

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAÏD-TLEMCEM
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 : Biologie de la nutrition

Présenté par :
BEDDI Zineddin
HADJ KACEM Youssouf

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

Soutenu le :08/11/2020



Devant le jury composé de :

M ^{me} MERZOUK Hafida	Professeur à l'université de Tlemcen	Examinatrice 1
M ^{me} SAKER Meriem	MCA à l'université de Tlemcen	Examinatrice 2
M ^{me} IMESSAOUDENE Asmahan	MCB à C.U Tissemsilet	Encadreur

Année universitaire : 2019 - 2020

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 dotées
d'intelligence

Nous exprimons nos sincères remerciements à **M^{me} Merzouk H** professeur et
directrice du laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition,
qui a accepté de présider et de juger ce travail de Master.

Notre gratitude s'adresse à notre encadreur **M^{me} Imessaoudene Asmahan**
pour son encadrement, son orientation, ses conseils et la i disponibilité qu'elle nous a
témoignée pour nous permettre de mener à bien ce travail.

Aussi nous remercions **M^{me} Saker M** maitre de conférence A Université de
tlemcen de bien vouloir accepter d'examiner ce travail.

Nous remercions également **M^{me} Guermouche B** maitre de conférence A université
de tlemcen.

Nous exprimons nos profonds remerciements à **M^{elle} Badi Zoulikha** la doctorante
pour ses compréhensions, ses conseils et se aides, pour sa gentillesse et ses
orientations efficaces.

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

Hadj Kacem Youssouf

Beddi Zineddin

Dédicace

Nous dédions ce travail à nous deux familles à nos parents, pour leurs sacrifices et leurs efforts consentis, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde affection.

À nos Frères et Sœurs, pour leurs compréhensions et leurs encouragements, qu'ils trouvent ici l'expression de notre sincère fraternité.

À nos chers collègues et amis(es), pour leurs aides et leurs encouragements durant tout le temps de notre travail.

Sommaire

Partie bibliographique

- *Introduction* 01
- *Etat actuel du sujet* 03
- 1-*Généralités* 03
- 2-*Compositions générales des sous-produits d'olive*..... 07
- 3-*Polyphénols des grignons d'olive* 10
- 4-*L'inflammation*..... 11
- 5-*L'hémolyse*13

Partie expérimentale

- *Matériels et méthodes*.....15
- *Résultats extrait délipidé*20
- *Discussions* 26
- *Conclusion* 33
- *Références Bibliographie* 34
- *Annexes* 39

Liste des figures :

- Figure 01 : Olive (Mushtaq et al, 2020)04

- Figure 2 : Classification et structure chimique des principales classes de polyphénols alimentaires (Martin et Appel, 2010) 12

- Figure 03 : la filtration du macérât de grignon d'olive..... 16

- Figure 04 : Photographie du Rotavapor utilisé 16

- Figure 05: Extraits de grignon d'olive après séchage..... 16

- Figure 06 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique, l'extrait éthanolique et méthanolique des grignons d'olive délipidé 22

- Figure 07 : l'effet anti-hémolytique entre l'acide gallique, le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive délipidé 24

- Figure 08 : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanoliques de grignon d'olive délipidé 25

Liste des tableaux :

- Tableau 01 : Composition chimique des grignons d'olives..... 09
- Tableau 02 : Rendements d'extraction des composés phénoliques de grignon d'olive délipidé20
- Tableau A1 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique, l'extrait éthanolique et méthanolique des grignons d'olive délipidé39
- Tableau A2 : effet anti-hémolytique entre l'acide gallique, le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive délipidé 39
- *Tableau A3* : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanoliques de grignon d'olive délipidé..... 39

Liste des abréviations

DHPG : dihydroxyphénylglycol

MS : matière sèche

GO: grignons d'olive

GRh : globules rouges humains

Hb : hémoglobine

UV :ultraviolet

HCL: Chlorure d'hydrogène

C+ : contrôle positif

C-:contrôle négatif

BSA :l'albumine de sérum bovine

EAU: extraction assistée par les ultrasons

EPP:polyphénols extractibles

NEPP: polyphénols non extractibles

LOCSE : Les phénoliques présents dans extrait de graines de camu-camu lyophilisé optimisé

AINS :Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

La culture des oliviers et la production d'huile d'olive sont répandues dans la région méditerranéenne (Albahari et al, 2018). Les olives et l'huile d'olive sont des composants importants et caractéristiques du régime méditerranéen (Conterno et al, 2019).

L'huile d'olive est extraite du fruit d'*Olea europaea*, laissant des déchets sous forme liquide connu sous le nom de margine - effluent aqueux dérivé pendant les processus de production - et de grignons d'olive solides (Conterno et al, 2019 ; Albahari et al, 2018 ; Belaid et al, 2002).

Le grignon d'olive est un sous-produit industriel issu du processus de production d'huile d'olive, obtenu en pressant l'olive sans aucun traitement chimique (Cardoso et al, 2005).

Plusieurs alternatives se sont avérées être des options possibles pour la gestion des déchets solides des oléiculteurs. Ces alternatives rapportées dans la littérature (Qdais et Alshraideh, 2014) sont: l'alimentation animale, la valorisation énergétique, l'extraction de matières utiles, la co-combustion, les engrais et l'élimination sans traitement.

Le grignon d'olive et les eaux usées issus des procédés d'extraction d'huile contiennent des macromolécules telles que des polysaccharides, des lipides, des protéines et des composés polyphénoliques (principalement du groupe des tyrosols) qui peuvent aller de 1 à 8 g /l dans les eaux usées et de 2,9 à 3,7 mg /l dans l'olive marc (Conterno et al, 2019).

Le grignon d'olive est composé de lignine, de cellulose, d'hémicellulose, d'huile d'olive et de composants minéraux. De plus, des quantités importantes de polyphénols restent dans le grignon d'olive contribuant à son potentiel antioxydant (Albahari et al, 2018).

Les polyphénols sont une classe de métabolites secondaires produits par des espèces végétales et vont des structures simples aux molécules complexes, fournissant une large et intéressante variété d'effets biologiques, y compris une activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne et antivirale. Ces propriétés confèrent aux polyphénols un rôle important à jouer dans les domaines nutraceutique et médical (Paini e al, 2016).

«la consommation de polyphénols d'huile d'olive contribue à la protection des lipides sanguins contre les dommages oxydatifs» reflète les preuves scientifiques, et qu'une dose de 5 mg d'hydroxytyrosol et de ses dérivés (par exemple, complexe d'oleuropéine et tyrosol) dans l'huile d'olive doit être consommée quotidiennement pour que les produits alimentaires portent l'allégation de santé (Conterno et al, 2019).

L'élimination des sous-produits de l'industrie de l'huile d'olive pose un problème environnemental majeur dans les principaux pays producteurs d'olives (Aliakbarian et al, 2011). Une utilisation appropriée de ces résidus d'huile d'olive pourrait non seulement améliorer le statut économique des producteurs d'huile d'olive, mais pourrait également réduire un tel problème environnemental (Aliakbarian et al, 2011).

Le but du présent travail de master est la valorisation des grignons d'olive, par la détermination *in vitro* de la cytotoxicité des composés bioactifs phénoliques extraits à partir du grignon d'olive, ainsi leurs activité anti-hémolytique et anti-inflammatoire, afin de pouvoir l'immerger dans plusieurs domaines comme la nutrition, la cosmétique et la pharmacologie.

1- Généralités

L'olivier (*Olea europaea* L.) (Fig. 1) est la principale espèce cultivée appartenant à la famille des Oleaceae monophylétique, qui comprend 30 genres et 600 espèces. Le nom de genre *Olea* vient du mot grec «elaia» (Mushtaq et al, 2020).

L'olivier (*Olea europea*) est un arbre à feuilles persistantes traditionnellement cultivé pour la production d'huile et d'olives de table (Christoforou et Fokaidis, 2016). Les oliviers sont normalement répartis dans les zones côtières du bassin oriental de la méditerranée, les zones côtières contiguës du sud-est de l'Europe, le nord de l'Iran à l'extrémité sud de la mer Caspienne, en Asie occidentale et en Afrique du Nord (Hashmi et al., 2015).

Plusieurs centaines de cultivars d'oliviers géographiquement diversifiés existent dans le bassin méditerranéen. Ils se distinguent par la morphologie des feuilles, la forme et la couleur de la drupe, la composition de l'huile et la phénologie. Les principaux points descriptifs correspondent à 42 caractéristiques sur la morphologie des feuilles, des fruits et des noyaux, pour leur identification (Breton et al., 2008).

Les cultivars d'olive peuvent être utilisés à des fins alimentaires ou pour la production d'huile (Mushtaq et al, 2020). L'olivier est une espèce à croissance lente et à très longue durée de vie (Mushtaq et al, 2020). Environ 90% des olives sont utilisées pour la production d'huile et 10% pour les olives de table (Mushtaq et al, 2020).

