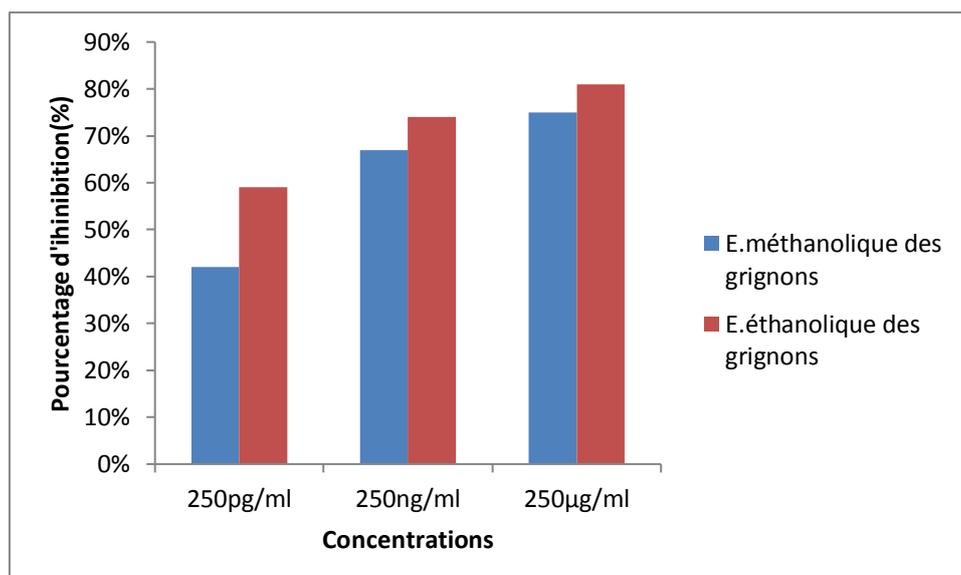


Figure 20. Inhibition de la dénaturation protéique par les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.

Résultats et interprétations

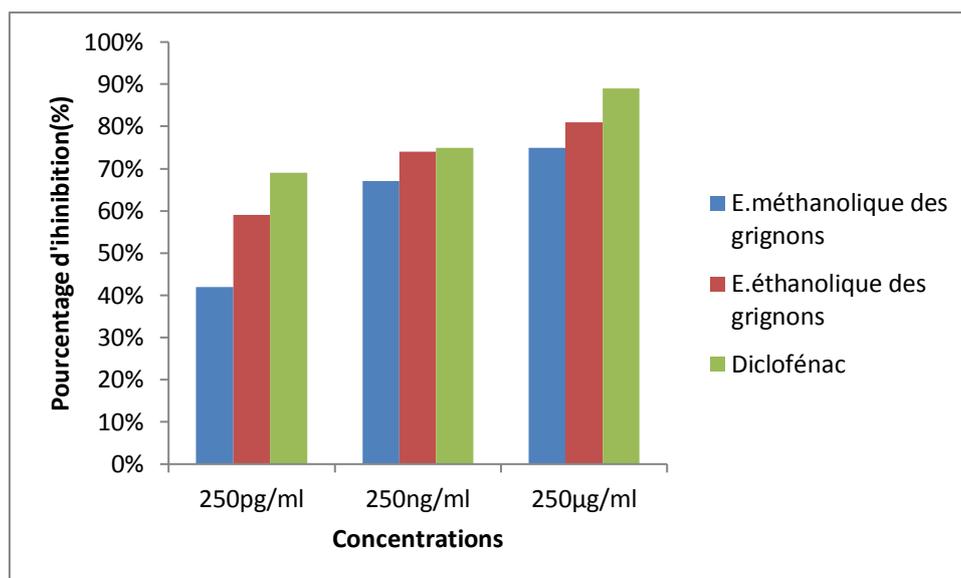


Figure 21. Comparaison de l'inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive.

Les résultats montrent que l'extrait éthanolique exerce un effet protecteur contre la dénaturation protéique important par rapport à l'extrait méthanolique pour toutes les concentrations utilisées (Figure 20). Cet effet reste toujours légèrement faible comparé au Diclofénac pour les deux extraits (Figure 21).

Discussion

Discussion

Selon les statistiques officielles, le développement du secteur oléicole en Algérie, est en plein essor. En effet, un programme a été engagé pour couvrir en partie les besoins nationaux en matière grasse végétale. **(Boudi et al, 2013)**.

Les déchets de l'oléiculture sont l'huile d'olive (20%), les résidus solides (grignons d'olive) 30% et les margines (50%). **(Alhamad et al, 2012)**.

Un large éventail de composés phénoliques ont été identifiés dans l'huile vierge, y compris les acides phénoliques alcooliques, dérivés secoiridoïdes et flavonoïdes. Cependant, seuls 2% environ des phénols totaux présents dans les fruits de l'olivier sont transférés dans l'huile d'olives extraite, tandis que les 98% restants sont conservés dans le grignon d'olive. **(Alhamad et al, 2012)**.