Le fruit d'*O. europaea* est ovoïde, violet noirâtre à maturité, normalement de 1 à 2,5 cm de long (Hashmi et al, 2015). Les fruits d'*O. europaea* contiennent une quantité considérable de flavonoïdes tels que la quercétine, lutéoline-7-O-rutinoside, apigénine-7-O-rutinoside, rutine, de secoiridoïdes, de glycosides secoiridoïdes et de composés phénoliques tels que le tyrosol et l'hydroxytyrosol et leurs dérivés comme l'hydroxytyrosol rhamnoside, Isolement de nouveaux dérivés du tyrosol, du tyrosol glucoside salidroside et du 1-oléyltyrosol, ainsi que du cornoside, du 2 (3,4-dihydroxy-phényl) éthanol, l'halléridone et l'hydroxytyrosol-élénoilate ont également été signalés dans les fruits d'*O. Europaea* (Hashmi et al, 2015). Un composé phénolique important et majeur présent dans les olives de table naturelles est le 3,4-dihydroxyphénylglycol (DHPG), l'oleuropéine est le glycoside secoiridoïde le plus abondamment trouvé dans les fruits d'*O. Europaea* (Hashmi et al, 2015).



Figure 01. Olive (Mushtaq et al, 2020).

La distribution des composés phénoliques dans différentes parties de l'olivier a montré la présence d'oleuropéine, de déméthyleoleuropéine et de verbascoside dans toutes les parties du fruit alors que le nüzhenide s'est avéré être le composé phénolique le plus concentré dans les graines d'olives. Les graines contiennent du nüzhenideoleoside (Hashmi et al, 2015).

L'oléoside a été isolé des graines d'olive. Le glucoside d'acide élénolique a été isolé de la pulpe d'olive (Hashmi et al, 2015).

Les alcools triterpéniques -amyrine, taraxerol, cycloartenol et 24-méthylène cycloartenol ainsi que 4 monométhylstérols, obtusifoliol, gramistérol, cycloeucalénol et citrostadiénol ont été identifiés dans les olives. Différents acides comprennent l'acide caféique, l'acide 2,3-dihydrocaféique été isolés à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle d'olives (Hashmi et al, 2015).

Les tocophérols étaient présents, le profilage qualitatif et quantitatif des sucres dans les tissus végétaux des oliviers, des feuilles et des tiges a abouti à des monosaccharides, des disaccharides, des trisaccharides, des acides et alcools carboxyliques de sucre, des polyols cycliques et des composés dérivés (Hashmi et al, 2015).

Klen et al (2015) ont réalisé une étude sur la présence de constituants phénoliques connus et nouveaux. Le suivie est fait du fruit (peau / pulpe et noyau) à la pâte et aux produits finaux, c'est-à-dire le marc, les eaux usées et l'huile. Quatre-vingt phénols différents, composés de représentants indigènes de fruits et de leurs dérivés technologiquement formés et / ou libérés, ont été détectés dans six matrices d'olive et entièrement caractérisés. En plus des phénols déjà connus dans les matrices d'olive, quatre nouvelles formules moléculaires ont été proposées et trois nouvelles identités provisoires attribuées aux phénols nouvellement découverts, à savoir le β -méthyl-OH-verbascoside, le méthoxynüzhenide et le méthoxynüzhenide 11-méthyl oléoside.

Alves et al (2019) ont réalisé une caractérisation des profils de triacylglycérol et de lipides polaires de la pulpe d'olive, révélant des triacylglycérols avec plus de 350 molécules, portant des acides gras saturés, monoinsaturés, polyinsaturés, pairs, impairs, à chaîne moyenne et longue chaîne. Le lipidome polaire comprend plus d'une centaine de molécules de classes et sous-classes distinctes de lipides, comprenant des phospholipides, des glycolipides, des glycosphingolipides et des bétaines, et portant des acides gras saturés, monoinsaturés, polyinsaturés (y compris les acides gras essentiels 18: 2n-6 et 18: 3n -3), les acides gras monohydroxy et dihydroxy (Alves et al, 2019).

Les olives ne sont pas utilisées comme fruit naturel en raison de leur goût extrêmement amer, mais sont plutôt consommées sous forme d'huile d'olive ou d'olives de table. Le marché de l'huile d'olive est très important dans l'industrie de l'olive, car environ 90% des olives produites annuellement sont destinées à la transformation de l'huile (Hashmi et al., 2015).

L'olive est une riche source de vitamine E et contient une grande quantité de sodium. L'olive contient 75% d'eau, 4% de glucides et 1% de protéines. Les olives noires sont une bonne source de fer. Il contient également du cuivre qui est un minéral essentiel (Afzal et al, 2017).

La production d'huile d'olive génère de grandes quantités de sous-produits solides (grignons) et liquides (margines), qui peuvent affecter significativement l'équilibre économique de cette activité agro-industrielle en raison des coûts associés à leur traitement et/ou élimination (Ducom et al., 2019).

Ces déchets peuvent générer des impacts négatifs sur l'environnement, leurs concentrations élevées en phénol, lipide et acide organique les transforment en matériaux phytotoxiques, mais ces déchets contiennent également des ressources précieuses telles qu'une grande proportion de matière organique et une large gamme de nutriments qui pourraient être recyclés (Roig et al, 2006).

Les phénols d'olive sont les principaux contributeurs à cette pollution en raison de leur toxicité et de leur activité antimicrobienne, créant un problème environnemental majeur dans les principaux pays oléicoles de la région méditerranéenne (Dermeche et al, 2013).

La nature des résidus solides et liquides générés dans les huileries dépend de la technologie utilisée pour l'extraction de l'huile et des conditions locales d'exploitation (Ducom et al., 2019). Deux technologies de base d'extraction d'huile sont appliquées, à savoir le pressage traditionnel (procédés discontinus) et procédés continus (centrifugation) en trois et deux phases (Roig et al., 2006 ; Dermeche et al., 2013 ; Christoforou et Fokaidis, 2016). Le système traditionnel, qui est discontinu, consiste à presser la pâte à l'aide de presses hydrauliques. Ce procédé nécessite l'ajout d'eau chaude (Ducom et al., 2019). En ce qui concerne la centrifugation en deux et trois phases, le rendement en huile produite est similaire pour les deux procédés, mais il existe une différence significative dans la quantité produite et la composition des fractions de résidus solides et liquides (Christoforou et Fokaidis, 2016).

Le système triphasé génère trois fractions à la fin du processus: un solide (grignon d'olive) et deux liquides (huile et eaux usées), alors que, dans système diphasique, on obtient l'huile et un déchet semi-solide contenant à la fois de l'eau et un résidu solide (Aliakbarian et al., 2011 ; Christoforou et Fokaidis, 2016).

2- Compositions générale des sous-produits d'olive

- margine

Sont caractérisés par une coloration noirâtre qui varie selon son état de dégradation. La fraction organique présente une composition complexe et très variable, constituée essentiellement de sucres, de lipides, de polyphénols, de polyalcools, de protéines et des acides organiques (Belaid et al, 2002). Contient également des ressources précieuses telles que des nutriments minéraux, en particulier du potassium, qui pourraient potentiellement être réutilisés comme engrais (Dermeche et al., 2013).

- grignon d'olive

Les déchets de moulin à olives à deux phases est une boue épaisse qui est un mélange de noyau et de pulpe d'olive, ainsi que des eaux usées de moulin à huile ; sa teneur en humidité est comprise entre 55 et 70%, ce qui est nettement plus élevé par rapport au tourteau d'olive dérivé des systèmes de presse traditionnels (20 à 25%) et des déchets de moulin à olives triphasés (40– 45%) (Christoforou et Fokaidis, 2016).

La composition chimique du grignon d'olive varie également en fonction de l'espèce d'olive, des conditions de culture, de l'origine des olives et du processus d'extraction (Dermeche et al, 2013).

La cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont les principaux composants; cependant, les graisses et les protéines sont également présentes en quantités importantes (Dermeche et al, 2013 ; Christoforou et Fokaidis, 2016). Les grignons d'olives sont des matériaux lignocellulosiques (Ducom et al, 2019).

La teneur en matière sèche est élevée dans le tourteau d'olive (Le terme «tourteau» est utilisé pour le marc obtenu à partir de procédés de pressage et de systèmes triphasés) (87,1–94,4%) et la teneur en cendres est plus importante dans le tourteau d'olive et les déchets de moulin à olives à deux phases (1,70–4% et 1,42–4%, respectivement) (Dermeche et al, 2013).

L'analyse minérale montre que les principaux éléments du tourteau d'olive et du déchet de moulin à olives à deux phases sont le potassium, suivi du calcium et du sodium (Dermeche et al, 2013 ; Christoforou et Fokaides, 2016).

L'analyse physicochimique sur vingt six échantillons de grignons d'olive prélevés à partir de différents maasra traditionnelles de la région de Beni Mellal Maroc, été réalisé par MENNANE et al., (2010), montre des moyennes de 65,13% , 5,8% , 4,16% , 9,4% et 59 % respectivement pour la matière sèche, les cendres, la matière azoté, la matière grasse et les fibres.

Grignon d'olive a une teneur en huile de 8 à 12% p/p (Chanioti et Tzia, 2018), qu'il n'est pas possible d'extraire par des moyens physiques (car/ pp 2000).

Grignons d'olive est riche en composés bioactifs, en particulier en polyphénols du groupe alcool phénolique et en fibres alimentaires ; Cependant, le principal composant de fibre alimentaire dans le grignon d'olive est la lignine qui a une faible valeur biologique pour la nutrition humaine ou animale (Speroni, et al, 2019).

Ducom et al (2019) ont comparé Trois grignons d'olives d'origines différentes, Les échantillons prélevés proviennent d'une huilerie industrielle située en Tunisie, une huilerie artisanale située dans le sud de la France et une huilerie industrielle située en Espagne. Les résultats d'analyses rassemblés dans le tableau 1 montrent que les trois échantillons de grignons ont des compositions assez similaires.

Tableau 1. Composition chimique des grignons d'olives : analyses immédiates, analyse élémentaire, teneur en métaux, pouvoir calorifique et analyse des fibres (MS : matière sèche) Ducom et al (2019)

Paramètre	3P-I-T	3P-A-F	2P-I-E
<i>Analyses immédiates</i>			
MV (% massique de MS)	80,0 ± 1,5	79,0 ± 0,4	73,5 ± 0,2
CF (% massique de MS)	17,6 ± 1,5	17,9 ± 0,3	17,6 ± 0,2
Cendres (% massique de MS)	2,5 ± 0,2	3,1 ± 0,2	8,9 ± 0,1
<i>Analyse élémentaire</i>			
C (% massique de MS)	55,1	53,3	48,4
H (% massique de MS)	7,0	7,2	6,0
O (% massique de MS)	33,9	35,2	34,9
N (% massique de MS)	1,3	1,0	1,5
Cl (mg/kg MS)	1400	850	2000
<i>Teneurs en métaux et en S</i>			
K (mg/kg MS)	11300	12400	19700
Ca (mg/kg MS)	14800	2200	7250
P (mg/kg MS)	1080	1490	1650
S (mg/kg MS)	1280	797	1250
Mg (mg/kg MS)	667	489	1180
Fe (mg/kg MS)	258	143	484
Na (mg/kg MS)	557	46	103
Si (mg/kg MS)	197	28	270
Al (mg/kg MS)	142	23	323
Zn (mg/kg MS)	15	351	24
B (mg/kg MS)	26,2	16,2	39,9
Cu (mg/kg MS)	10,9	16,1	16,5
Mn (mg/kg MS)	16,9	8,7	20,6
Sr (mg/kg MS)	63,1	< 5,0	52,3
Zr (mg/kg MS)	2,2	6,0	22,9
<i>Pouvoir calorifique</i>			
PCS (MJ/kg MS)	22,0 ± 0,3	22,7 ± 0,3	19,7 ± 0,1
PCI (MJ/kg MS)	20,4 ± 0,3	21,1 ± 0,3	18,3 ± 0,1
<i>Analyse des fibres</i>			
Solubles (% massique de MS)	34,0 ± 1,3	46,0 ± 0,4	47,3 ± 0,9
Cellulose (% massique de MS)	33,8 ± 0,5	27,7 ± 0,6	24,8 ± 1,6
Hémicelluloses (% massique de MS)	16,3 ± 2,3	13,0 ± 0,4	14,5 ± 1,5
Lignine (% massique de MS)	15,8 ± 0,7	13,3 ± 0,5	13,4 ± 0,5

3- Polyphénols des grignons d'olive

Seulement 2% des composés phénoliques sont transférés dans l'huile et jusqu'à 98% retenus dans le tourteau, le grignon d'olive a été considéré comme une source intéressante de composés phénoliques (Aliakbarian et al., 2011).

Le grignon d'olive (La variété Chemlali- issu d'une extraction de l'huile d'olive à trois phases) renferme divers composés phénoliques : des polyphénols solubles dans le méthanol-eau et dans l'acétone-eau, des polyphénols attachés aux parois cellulaires, des flavonoïdes et des tanins (hydrolysables et condensés). Ces métabolites ont la propriété de se lier à la cellulose et aux protéines et d'autre part les deux tiers des composés totaux dosés sont localisés au niveau de la paroi cellulaire (Zaidi et al., 2009).

Dans les extraits de grignons d'olive, un certain nombre de composés phénoliques, notamment l'acide 7-désoxyloganique, l'acide loganique, la loganine, la sécologanine, le sécologanoside, la taxifoline, l'acide rosmarinique, l'acide férulique, l'acide cinnamique, l'acide shikimique, l'acide protocatéchuique et l'acide gallique ont été identifiés (Hashmi et al, 2015).

Un chromatogramme effectué par Cioffi et al. (2010) de grignon d'huile d'olive a montré la présence d'acide gallique, d'hydroxytyrosol, de tyrosol, d'acide caféique, d'oleuropéine, de ligstroside aglycone, d'oleuropéine aglycone, d'acide férulique et d'acide vanillique.

Les phénols de grignons d'olive sont divisés en quatre classes: les phénols simples tels que le tyrosol et ses dérivés, les acides cinnamiques tels que l'acide p-coumarique et le verbascoside, les flavonoïdes comme la rutine et l'apigénine, et les secoiridoïdes comme l'oleuropéine et ses dérivés (Aliakbarian et al., 2018).

Plusieurs milliers de molécules ayant une structure polyphénol (c'est-à-dire plusieurs groupes hydroxyle sur des cycles aromatiques) ont été identifiées dans les plantes supérieures, et se trouvent dans les plantes comestibles (Manache et al., 2004).

Ces molécules sont des métabolites secondaires des plantes, peuvent être classés en différents groupes en fonction du nombre de cycles phénol qu'ils contiennent et des éléments de structure qui lient ces cycles entre eux. Des distinctions sont ainsi faites entre les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes (Manache et al., 2004 ; Han et al., 2007). La classification et structure chimique des principales classes de polyphénols alimentaires est représentées par la figure 2 (Martin et Appel, 2010).

La classification la plus courante implique la subdivision des phénoliques en deux groupes principaux: les flavonoïdes (par exemple, anthocyanes, flavanols, flavanones, flavonols, flavonones et isoflavones) et les non-flavonoïdes (par exemple, acides phénoliques, xanthones, stilbens, lignanes et tanins) (Durazzo et al, 2019).

Le grand intérêt des polyphénols est lié à leur application à fort potentiel pour une utilisation thérapeutique bénéfique. La relation entre l'apport en polyphénols et la santé humaine a été exploitée avec une référence particulière aux maladies cardiovasculaires, à l'hypertension, au diabète, au syndrome métabolique, à l'obésité et au cancer, l'utilisation des bases de données existantes sur les composés bioactifs, y compris les polyphénols, est décrite comme des outils clés pour la recherche en santé humaine (Durazzo et al, 2019). Les polyphénols sont de puissants antioxydants qui complètent les fonctions des vitamines et des enzymes antioxydantes comme moyen de défense contre le stress oxydatif (Martin et Appel, 2010).

4- L'inflammation

L'inflammation est une réponse corporelle à une blessure, une infection ou une destruction caractérisée par la chaleur, la rougeur, la douleur, l'enflure et des fonctions physiologiques perturbées (Chandra et al, 2012). L'inflammation est une réponse protectrice normale aux lésions tissulaires causées par un traumatisme physique, des agents chimiques ou microbiens nocifs. C'est la réponse du corps pour inactiver ou détruire les organismes envahisseurs, pour éliminer les irritants et préparer le terrain pour la réparation des tissus. Elle est déclenchée par la libération de médiateurs chimiques des tissus lésés et des cellules en migration (Chandra et al, 2012 ; Alhakmani et al, 2013).

La dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes bien documentées des maladies inflammatoires et arthritiques. Les agents qui peuvent empêcher la dénaturation des protéines seraient utiles pour le développement de médicaments anti-inflammatoires (Chandra et al, 2012).