L'analyse de ces extraits phénoliques a démontré leur forte activité antioxydante et a suggéré leur utilisation potentielle comme additifs pour l'industrie alimentaire. **(Alhamad et al, 2012)**.

Notre travail de master sur les activités biologiques des extraits méthanoliques et éthanologiques du grignon d'olive contribue à la valorisation de ses déchets d'olive.

Le méthanol a montré des rendements meilleurs comme solvant d'extraction pour les polyphénols par rapport aux autres solvants (éthanol, acétone, Etc.). Ce solvant est moins polaire que l'eau et très efficace pour la libération des polyphénols. (Extrait méthanolique : 9% / extrait éthanologique : 8%). **(Johns.O, 1999 ; Sacan.O et al, 2010)**.

L'étude de la cytotoxicité des extraits de grignon d'olive, *in vitro* par l'utilisation des globules rouges parce que ce dernier est facile à isoler du sang et sa membrane présente des similitudes avec d'autres membranes cellulaires **(Shobana et Vidhya, 2016)**. L'exposition des globules rouges à certains paramètres physicochimiques tel que le milieu hypotonique, l'utilisation d'un perturbateur membranaire comme les détergents ou les espèces réactives oxygénées, provoque une rupture de sa membrane cytoplasmique (hémolyse et cytolyse) provoquant ainsi la libération de l'hémoglobine. Ce qui peut être détecté visuellement par l'apparition d'une teinte rose à rouge dans le sérum ou le plasma **(Lee et Feldman, 1997)**.

Selon les résultats obtenus, on observe que l'effet hémolytique dépend de la concentration des extraits du grignon d'olive ; à la concentration 125 ug/mL nos extraits méthanolique et éthanologique exercent un effet hémolytique faible (7%, 6%). Ces extraits provoquent un pourcentage d'hémolyse de 20% et 11% à la concentration de 500 ug/ml. Ce taux continue à s'augmenter en atteignant 29% pour l'extrait éthanologique et 43% pour l'extrait méthanolique

Introduction

Alors on conclue que 125 ug/mL est la concentration faiblement toxique et l'extrait éthanolique est moins cytotoxique que l'extrait méthanolique.

L'extrait des grignons d'olive riche en polyphénols, ces derniers oxydent l'hémoglobine érythrocytaire humaine et causent une perturbation de la structure membranaire et donc provoquent l'hémolyse des érythrocytes, en raison d'effets pro-oxydants qu'ils peuvent exercer. (**Galati et al., 2002**).

Les membranes érythrocytaires ont une stabilité variable, déterminée à partir de la fragilité corpusculaire moyenne. Les extraits des plantes peuvent avoir un effet positif sur la membrane des globules rouges, (**Vidhya et al, 2016**). Mais ils peuvent exercer des effets indésirables à forte concentration, notamment l'hémolyse érythrocytaire.

L'hémolyse résulte de la lyse de la bicouche lipidique de la membrane. Cette hémolyse est liée à la puissance et à la concentration des extraits de plantes. On outre, l'activité hémolytique des extraits dépend de sa composition chimique. (**Vidhya et al, 2016**).

Les érythrocytes présentent une cible majeure pour les radicaux libres en raison de la présence d'une forte concentration membranaire en acide gras polyinsaturés du transport d'oxygène associé en molécules d'hémoglobine à action redox, qui sont des forte promoteurs des espèces réactifs oxygénés. (**Vidhya et al, 2016**).

Dans notre travail on a utilisé l'acide gallique comme molécule de référence qui est un acide phénolique et un phytochimique antioxydant puissant (**Bhavesh et al, 2019**), il est obtenu par hydrolyse des tanins et est connu pour montrer certaines activités pharmacologiques (**Rajalakshmi et al, 2001**).

A forte concentration 1mg/mL l'acide gallique montre un pourcentage d'hémolyse de 80% ; nos résultats montrent que les extraits méthanoliques et éthanoliques du grignon d'olive exercent un effet hémolytique moins important que celui exercé par l'acide gallique.

L'acide gallique produit une quantité importante d'espèces réactives oxygénés (ERO), ce qui détruisent la membrane des érythrocytes. (**Mohanty et al.,2014 ; Hsieh et al., 2015**).

L'étude de l'activité anti-hémolytique des globules rouges in vitro est la meilleure méthode pour la détermination du pourcentage de stabilisation membranaire. (**Oyedapo et al., 2010**).la membrane érythrocytaire correspond à la membrane lysosomale et sa stabilisation indique que l'extrait de plante pourrait bien stabiliser les membranes lysosomales. La stabilisation de la

Discussion

membrane lysosomale est important dans la réponse inflammatoire en inhibant la libération et l'action d'intercesseurs tels que la sérotonine, les leucotriènes et les prostaglandines, l'histamine (**Aitadafouri, 1996**).