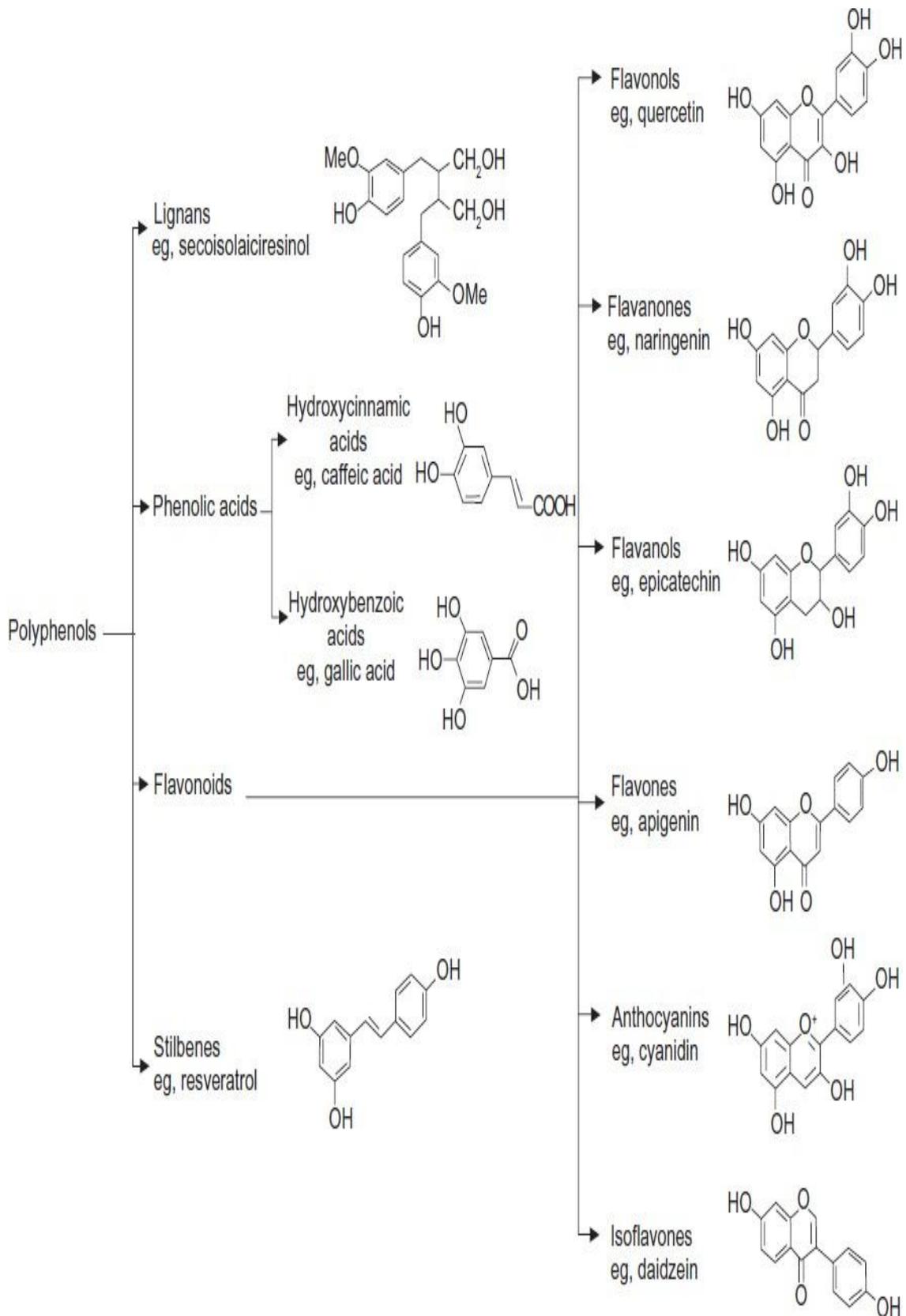


Figure 02. Classification et structure chimique des principales classes de polyphénols alimentaires (Martin et Appel, 2010).

La surproduction d'auto-antigènes par dénaturation des protéines tissulaires comme dans le cas de l'arthrite peut également être l'une des principales causes de réactions inflammatoires. Quelle que soit la cause de l'inflammation, tous sont caractérisés par quatre signes cardinaux à savoir. Rougeur, gonflement, chaleur et douleur. Ainsi, l'objectif du traitement de l'inflammation est de réduire ou de prévenir la production d'agents inflammatoires qui déclenchent les signes et les symptômes de l'inflammation (Sridevi et al, 2015).

L'inflammation est un processus complexe, qui est fréquemment associé à la douleur et implique des événements tels que: l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'augmentation de la dénaturation des protéines et l'altération des membranes. La dénaturation des protéines est causée par un processus d'inflammation, principalement dans des conditions comme l'arthrite (Umapathy et al., 2010).

La réduction de la dénaturation des protéines est une autre méthode pour montrer la capacité anti-inflammatoire. La dénaturation des protéines est un processus pathologique par lequel les protéines perdent leur configuration et deviennent sans fonction. Cela se produit généralement lorsque les protéines sont exposées à un stress externe comme la chaleur, un acide fort ou une base. Ces forces externes font perdre aux solvants organiques ou inorganiques des protéines leur structure tertiaire et secondaire et leur font perdre leur capacité fonctionnelle (Sridevi et al, 2015). Outre le changement de configuration, le mécanisme de dénaturation implique également une modification de l'hydrogène électrostatique, des liaisons hydrophobes et disulfures (Sridevi et al, 2015).

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

Hashimi et al. (2015) ont cités des travaux qui montrent que l'huile d'olive extra vierge, les extraits d'olive et l'extrait de feuilles sèches ont une activité anti-inflammatoire remarquable.

5 - L'hémolyse

L'hémolyse est un phénomène normal qui aboutit à la destruction des hématies dans la rate et la moelle osseuse au terme d'une vie de 120 jours (Mezzour et al., 2006).

L'hémolyse en milieu hypotonique qui s'explique principalement par des changements conformationnels ou associatifs des protéines membranaires conduisant à la formation de

trous et à une hémolyse ultérieure. Ces pores permettent la diffusion de l'hémoglobine dans le milieu extracellulaire (Manaargadoo-Catin et al., 2016).

Des études ont montré l'effet antihémolytique des polyphénols. L'extrait de graine de jaboticaba lyophilisé (*Myrciaria jaboticaba*) a montré des effets anti-hémolytiques *in vitro*. L'extrait de graine de jaboticaba lyophilisé (*Myrciaria jaboticaba*) a été efficace pour diminuer le taux d'hémolyse, indiquant ainsi que les polyphénols contenus dans le L'extrait de graine de jaboticaba lyophilisé (*Myrciaria jaboticaba*) ont protégé les érythrocytes humains de l'hémolyse (Fidelis et al., 2020).

En cas d'hémolyse induite par une solution hypotonique, l'extrait de Herbe *Triticum aestivum* s'est avéré assez efficace dans les études de stabilisation membranaire et de stabilisation des érythrocytes qui pourraient être corrélées à la stabilisation de la membrane lysosomale (Johri et Khan., 2017). Par conséquent, la forte activité de stabilisation membranaire de l'extrait peut être due à la présence de flavonoïdes ou de saponines puisque les tanins étaient peu présents dans l'extrait (Johri et Khan., 2017).

L'étude expérimentale est réalisée au niveau 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.

1- Préparation des extraits des grignons d'olive :

1-1- 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 à l'air libre (dans un endroit sec, ventilé et ombragé), celui-ci est broyé à l'aide d'un Moulinex pour obtenir une poudre.

1-2- Délipidation : Extraction de Soxhlet

Un ballon contenant 500 ml d'hexane et surmonté d'un Soxhlet qui comporte une cartouche contenant 10 g de grignons d'olive broyées.

L'ensemble est porté à reflux (à 40°C) pendant 4 heures à l'aide de chauffe ballon.

2- Extractions hydro-alcooliques :

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

a- Deux béchers différents incluant chacun 05g de la poudre du GO et 20 ml d'eau distillé, par la suite :

- 80ml de méthanol est ajouté dans le 1^{er} bécher et

- 80ml d'éthanol est ajouté dans le second bécher.

b- Macération : laisser les mélanges macérer pendant 24 heures à l'obscurité et à température ambiante.

c- Filtration : Filtrer sur papier filtre (figure 3).

d- L'évaporation : Le filtrat placé dans un rotavapeur à 40 °C (figure 4) pour assurer l'évaporation du solvant.

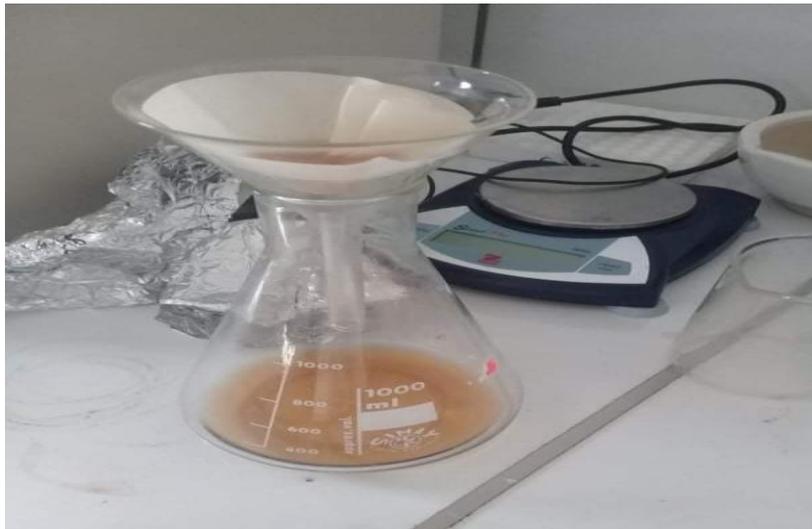


Figure 03 : la filtration du macérât de grignon d'olive.



Figure 04 : Photographie du Rotavapor utilisé.



Figure 05: Extraits de grignon d'olive après séchage.

e- calculer le rendement en pourcentage de grignon d'olive en extrait sec 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.

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

3-1- Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRH) :

Dans des tubes héparinisés, des échantillons de sang frais (environ 8 ml) ont été récupérés, 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.

3-2- 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 et 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 utilisé est celui de Bulmus et ses collaborateurs (2003), où un volume de 1.6 ml de l'extrait méthanolique, éthanolique et l'acide gallique (molécule de référence de CP) est 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 37°C, pendant 30 min, ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min et l'absorbance de l'Hb libérée a été mesurée 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.

3-3- 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).

– **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), le tout 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.

A la fin, les tubes sont refroidis sous l'eau courante et suivis par une centrifugation à 2500 rpm 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 est estimé à partir de l'expression suivante :

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

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

3-4- 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).
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 tampon phosphate (Ph=6,3) a été ajouté aux solutions ci-dessus. L'absorbance est mesurée par le spectrophotomètre UV –visible à 416 nm, et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit:

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

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

1- Rendements d'extraction des composés phénoliques de grignon d'olive délipidé:

Le calcul des rendements est réalisé pour les deux macérations concernant le grignon d'olive délipidé sec dans le méthanol et l'éthanol.