L'activité anti-hémolytique des extraits éthanoliques et méthanoliques a été réalisée par l'étude de la stabilisation de la membrane érythrocytaire. Dans ce test on a utilisé deux molécules de référence, le Diclofénac et l'acide gallique. Ces derniers sont des molécules qui induisent des effets anti-hémolytiques différents. Nos résultats montrent que l'acide gallique à faible concentration (10 et 30 et 75 ug/mL) présente un effet anti-hémolytique, protecteur et stabilisateur des membranes érythrocytaires important. Cependant, à partir de la forte concentration (150 et 300ug/mL) l'effet anti-hémolytique commence à diminuer.

Par ailleurs, aux faibles concentrations (10 et 30 ug/mL) le Diclofénac exerce un effet anti-hémolytique faible, cet effet augmente avec la concentration du Diclofénac et atteint 80% de protection à la concentration de 300 ug/mL.

Dans notre étude, les extraits éthanoliques et méthanoliques montrent une efficacité pour l'inhibition d'hémolyse, et on a constaté plus la concentration d'extrait éthanolique est élevée, plus la stabilité membranaire continue d'augmenter. Cependant, la stabilité membranaire augmente aussi avec la concentration d'extrait méthanolique mais à forte concentrations en atteignant un effet identique.

De plus, ces extraits montrent une activité anti-hémolytique supérieure ou identique à celle de l'acide gallique, mais plus forte que celle du Diclofénac.

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine (**Rahmani et al, 2016**). Les médicaments non stéroïdiens agissent soit en inhibant les enzymes lysosomales soit en stabilisant la membrane lysosomales (**Garbi et al, 2017**).

Le Déclofénac est parmi les AINS bien établis qui présentent des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques, anti-thrombotiques et antipyrétiques. Les principaux constituants de la membrane sont les phospholipides, les interactions des AINS avec les phospholipides peuvent modifier les propriétés physico-chimiques des membranes La présence des AINS dans la région polaire modifie les propriétés électrostatiques des

Discussion

phospholipides, Cette interaction influence la structure de la bicouche lipidique. (**Moreno et al, 2009**).

Les flavonoïdes ont une activité anti-inflammatoire remarquable. C'est pourquoi nos travaux actuels visent à évaluer l'activité anti-inflammatoire par stabilisation de la membrane érythrocytaire (**Chippada et.al, 2011**).

La réduction de la dénaturation des protéines est une méthode permettant de démontré la capacité anti-inflammatoire. La dénaturation des protéines est un processus pathologique par laquelle les protéines perdent leur configuration et deviennent sans fonction. La dénaturation des protéines peut voir lieu même par un processus inflammatoire auto-immune dont le quelle la production d'auto-antigène augmentée, cette augmentation peut être l'une des principales causes des réactions inflammatoire quelle que soit la cause de l'inflammation.(**Sridevi et al, 2015**).

Selon nos résultats, l'effet d'inhibition de la dénaturation des protéines de l'extrait éthanolique est supérieur à celui de l'extrait méthanolique. Par ailleurs, l'effet d'inhibition des deux extraits est inférieur à celui de Diclofénac.

Tout produit qui empêche la dénaturation des protéines peut être un agent anti-inflammatoire efficace. La capacité des extraits à réduire la dénaturation des protéines a été prouvée en comparant l'action similaire du médicament standard, à savoir le Diclofénac sodique. (**Sridevi et al, 2015**).

L'activité anti-inflammatoire efficace de l'extrait des plantes peut être attribuée à la présence de composés bioactifs tels que les saponines, les alcaloïdes, les stéroïdes et les flavonoïdes qui y sont présents. (**Sridevi et al, 2015**).

Conclusion

Conclusion

L'industrie oléicole laisse chaque année un sous-produit solide (le grignon) abondant et abandonné résultant de l'élaboration de l'huile d'olive vierge dans les moulins à partir d'olive, ces déchets forment une véritable menace pour l'environnement écologique. Toutefois, ces déchets oléicoles sont bénéfiques dans plusieurs domaines, tels que le domaine thérapeutique.

Dans ce travail de master, notre objectif est l'étude des activités biologiques des extraits de GO *in vitro* par deux solvants (éthanol, méthanol). L'extraction des CP du GO par le méthanol est meilleure avec un rendement de 9%.

Selon nos résultats, les extraits du GO sont cytotoxiques à forte concentration (1mg/mL). Autrement, à faible concentration (125ug/mL) ils sont faiblement cytotoxiques puisqu'ils exercent un faible taux d'hémolyse.

Ainsi, les résultats précédentes ont montré que les extraits méthanoliques et éthanoliques du GO exercent des effets anti-hémolytiques très importants et assurent une stabilité à la membrane érythrocytaire par rapport aux molécules de référence, à savoir l'acide gallique et Diclofénac.

Cependant, d'après les résultats de test anti-inflammatoire, les deux extraits du GO exercent une inhibition de la dénaturation protéique importante (81%) mais inférieure à celle du Diclofénac, mais ça n'arrête pas qu'ils sont des agents anti-inflammatoires puissants.

Notre travail de master permet de conclure qu'on peut utiliser le GO dans le domaine thérapeutique en raison de sa richesse en CP qui exercent des activités anti-hémolytiques et anti-inflammatoires.

En perspectives, il est souhaitable de réaliser d'autres études complémentaires pour :

- Déterminer et purifier les molécules bioactives responsables des activités biologiques et déterminer leur mécanisme et mode d'action.
- Evaluer leur activité anti-inflammatoire du GO *in vivo* pour étudier la toxicité.

Les Références :

A

Aitadafouri. M. Mounnieri. C. Heyman. S.F. Binistic. C. Bon. C, Godhold. J. (1996).Alkoxybenzamides as new potent phospholipase A2 inhibitors, *Biochem Pharm.*; 5:737-742.

Ajay. M. Gilani. A.H. Mustapha. M.R.(2003). Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.*, 74: 603-612.

Akroum. S. (2010). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels.Thèse de Doctorat, Université Mentouri de Constantine –Algérie.

Alhamad. Mohammad. N. Taha M. Rababah . Muhammad Al-u'datt . Khalil Ereifej . Ranya Esoh . Hao Feng . Wade Yang. (2012). The physicochemical properties, total phenolic, antioxidant activities, and phenolic profile of fermented olive cake. *Arabian Journal of Chemistry* (2017) 10, 136–140.

Ali. D.É. Sacchetto. E. Dumontet. D. carrer. J. Orsonneau. O. Delaroche. E. Bigot-corbel. (2014). Interférence de l'hémolyse sur le dosage de vingt-deux paramètres biochimiques. *Annales de biologie clinique*.

Alibes. X. Berge. P. Martilotti. F. Nefzaoui. A. Zoïopoulos. P. (1983). Utilisation des sousproduits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen.pp 43.

Alloum. D. (1974). L'oléiculture algérienne. *Options méditerranéennes n°24*. Pp : 45-48.

Amourettim. C. et Comet. G. 2000. Le livre de l'olivier. Edisud, 191.

B

Barjol. L.J. (2014). L'économie mondiale de l'huile d'olive. *OCL* : 21(5) D502.

Benlemlih. M. Ghanam. J. (2012). Polyphénols d'huile d'olive, trésors santé! Polyphénols aux actions antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, anti-vieillessement et protectrices cardio-vasculaires © marco pietteur, éditeur 130p.

Bennani. H. Fiet. J. Adlouni. A. (2009). Impact de l'huile d'argan sur le cancer de La prostate : étude de l'effet antiprolifératif des polyphénols. *Revue Francophone des Laboratoires* ; 416, 23-26.

BenSassi. A. Boularbah. A. Jaouad. A. Walker. G. Boussaid. A. (2006). A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*. 41 (1): 74–78.

Bensemmane. A. (2009). Le trait d'union des opérateurs économiques pour le Renouveau du Monde Agricole et Rural. *revuefilaha*. 4.

Benyahia. N. et Zein. K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. . Contribution spéciale de « Sustainable Business Associates » à l'atelier « pollution and development issues in the Mediterranean basin », (SESEC) à lausanne , suisse.

Béraud. J. (2014). Le technicien d'analyses biomédicales, 2ème édition, P. 628-650, ISBN:978-2-7430-1299_1.

Beta. T. Nam. s. Dexter. J.E. et Sapirstein. H.D. (2005). Phenolic content and antioxydants Activity of Pearled wheat and Roller-Milled. Fractions. *Cereal chem.*82(4), Pp 390- 393.

Bhavesh. C. Variya . Anita. K. Bakrania . Prem.Madan` Snehal.S.Patel. (2019) (Acute and 28-days Repeated Dose Sub-Acute Toxicity Study of Gallic Acid in Albino Mice. *Regul Toxicol Pharmacol.* Feb;101:71-78.

Bonnet. J. Bonnet. P.(1946). L'olivier :huilerie d'olives et de graines.librairie hachette,224.

Boskou. D. Blekas. G. and Tsimidou. M. (2006). Olive oil composition In olive oil: Chemistry and Technology, Boskou, D., Ed. The American Oil Chemists' Society Press, pp 41-72.

Bouaziz. M. chamkha. M. sayadi. S. (2004) .comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar chemlali from Tunisia. *Journal of agricultural food chemistry.*52, (17):5476-5481.