Les résultats sont indiqués dans le Tableau 02

Les résultats montrent que le rendement d'extraction des polyphénoles par le méthanol atteint (8%) comparé à l'éthanol qui a un rendement de (7%).

Les rendements d'extraction avec le méthanol sont supérieurs à ceux obtenus avec l'éthanol.

Tableau 02 : rendements d'extraction des composés phénoliques de grignon d'olive délipidé.

macération	Extrait méthanolique	Extrait éthanolique
rendement	8%	7%

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

2- 1- Test de cytotoxicité (Figure 06, Tableau A1 en Annexes)

Le test de cytotoxicité in vitro représenté par le pourcentage d'hémolyse des globules rouges est réalisé en utilisant des globules rouges d'un donneur en bonne santé.

Différentes concentrations des extraits méthanoliques et éthanoliques de grignons d'olive délipidé sont testés par comparaison à l'acide gallique (polyphénol de référence).

Le pourcentage de l'hémolyse est évalué pour chaque extrait, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des globules rouges par hémolyse, en comparaison au contrôle négatif (C-, solution de GR dans de l'eau physiologique, ayant un taux d'hémolyse très faible, 15%) et au contrôle positif (C+, solution de GR dans de l'eau distillée afin de provoquer une hémolyse totale, 100% d'hémolyse).

Nos résultats montrent que l'acide gallique a un effet hémolytique faible (13.40 %) à la concentration de 125 µg/mL en comparaison avec le contrôle négatif (C- :15 %). Cet effet hémolytique augmente à une valeur égale à 21.30%, à la concentration de 250 µg/mL, un taux de 34% à la concentration 500 µg/ml et atteint un maximum de 80 % à la concentration 1mg/mL (Figure 02).

L'extrait **méthanolique** de GO délipidé exerce un effet hémolytique des GR faible à différentes concentrations 125µg/ml, 250µg/ml (7% ,9%) respectivement comparé au contrôle négatif (15%). Ce taux augmente avec la concentration 500 µg/mL pour atteindre 25% d'hémolyse. A la concentration 1 mg/ml, le taux d'hémolyse augmente et atteint 68%.

L'extrait **éthanolique** de GO délipidé à un effet hémolytique faible à la concentration 125µg/ml ,250 µg/ml et 500µg/ml avec un pourcentage d'hémolyse qui est en moyenne de (7% à 10% et 18%) respectivement, à la concentration de 1mg/ml, on note aussi que l'extrait éthanolique des GO délipidé est moins cytotoxique (30%) par rapport à l'extrait méthanolique (68%).

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

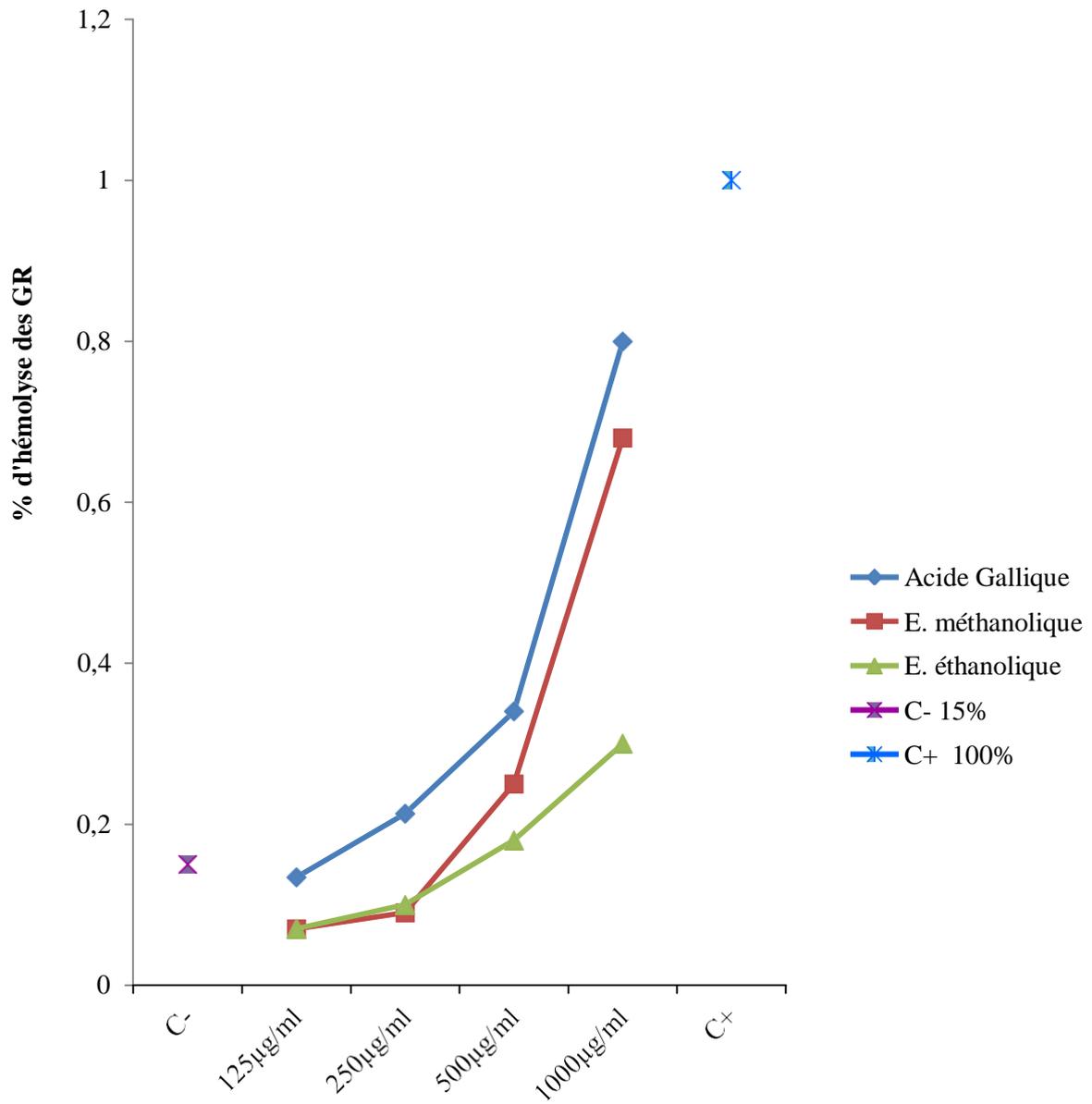


Figure 06 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique, l'extrait éthanolique et méthanolique des grignons d'olive délipidé.

2-2- Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges) des extraits de grignon d'olive délipidé (Figure 07, le Tableau A2 en annexe)

L'étude de l'activité anti-hémolytique in vitro des extraits méthanoliques et éthanoliques de GO délipidé est réalisée en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges (GR). L'évaluation de la stabilisation membranaire est mesurée par le taux de libération de l'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration des extraits utilisés et en les comparant à deux molécules de référence, à savoir le Diclofénac qui est un médicament anti-inflammatoire et anti-hémolytique et l'acide gallique.

Nos résultats montrent que l'acide gallique à faibles concentrations de 10 et 30 µg/mL présente un effet anti-hémolytique, protecteur et stabilisateur des membranes des GR, important allant de 37 % à 60 % et atteint son maximum à une concentration de 75 µg/mL avec (82%) de protection. Par la suite, l'effet protecteur diminue significativement et ne représente que 79% et 52% aux concentrations 150 µg/mL et 300µg/mL respectivement.

Le Diclofénac possède un effet anti-hémolytique faible (21%, 30%) à concentration (10 et 30µg/mL µg/mL). L'effet protecteur augmente au fur et à mesure avec l'augmentation de la concentration du Diclofénac et atteint 80 % à la concentration 300 µg/mL.

L'activité protectrice des membranes en présence **des extraits méthanolique de GO délipidé** augmente aussi avec l'augmentation de la concentration des extraits méthanoliques (69, 71 %) avec les concentrations 10 µg/mL et 30µg/mL respectivement, mais se stabilise à 75 µg/mL avec 73%. En effet, à la concentration de 150 µg/mL, l'effet anti-hémolytique est identique à celui observé à la concentration de 75 µg/mL et augmente à 74% à la concentration 300µg/mL.

Les données obtenues avec **l'extrait éthanolique de GO délipidé** indiquent qu'il présente une activité importante, Cette activité stabilisatrice de la membrane des GR augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits éthanoliques, (26%, 58 % et 62%) avec la concentration de 10 µg/mL, 30µg/mL et 75µg/mL respectivement. L'effet anti-hémolytique atteint (70%) à une concentration de 300 µg/mL. L'effet anti-hémolytique des extraits de GO délipidé est par la suite comparé à celui de l'acide gallique et du Diclofénac.

Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques de GO délipidé, à faibles concentrations (10 et 30 µg/mL) présentent un effet anti-hémolytique plus élevé que le Diclofénac, l'acide gallique et l'extrait éthanolique à la même concentration.

A concentration (75 $\mu\text{g/mL}$ et 150 $\mu\text{g/ml}$), l'effet protecteur des extraits méthanoliques est plus faible que l'acide gallique, mais reste supérieur à celui de diclofénac et de l'extrait éthanolique. L'effet de l'extrait méthanolique devient plus faible à celui du Diclofénac à forte concentration (300 $\mu\text{g/mL}$), mais supérieur à celui de l'acide gallique et l'extrait éthanolique à la même concentration

L'extrait éthanolique de GO délipidé induit un effet anti-hémolytique plus important que celui du Diclofénac à faible concentration (10, 30 et 75 $\mu\text{g/mL}$), mais l'effet devient plus faible à celui du Diclofénac à forte concentration (150 et 300 $\mu\text{g/mL}$), et aussi inférieur à celui de l'acide gallique sauf à la concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$ où l'extrait éthanolique affiche un effet élevé par comparaison à celui de l'acide gallique à la même concentration

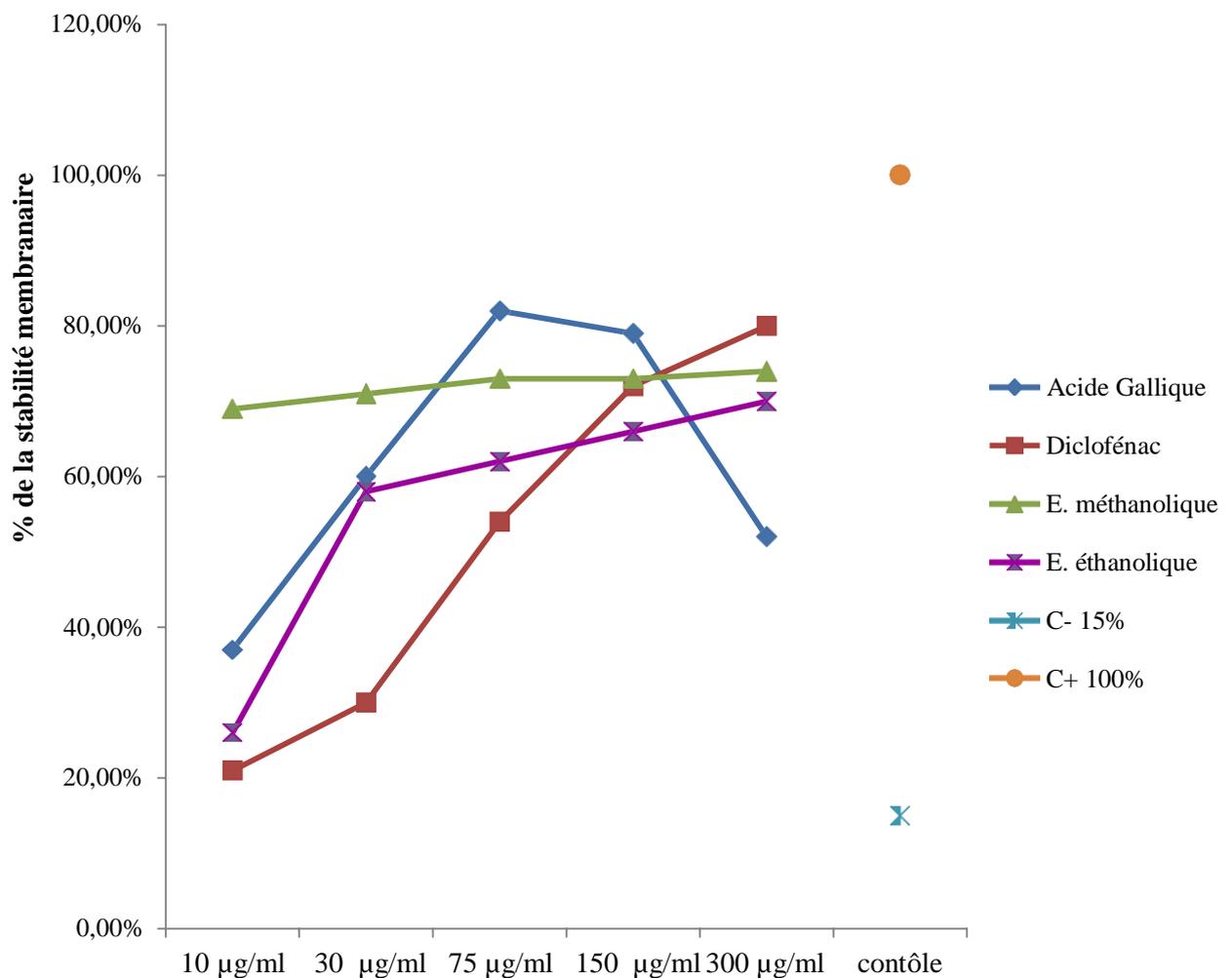


Figure 07 : l'effet anti-hémolytique entre l'acide gallique, le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive délipidé.

2-3- Test anti –Inflammatoire (Figure 08 et Tableau A3 en Annexes).

Le test de l'inhibition de la dénaturation protéique est le plus convenable pour l'évaluation de l'activité anti inflammatoire in vitro des extraits de grignon d'olive délipidé. La protéine utilisée pour ces tests est l'albumine de sérum bovine (BSA).

Les résultats montrent que le Diclofénac montre son effet anti-inflammatoire par inhibition de la dénaturation protéique qui se traduit par l'augmentation du pourcentage lorsque la concentration augmente, ainsi à faible concentration de 250 pg/ml, l'effet protecteur été de (69%) qui atteint 89% à la concentration 250µg/ml.

Les résultats obtenus avec l'extrait éthanolique et méthanolique indiquent un effet protecteur contre la dénaturation protéique important. Les extraits étudiés donnent un pourcentage d'inhibition égale à 99% à la concentration de 250 µg/ml comparé à 89% pour le diclofenac à la même concentration.

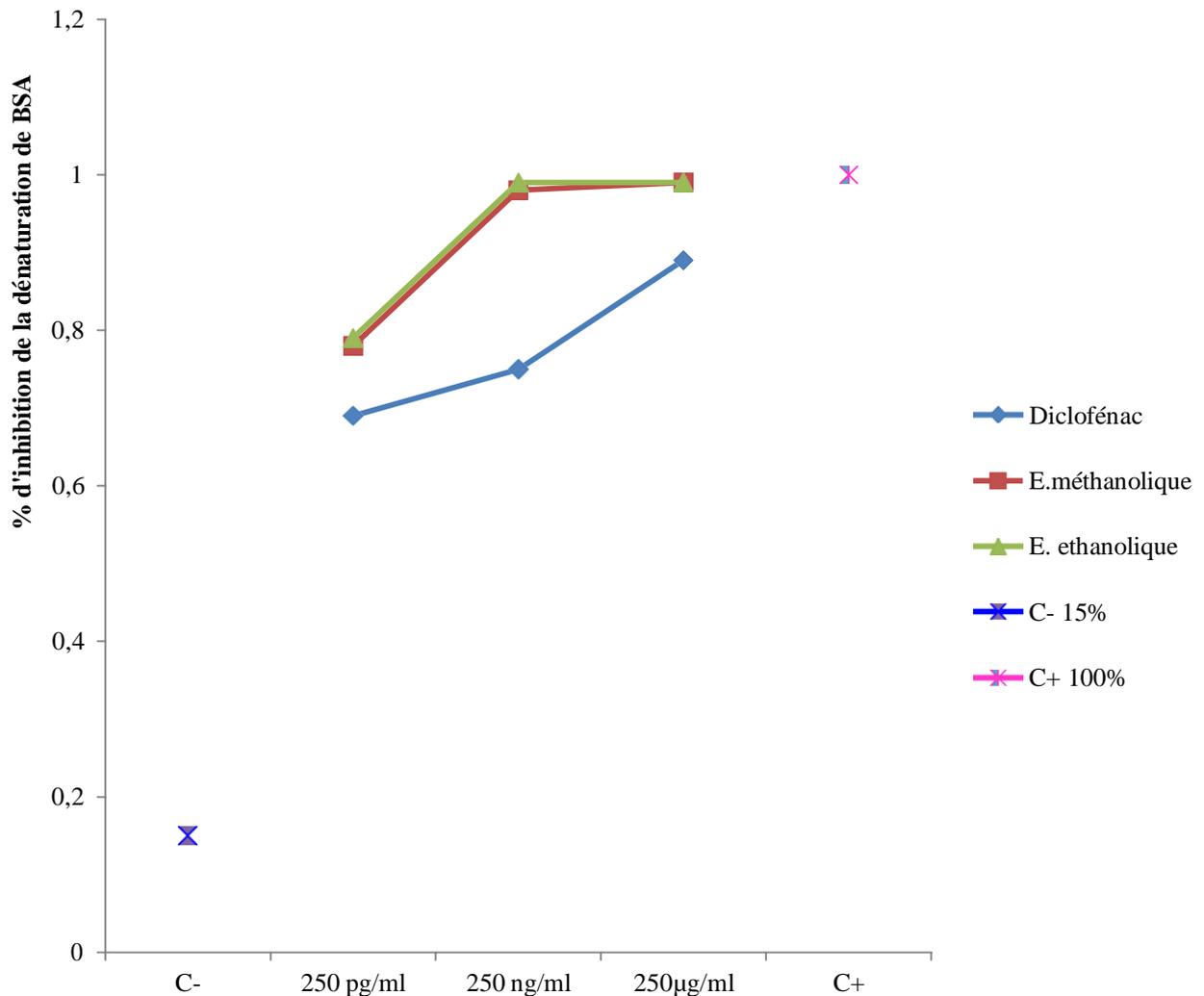


Figure 08 : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanoliques de grignon d'olive délipidé

L'industrie de l'huile d'olive génère de grandes quantités de grignons d'olive. L'élimination des grignons d'olive soulève des préoccupations environnementales car elle a une forte demande biochimique en oxygène. De nombreuses études ont été menées pour réduire l'impact environnemental en trouvant une applicabilité pour des grignons d'olive, y compris son utilisation comme ingrédient pour les aliments fonctionnels destinés à la nutrition humaine et animale (Speroni et al., 2019).