Bouderbala.S.(2016). Les Grignons D'olive Atténuent La Peroxydation Lipidique Et Augmentent L'activité Antioxydante Au Niveau Tissulaire, Chez Des Rats Soumis à Un Régime Enrichi En Cholestérol Et Diabétiques Par La Streptozotocine. *Nutrition et santé* Volume 8, Numéro 2, Pages 72-79.

Boudi .M . Chehat. F . Cheriet .F. (2013).competitive de la filiere hule d'olive en algerie : cas de la wilaya de bejaia.les cahiers du CREAD n 1.5/106.

Bouhlali. E.D.T. Sellam. K. Bammou. M. Alem. C et Filali-zehzouti. Y. (2016). In vitro Antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (05) : 156-162.

Bruneton. J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème oleuropein. *Rejuvenation Research* ,16 :134–142.

Bulmus. V. Woodward. M. Lin. L. Murthy. N. Stayton. P. et Hoffman. A. (2003). A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of Controlled Release*, 93(2), 105-120.

C

Carluccio. M, Siculella. L, Ancora. M. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:622–629.

Chaabane. K.Bergaoui. R. Ben hammouda. M.(1997).Utilisation de differents types de grignons d'olive dans l'alimentation des lapereaux. (*World Rabbit Science*),5(1), 17-21.

Chandra. S. Chatterjee. P. Dey. P et Bhattacharya. S. (2012). Evaluation of in vitro anti inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*,178-180.
Chemistry. 42(7): 779-781.

Cherrad. H. Boudebala.S.(2019).les grignons d'olive diminuent la glycémie et améliorent l'activité antioxydante tissulaire,chez le rat rendu diabétique par injectio à la streptozotocine.

Chertov. O. Yang. D. Howard. O. Oppenheim. J.(2000). Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev.* 177:68–78.

Chippada. S.C. Volluri. S.S. Bammidi. S.R. and Vangalapati. M. (2011). In vitro anti inflammatory activity of methanolic extract of *Centella Asiatica* by HRBC membrane stabilisation . Vol.4, No.2, 457-460 ISSN: 0974-1496.

Clos. J. (2012). L'immunité chez les animaux et les végétaux. Paris : Ed Elodie Lecoquerre. 296 p.

COI « CONSEIL OLEICOLE INTERNATIONAL ». (2014). Caractérisation des feuilles d'olivier, composition chimique d'huiles d'olive de différentes origines et traçabilité de l'huile d'olive. *OLIVÆ* N° 119, p49.

COI.(2002). conseil international d'olive.

Conseil International Oléicole (COI). (2015). Graphique II - Évolution des principaux pays producteurs d'olives de table. *Newsletter - Marché Oléicole* N° 95:15.

Conseil oléicole international (COI a).(2011) détermination des caractéristiques des olives à huile, COI/OH/Doc N° 1.

Conseil Oléicole International (COI). (2007). Techniques de production en oléiculture.

D

Dacosta. Y. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Editions Yves Dacosta. Paris, 317 p.

Dambros. M. De Jongh. R. Van Koeveringe. G.A. Bast. A. Van Kerrebroeck P.E.V.(2005). Galangin protects pig detrusor nerves from repetitive field stimulation and anoxia/glucopenia injury. *Urology*, 66: 1327–1331.

Djadouf. S. Tahakourt. A. Chelouah. N. et Merabet. D. (2011). Utilisation du grignon d'olive et foin comme ajouts dans la fabrication des briques de terre cuite. Séminaire International, Innovation et Valorisation en Génie Civil et matériaux de Construction, Univ de Bejaïa N° 10-051.p1-5.

Djemai. Z. (2008). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L, mémoire magister, Université -El Hadj Lakhder –Batna.

Dodge. J.T. Mitchell. C. and Hanahan. D.J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 100, 119-130..

F

Ferrero-Miliani. L. Nielsen. O .Andersen. P. Girardin. S.(2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol.*;147:227–235.

G

Galati. G. Sabzevari. O. Wilson. J.X. O'Brien. P.J. (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology.* 177 (1): 91-104.

Garbi .Mohamed.I. Suha.F. Mohammed. Amira.A. Magzoub. Reel.M Hassabelrasoul. Mahmmoud. S. Saleh. Ali.M. Badri. Ibrahim.T. Ibrahim. Ahmed.A. Elshikh and Ahmed. S. Kabbashi. (2017). In vitro anti-inflammatory properties of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *International Journal of Home Science*; 3(1): 234-237. ISSN: 2395-7476.

Ghestem .A. Seguin. E. Paris. M. Orecchioni. A. M. (2001). Le préparateur en pharmacie. Ed. Médicales Internationales. Paris, pp 108-119.

Girasole. M.S. Dinarelli. G. Boumis. (2012). "Structure and function in native and pathological erythrocytes: a quantitative view from the nanoscale." *Micron* 43(12): 1273-1286.

Green. P. Wickens. G.(1989). The Olea europaea complex, 287-299.

H

Hagerman. A.E. (2002). Tannin Handbook. 2ème édition. Miami University. Oxford, USA, 116 p.

Halliwell. B. (1994).Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, 52: 253-265.

Herrera. M.D. Zarzuelo. A. Jiménez. J. Marhuenda. E. Duarte. J. (1996).Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.*, 27(2): 273-277.

Hsieh. C.L. Lin. C.H. Chen. K.C. Peng. C.C. et Peng. R.Y. (2015). The teratogenicity and the action mechanism of gallic acid relating with brain and cervical muscles. *Plo.*

J

Jabbour HN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE.(2009). Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reprod.*;138:903–919.

Jauréguiberry. S. (2015). Rétention et " pitting" splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisinine, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

Jons. O. (1999).Xinthin oxidase inhibitory northeaster north American plant remedies.used for gout. *Journal of Ethano-Pharmacology.* 64 : 149-160.

Jun. L, Hongbin.S, Jing .S, Yuanyuan .Y and Luyong. Z.(2011). Effect of olive pomace extracts on hyperlipidaemia. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 25:12, 1190-1194.

K

Korkina. L.G. Afanas'ev. I.B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* 38: 151–163.

Krief. S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal:surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda, activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat. Brunoy, 237 p.

L

Lanneau. D. (2010). Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique. *Sciences agricoles.* Université de Bourgogne.

Laribi .R. (2015). Les composés phénoliques de quelques variétés de l'huile d'olive Algérienne : identification et propriétés, Thèse de doctorat, université de Bejaia.

Lavee. S. (1997). Biologie et physiologie de l'olivier. *Encyclopédie Mondiale de L'Olivier*, ed. COI, Madrid, Espagne, pp. 60-110.

Lee. M. Feldman. M. (1997). The aging stomach: implications for NSAID gastropathy. *Gut.* 41(4): 425-426.

Lenormand. G. (2001). Elasticité du squelette du globule rouge humain-une étude par pinces optiques, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.

Lippi. G. Avanzini. P. Pavesi. F. Bardi. M. Ippolito. L. Aloe. R. and Favalaro. E.J. (2011). Studies on in vitro hemolysis and utility of corrective formulas for reporting results on hemolyzed specimens. *Biochemiamedica: Biochemiamedica*21, 297-305.

Loussert. R. Brousse. G. (1978). L'olivier : techniques agricoles et productions méditerranéennes, ed. Maisonneuve et Larousse, Paris, France, pp 480.

M

Maas. E. Hoffman. G. (1977). Cropsalttolerance-current assessment. *Journal of irrigation and drainage division.* 103: 115-134.

Manaargadoo-Catin. M. Ali-Cherif. A. Pognas. J.-L. et Perrin. C.(2016).Hemolysis by surfactants. A review. *Advances in colloid and interface science*,228,1-16.

Moreno. Marcela. A.B. Patrick Garidel. C . Mario Suwalsky.B . Jörg Howe. D. Klaus Brandenburg. D. (2009).The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788. 1296–1303.

Medzhitov. R.(2010). Inflammation: new adventures of an old flame. *Cell.*140:771–776.

Mendil. M et Sebai. A. (2006). Catalogue national des variétés de l'olivier.100p.

Mezzou. H.A.B. Khelifa. F. Neffati. W. Douki. A. Ben Amor. M.F. Najjar. (2006). "Détermination de l'hémoglobine plasmatique et évaluation spectrophotométrique de l'hémolyse en biochimie clinique." *Revue Francophone des Laboratoires* (386): 59-64.

Milane. H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, 268 p.

Ministère du commerce. (1973). « l'oléiculture en Algérie ». 11.50-56, Edition chambre de commerce et d'industrie, Alger.

Mohandas. N et Gallagher. P.G. (2008).Red cell membrane past, present and future blood.*American Society of Hematology*,112,3939-3942.

Mohanty. J. Nagababu.E. et Rifkind. J.M. (2014). Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in physiology*, 5, 84. *phagique. Sciences agricoles. Université de Bourgogne.*

N

Nefzaoui .A. (1985) Valuation of lignocellulosic residues in the diet of ruminants by treatment with alkali, Application to pomace oil. PhD Dr, Catholic University of Leuven 345p.

Nefzaoui. A,(1987) Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produit. *OLIVAE IV Tunisie* .

Nefzaoui. A. (1988). Contribution à la rentabilité de l'oléiculture par la valorisation optimale des sous-produits. *Olivae*19 :17-21.

Nefzaoui. A.(1979). la pulpe d'olive : principaux acquis et voies de recherches.Note INRAT Tunis, Tunisie. Octobre;

Nefzaoui. A.(1991).Valorisation des sous-produits de l'olivier.In :Tisseran .Fourrages et sous-produits méditerranéens .Zaragoza : CIHEAM,. p.101-108 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n . 16).