Le grignon d'olive est un déchet solide hétérogène peu coûteux, il est considéré comme une riche source de composés phénoliques avec un large éventail d'activités biologiques (Morsi et al, 2016). La quantité et le type de composés phénoliques dans le grignon d'olive dépendent du cultivar et de la maturité du fruit, des conditions climatiques, de la durée de stockage et de la technique de transformation. Les principaux composés phénoliques présents dans le grignon d'olive sont l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine et le tyrosol, l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide vanillique et la rutine (Morsi et al, 2016).

Notre travail de Master contribue à la valorisation du grignon d'olive à travers les activités biologiques des extraits méthanoliques et éthanoliques.

Dans notre travail, le rendement de l'extraction des polyphénols par le méthanol est meilleur par rapport à l'éthanol. Ceci est probablement dû au fait à une meilleure solubilité du composé phénolique dans le méthanol par rapport à l'éthanol. On peut aussi considérer que le rapport solvant / solide et le temps d'extraction ont des effets positifs sur l'extraction.

La solubilité des composés phénoliques est régie par leur nature chimique dans la plante, qui peut varier du simple au très fortement polymérisé. Il existe une possibilité d'interaction des composés phénoliques avec d'autres composants végétaux tels que les glucides et les protéines qui peuvent conduire à la formation de complexes qui peuvent être tout à fait insolubles, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du ou des solvants utilisés (Garcia-Salas et al., 2010).

Les résultats rapportés par Zaidi et al. (2009), montrent la présence de diverses classes et catégories de composés phénoliques. Les teneurs varient de 1.2 % (méthanol) à 1.5 % (acétone) pour les phénols totaux solubles, de 0.17 % à 0.24 % respectivement pour les phénols polymérisés et de 0.16 % à 0.19 % pour les flavonoïdes.

Une fraction importante des composés phénoliques du grignon d'olive est fortement liée aux parois cellulaires (2.08 % et 2.64 % respectivement pour les extraits au méthanol et à l'acétone) soit les 2/3 des composés phénoliques totaux révélés par dosages. Les composés phénoliques solubilisés par chacun des deux solvants se distinguent par leur propriété à se lier à la cellulose (41 à 60 %) et aux protéines (59 %). Les extraits à l'acétone-eau sont plus riches en composés phénoliques que les extraits au méthanol-eau (Zaidi et al., 2009).

Morsi et al, (2016) ont effectué une extraction assistée par les ultrasons (EAU) sur les polyphénols du grignon d'olive avec du méthanol (80%) comme milieu d'extraction. Les EAU utilisant un rapport méthanol: marc de 40: 1 pendant 30 min ont donné un extrait avec des polyphénols totaux de $86,13 \pm 0,80$ mg GAE / g de marc d'olive dégraissé. En revanche, la teneur totale en polyphénols de l'extrait obtenu à un ratio solvant plus faible (20: 1) pendant une courte durée (7 min) ne dépassait pas $23,15 \pm 0,14$ mg GAE / g de marc d'olive dégraissé.

Le polyphénol d'origine végétale peut être divisé en polyphénols extractibles (EPP) et en polyphénols non extractibles (NEPP). Les PPE sont reconnus pour exercer des effets bénéfiques sur la santé en réduisant le risque de maladies cardiovasculaires, de cancer et de troubles neuro-dégénératifs (Speroni, et al., 2019).

Les NEPP ne sont pas solubles dans les solvants aqueux et organiques qui sont utilisés pour l'extraction des polyphénols et sont donc généralement ignorés dans les études sur la composition des aliments. Cependant, les NEPP constituent la principale quantité de polyphénols dans l'alimentation et il est de plus en plus prouvé qu'il s'agit d'antioxydants alimentaires pertinents qui favorisent la santé gastro-intestinale (Speroni, et al., 2019).

L'étude de la cytotoxicité des extraits de grignon d'olive, *in vitro* est réalisée par l'utilisation des globules rouges. Le modèle érythrocytaire a été largement utilisé car il présente une indication directe de la toxicité des formulations injectables ainsi qu'une indication générale de la toxicité membranaire, un autre avantage du modèle d'érythrocytes est que le sang est facilement disponible et que les cellules sont faciles à isoler du sang; de plus, sa membrane présente des similitudes avec d'autres membranes cellulaires (Mohammedi et Atik, 2014).

Concernant nos résultats obtenus avec les extraits de grignon d'olive, on remarque que l'effet cytotoxique est concentration dépendant. Les extraits de grignon d'olive ne présentaient pas un effet nocif sur les érythrocytes à de faibles concentrations par rapport à l'acide gallique qui

est utilisé dans notre travail comme un polyphénol de référence, ainsi l'acide gallique montre une toxicité de 80 % d'hémolyse.

Selon l'étude de Nabavi et al (2012), différents extraits de *Primula heterochroma* Stapf été examinés (extrait hydroalcoolique brut, flavonoïde, polyphénol, anthocyanine et polysaccharide) se sont révélées interagir avec les composants lipidiques et protéiques des membranes fantômes des globules rouges. Ils ont également de puissantes activités antioxydantes et antihémolytiques. De plus, les activités antioxydantes et antihémolytiques des fractions sont liées à l'augmentation de l'intégrité membranaire des membranes des globules rouges incorporées au composé naturel.

Aliakbarian et al, (2012) ont étudié l'activité biologique de l'extrait de grignons d'olive avec l'activité antioxydante la plus élevée en utilisant un modèle cellulaire in vitro de stress oxydatif induit par l'anoxie des cellules endothéliales EAhy926 en présence ou en l'absence d'extrait de grignons d'olive, en évaluant l'expression d'iNOS et de COX-2, impliqués dans l'inflammation, la cytotoxicité et le dysfonctionnement endothélial. Après 24 h de traitement, l'anoxie a conduit à une augmentation de l'iNOS et de la COX-2. Ces deux molécules favorisent la peroxydation lipidique, la production de peroxy-nitrites hautement toxiques, les effets cytotoxiques dans les cellules endothéliales et l'inflammation. Ces effets délétères ont été évités de manière significative par le traitement à l'extrait de grignons d'olive.

L'hémolyse hypotonique est une condition extrême de fragilité osmotique érythrocytaire car la faible pression osmotique dans le milieu extracellulaire oblige l'érythrocyte à absorber de l'eau pour atteindre l'équilibre osmotique. L'excès d'eau extracellulaire provoque un gonflement significatif et la membrane de la cellule se perturbe, libérant le contenu intracellulaire (c'est-à-dire l'hémoglobine) qui peut être surveillé par spectrophotométrie (Zhang et al., 2019).

Dans notre étude, les extraits de grignons d'olive ont inhibé la lyse induite par l'hypotonie de la membrane érythrocytaire, ont présenté un effet de stabilisation de la membrane.

Les extraits riches en phénol peuvent diminuer l'hémolyse érythrocytaire dans des conditions hypotoniques en réduisant la fluidité de la membrane cellulaire et en augmentant la pression osmotique causée par la présence d'ions (Zhang et al., 2019).

L'étude réalisée par Pawlikowska-Pawle et al. (2003) montre l'effet protecteur de la quercétine sur l'hémolyse en solution hypotonique qui a augmenté avec l'augmentation de la concentration du composé.

La quercétine a des effets protecteurs contre la peroxydation lipidique dans les érythrocytes humains. De cette manière, elle agit comme antioxydant et piègeur de radicaux libres, protégeant ainsi les phospholipides membranaires. Une autre explication possible, l'hémolyse hypotonique est inhibée par la modification de la perméabilité membranaire ou l'augmentation du rapport surface / volume de la cellule (Pawlikowska-Pawle et al., 2003).

Les protéines du cytosquelette et les protéines membranaires intégrales sont responsables de la forme des globules rouges. Par conséquent, l'interaction de la quercétine avec les protéines membranaires peut entraîner des modifications de la forme et de la taille des érythrocytes et provoquer une modification de la réaction de la cellule aux agents hémolytiques. (Pawlikowska-Pawle et al., 2003).

On pense que l'effet protecteur des extraits de grignons d'olive contre l'hémolyse hypotonique peut être dû à l'interaction avec les protéines et les lipides membranaires qui fait face aux agents hémolytiques, les extraits de grignons d'olive peuvent avoir une fonction de stabilisation membranaire ce qui conduit à la prévention des fuites du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire pendant une période de perméabilité accrue causée par une solution hypotonique qui est l'agent hémolytique.

Dans l'étude sur *Triticum aestivum*, quatre extraits différents (éther de pétrole, acétate d'éthyle, n-butanol, aqueux) d'herbe *Triticum aestivum* ont été utilisés pour tester l'activité antioxydante et antihémolytique. Une activité antihémolytique maximale a été trouvée dans les extraits de n-butanol (Johri et Khan., 2017).