Nguyen. V.T et al. (1989) in Lanneau, D. (2010). Rôle des protéines de choc thermique HSP90 et HSP70 dans la différenciation macrophagique. Sciences agricoles. Université de Bourgogne.

O

Ohlde. G et Berker .K.(1982).suitability of cell-wall constituents as Predictors of organic matter digestibility in some tropical and Subtropical by-products. Animal Feed Sci- and Technol, 7, 191-199.

Okuda. T. et Ito. H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. Molecules, 16;2191-2217.

Ounas. A. Bergach. N. Ennaciri. K. Yaacoubi. A. Bacaoui. A. (2009). Préparation des charbons actifs à partir des déchets de l'industrie oléicole. Symposium international « Agriculture durable en région méditerranéenne(AGDUMED) », Rabat, Maroc. 393-397.

Oyedapo. O.O. Akinpelu. B.A. Akinwunmi. K.F. Adeyinka. M.O. et Sipeolu. F.O. (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of Lantana camara and its fractions. International Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 2(4), 46-51.

P

Paris RR.et Moyse H. (1971). Précis de matière médicale. Pharmacognosie spéciale des dicotylédones gamopétales. Tome III Edition Masson, 510p.

Portier. K.N. Kirschvink. N. Fellmann. J. Coudert. P. Lequeux. (2007). Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. Annales de Médecine Vétérinaire, Université de Liège.

R

Rahmani. S. Belboukhari. N. Sekkoum. K. Cheriti. A. (2016). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles Limoniastrum feei(PLUMBAGINACEA). Algerian journal of arid environment. vol. 6, n°1,80-86. ISSN 2170-1318.

Rajalakshmi .K. Devaraj.H . Niranjali Devaraj.S. (2001). Assessment of the No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL) of Gallic Acid in Mice.Food Chem Toxicol. 2001 Sep;39(9):919-22.

Revuelta. M.P. Cantabrana. B. Hidalgo. A. (1997). Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl₂. Gen.Pharmacol., 29: 847-857.

S

Sacan O., Khan M. R et Khan R. A. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa apaca* fruits. *Food Chemistry* : 1-7.

Sadique, J., Al-Rqobah, W. A., Bughaith, M. F., et El-Gindy, A. R. (1989).The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*, 60, 525-532.

Sansoucy. R. (1984). Utilisation des sous- produits d'olivier en alimentation animale.in séminaire sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. Tunisie, PNUD/FAO/COI. 73-87.

Sebban, A. Bahloul, M. Saadoune, A. Ait Kassi, M. Berrada, J.-L. Pineau, S.

Kitane.(2004).Schema de valorisation des grignons d'olives produits par les maasras marocaines. *Revue francophone d'écologie industrielle*. N° 34 - 2e trimestre. .

Sebban. A. Bahloul, M. Saadoune. A. Ait Kassi. M. Berrada. J.-L. Pineau. S. Kitane.(2004). Schema de valorisation des grignons d'olives produits par les maasras marocaines. *Revue francophone d'écologie industrielle*. N° 34 - 2e trimestre.

Shobana. S et R. Vidhya. (2016). "Evaluation of In Vitro Hemolytic Activity Of Different Parts of *Abutilon indicum* (Linn.)." *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(5): 1182-1196.

Sridevi. G. Sembulingam. K., Ibrahim. M, Srividya. S. Sembulingam. P. (2015) . Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of *Pergularia Daemia*. Vol 4, Issue 06. *World Journal of Pharmaceutical Research*.

Stagos. D. Amoutzias. G. D. Matakos. A. Spyrou. A. Tsatsakis. A. M. & Kouretas D. (2012). Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*; 50, 2155–2170.

Stookey. L. (1970). Ferrozine- A new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical*

Strikic. F. Mavsar D. Pericasatovic, Z. Cmelik Z. Javornik B.(2010). Genetic variation within the olive (*Olea europaea* L) cultivar *oblica* detected using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Afr.J.Biotec.*,9,2880-2883.

T

Takeuchi. O. Akira. S.(2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.*; 140:805–820.

V

Vauzour. D. Rodriguez-Mateos. A. Corona. G. Oruna-Concha. M. J. & Spencer. J. P. E .(2010). Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of Action. *Nutrients*; 2, 1106-1131.

Villa. P.(2006). La culture de l'olivier. Ed de Vecchi S.A.- paris. pp : 1-69.

Visioli. F. and Galli. C. (1998). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 4292-4296.

Vossen. P. (2013). Growing olives for oil. R. Aparicio and J. Harwood (eds.). *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* pp.19-56.

W

Williams. L.A.D. ConnarA. O. Latore. L. Dennis. O. Ringer. S. Whittaker. J.A. Conrad. J. Vogler. B. Rosner. H et Kraus. W. (2008). The in vitro Anti-denaturation Effects Induced by Natural Products and Non-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is Proposed as a Screening Assay for the Detection of Anti-inflammatory Compounds, without the use of Animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. *West Indian Med J*, 57 (4): 327- 331.

Wong. J. W. Hashimoto. K. & Shibamoto T. (1995). Antioxidant activity of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2707± 2712.

Y

Yacoub. Y. (1997). Valorisation des sous-produits. *L'investisseur agricole*. 19: 17-18.

Yoon. J.H. Baek. S.J. (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti inflammatory properties. *Yonsei. Med. J.*, 46(5): 585–596.

Z

Zaidi.F. Hassissenel. N. Allouachel. H. M. Kichoul. S. Ourdanil, K. Rezkil. M. M. Bellal. J.F. Grongne. (2009).A..Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *FRANCE.Revue Méd. Vét.*, 160, 2, 67-73.

Zhou. Y. Hong. Y. Huang. H.(2016). Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous GlomeruloNephritis Rat via Downregulation of NF-κB Signaling Pathway. *Kidney and Blood Pressure Res.* 41:901–910.

Résumé :

Margines et grignons, deux résidus issus de l'industrie oléicole. La production mondiale de grignons est estimée à 2,9 millions de tonnes, Ce qui conduit à des pollutions nocives pour l'environnement écologique d'où l'importance de valoriser ce sous produit doté de composés phénoliques. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est d'évaluer la toxicité et l'activité anti-hémolytique et anti-inflammatoire du grignon d'olive par des tests in vitro, en utilisant comme solvants d'extraction des poly phénols, le méthanol et le éthanol, les deux extraits ont donné des bon rendement. Les résultats obtenues ont montrée que l'effet anti-hémolytique des extraits est très important même à faible concentration (10ug/mL) , par ailleurs, l'effet anti-inflammatoire est important à forte concentration (250ug/mL) et il est faible à faible concentration. Ces extraits peuvent exercer un effet cytotoxique à forte concentration (1mg/mL). Cette étude nous a permis de conclure que les grignons d'olive ne sont pas seulement des déchets nocifs, mais on peut les utiliser dans des différents domaines, en raison de leurs compositions intéressantes qu'ont des propriétés biologiques importantes.

Mots clés : Grignon d'olive, effet anti-hémolytique, effet anti-inflammatoire, les composés phénoliques, toxicité.

Abstract :

Margins and pomace, two residues from the olive industry. The world production of pomace is estimated at 2.9 million tons, which leads to pollution harmful to the ecological environment, hence the importance of recovering this by-product with phenolic compounds. In this context, the objective of this work is to evaluate the toxicity and the anti-haemolytic and anti-inflammatory activity of olive pomace by in vitro tests, using methanol and ethanol as extraction solvents for polyphenols. Both extracts gave good yields. The results obtained showed that the anti-haemolytic effect of the extracts is very important even at low concentration (10ug/mL), on the other hand, the anti-inflammatory effect is important at high concentration (250ug/mL) and it is weak at low concentration. These extracts can exert a cytotoxic effect at high concentrations (1mg/mL). This study has allowed us to conclude that olive pomace is not only a harmful waste, but it can be used in different fields, due to its interesting compositions that have important biological properties.

Keywords: Olive pomace, antihemolytic effect, anti-inflammatory effect, phenolic compounds, toxicity, anti-inflammatory effect.

ملخص:

هوامش و ثفل ، بقايا من صناعة الزيتون. ويقدر الإنتاج العالمي من بقايا الزيتون بنحو 2.9 مليون طن ، مما يؤدي إلى تلوث ضار للمحيط البيئي ، وبالتالي أهمية استعادة هذا المنتج الثانوي الغني بمركبات الفينول. في هذا السياق ، الهدف من هذا العمل هو تقييم السمية والنشاط المضاد للانحلال والمضاد للالتهابات لثفل الزيتون عن طريق الاختبارات المعملية ، باستخدام مذيبات استخلاص البوليفينول ، الميثانول والإيثانول ، أعطت الخلاصتان غلة جيدة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن التأثير المضاد للانحلال للمستخلصات مهم للغاية حتى عند التركيز المنخفض (10 ميكروجرام / مل) ، علاوة على ذلك ، فإن التأثير المضاد للالتهاب مهم عند التركيز العالي (250 ميكروجرام / مل) وهو ضعيف بتركيز منخفض. يمكن لهذه المستخلصات أن تمارس تأثيراً ساماً للخلايا بتركيز عالٍ (1 مجم / مل). أتاحت لنا هذه الدراسة أن نستنتج أن ثفل الزيتون ليس مجرد نفايات ضارة فحسب ، بل يمكن استخدامه في مجالات مختلفة ، بسبب تركيباتها المثيرة للاهتمام التي لها خصائص بيولوجية مهمة.

الكلمات المفتاحية: ثفل الزيتون ، تأثير مضاد للانحلال ، تأثير مضاد للالتهابات ، مركبات فينولية ، سمية