Fidelis et al., (2019) ont étudié le potentiel anti-hémolytique des graines de Camu-camu (*Myrciaria dubia*). Les phénoliques présents dans l'extrait de graines de camu-camu lyophilisé optimisé (LOCSE), protègent les érythrocytes contre l'hémolyse éventuellement par la formation de liaisons hydrogène entre les groupements -OH des phénoliques avec les têtes polaires des phospholipides membranaires. Cette interaction augmente la rigidité de la membrane, la rendant moins sensible à l'hémolyse.

L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide à l'intérieur de la cellule entraînant la rupture de sa membrane. Une lésion de la membrane des globules rouges rendra la cellule plus sensible aux dommages secondaires par peroxydation lipidique induite par les radicaux libres (Anosike et al., 2012).

L'inflammation est un signe positif montré par le tissu vivant pour déclencher une alarme concernant une irritation ou / et une infection ou / et une blessure qui se produit à l'intérieur ou à l'extérieur du corps. Le processus inflammatoire commence par l'activation des neutrophiles et la libération des enzymes comme les enzymes bactéricides et les protéases. Ces enzymes induisent la peroxydation lipidique et la libération d'enzymes lysosomales qui endommageront les macromolécules (Sridevi et al, 2015). Cette chaîne de réactions peut finalement provoquer de nombreux changements physiopathologiques aboutissant à des maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi, la stabilisation de la membrane lysosomale est importante pour prévenir l'inflammation (Sridevi et al, 2015).

Les protéines membranaires sont en grande partie responsables des propriétés physiques de la membrane cellulaire et peuvent contribuer à la régulation du volume et de la teneur en eau des cellules en contrôlant le mouvement des ions sodium et potassium, une lésion de la membrane du lysosome déclenche généralement la libération de phospholipase A2 qui intervient dans l'hydrolyse des phospholipides pour produire des médiateurs inflammatoires (Umapathy et al, 2010).

Puisque la membrane des globules rouges est similaire à celle de la membrane lysosomale, l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges fournira par conséquent de bonnes informations sur le processus inflammatoire, d'autant plus que les deux événements sont également consécutifs à une blessure (Umapathy et al, 2010).

La stabilisation des membranes de ces cellules inhibe la lyse et la libération ultérieure du contenu cytoplasmique qui à son tour limite les dommages tissulaires et l'exacerbation de la réponse inflammatoire (Umapathy et al, 2010).

L'extrait de grignon d'olive et le médicament de référence, le diclofénac sodique, ont présenté une inhibition proportionnelle à la dose de la dénaturation de l'albumine de sérum bovin induite par la chaleur.

Bien que l'effet de l'extrait de grignon d'olive sur l'inhibition de la dénaturation de l'albumine s'est avéré comparable à celui du médicament standard, le diclofénac sodique. Ainsi, on peut attribuer que l'activité anti-inflammatoire de grignons d'olive pourrait être due à leur forte teneur phénolique.

Une évaluation *in vitro* de l'effet de grignons d'olive sur la stabilisation de la membrane a montré qu'il inhibait la lyse des globules rouges induite par la chaleur et l'hypotonicité.

L'interaction directe des constituants de l'extrait avec des composants membranaires tels que les protéines semble la plus probable. Les protéines membranaires sont en grande partie responsables des propriétés physiques de la membrane cellulaire et peuvent contribuer à la régulation du volume et de la teneur en eau des cellules en contrôlant le mouvement des ions sodium et potassium à travers les canaux protéiques qui constituent les canaux ioniques dans la membrane cellulaire (Umapathy et al., 2010).

La capacité de l'extrait de grignon d'olive à inhiber la dénaturation thermique et hypotonique des protéines peut contribuer à ses propriétés anti-inflammatoires.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont couramment utilisés pour la gestion des états inflammatoires, mais ceux-ci sont associés à de nombreux effets secondaires indésirables tels que l'irritation gastrique, l'ulcère, etc. Les plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les conditions anti-inflammatoires semblent une alternative viable et logique à la recherche d'agents anti-inflammatoires sûrs et efficaces.

La dénaturation des protéines tissulaires conduit à des maladies inflammatoires et arthritiques. Les produits naturels qui peuvent empêcher la dénaturation des protéines seraient donc utiles pour le développement d'un traitement médicamenteux anti-inflammatoire (Alhakmani et al, 2013).

La lyse des membranes lysosomales provoque des fuites d'enzymes comme les protéases et la phospholipase A2 en cas d'arthrite. Les globules rouges ont des membranes similaires aux lysosomes. Par conséquent, les agents protégeant la membrane globules rouges sous contrainte pourraient être capables de stabiliser la membrane lysosomale endogène (Saleem et al., 2019).

Saleem et al., (2019) apportent que le potentiel de stabilisation de la membrane des extraits de *P. braunii* pourrait être dû à la présence de divers phyto-phénols et flavonoïdes qui ont été

impliqués pour la protection des membranes des globules rouges et la protection des activités des enzymes ATPase.

Pendant l'inflammation, il y a des lyses de lysosomes qui libèrent leurs enzymes composants qui produisent une variété de troubles. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) exercent leurs effets bénéfiques soit en inhibant la libération d'enzymes lysosomales, soit en stabilisant les membranes lysosomales. L'exposition des globules rouges à des substances nocives telles que le milieu hypotonique, la chaleur, le salicylate de méthyle ou la phénylhydrazine entraîne la lyse des membranes, accompagnée d'hémolyse et d'oxydation de l'hémoglobine (Anosike et al., 2012).

Le grignon d'olive, dont la composition chimique dépend de divers facteurs tels que la variété d'olive, les conditions de culture et la méthode d'extraction, a été utilisé avec succès, entre autres, pour l'extraction de composés phénoliques en raison de leurs propriétés bioactives.

Les aliments d'origine végétale contiennent naturellement des polyphénols; qui sont des composés biologiquement actifs dans les aliments d'origine végétale.

Dans ce travail de master, nos objectifs étaient l'étude des activités biologiques in vitro des extraits de grignon d'olive par deux solvants (méthanol et éthanol).

Nos résultats indiquent que les extraits du GO ont un effet cytotoxique à forte concentration (1mg/mL), mais, à faible concentration (125ug/mL), l'effet est faible puisque le taux d'hémolyse est réduit.

De ce fait, les résultats montrent que les extraits méthanoliques et éthanoliques du GO exercent des effets anti-hémolytique très importants et assurent une stabilité à la membrane érythrocytaire par apport à l'acide gallique et le Diclofénac, utilisés comme référence.

Les extraits de grignons d'olive ont inhibé la lyse induite par l'hypotonie de la membrane érythrocytaire, ont présenté un effet de stabilisation de la membrane et ont ainsi montré un effet anti-inflammatoire significatif.

Bien qu'il existe de nombreux médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens disponibles sur le marché, la vague de recherche de certains produits à base de plantes naturelles comme alternative à ceux-ci n'est pas encore éteinte, principalement en raison des effets secondaires minimaux ou nuls par ces produits à base de plantes. La présente étude en fait partie et les résultats nous encouragent à dire que l'extrait de grignons d'olive peut être un agent anti-inflammatoire à base de plantes efficace.

Des extensions des résultats de cette étude seraient des études in vivo visant à identifier les extraits de grignon d'olive les plus appropriés pour prévenir et / ou protéger les érythrocytes contre la peroxydation et l'hémolyse induites par les radicaux libres.

1. Afzal F, Adnan M, Rahman I, Noor M, Khan A, Shah JA, Khan MA, Roman M, Wahid F, Nawaz S, Perveez R (2017). Growth response of olive cultivars to air layering. *Pure and Applied Biology*. 6: 1403-1409.
2. Albahari P, Jug M, Radić K, Jurmanović S, Brnčić M, Brnčić SR, Vitali Čepo D (2018). Characterization of olive pomace extract obtained by cyclodextrin-enhanced pulsed ultrasound assisted extraction, *LWT - Food Science and Technology*. 92: 22-31
3. Alhakmani F, Kumar S, Khan SA (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 3: 623-627.
4. Aliakbarian B, Casazza AA, Perego P (2011). Valorization of olive oil solid waste using high pressure–high temperature reactor. *Food Chemistry*. 128 : 704–710.
5. Aliakbarian B, Sampaio FC, De Faria JT, Gpitangui C, Lovaglio F, CasazzaAA, Converti A, Perego P (2018). Optimization of Spray Drying Microencapsulation of Olive Pomace Polyphenols Using Response Surface Methodology and Artificial Neural Network. *LWT - Food Science and Technology*. 93: 220–228.
6. Alves E, Melo T, Barros MP, Domingues MRM, Domingues P (2019). Lipidomic Profiling of the Olive (*Olea europaea* L.) Fruit towards Its Valorisation as a Functional Food: In-Depth Identification of Triacylglycerols and Polar Lipids in Portuguese Olives. *Molecules*, 24: 2555
7. Anosike CA, Obidoa O, Ezeanyika L (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). Anosike et al. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 20: 76.
8. Belaid C, Kallel M, Elleuch B (2002). Identification De Nouveaux Composés Phénoliques Présents Dans Les Rejets Liquides d’huileries d’olive (Margines). *Déchets – revue francophone d’écologie industrielle*. 27 :30- 34.
9. Bouhlali EDT, Sellam K, Bammou M, Alem C, Filali-zehzouti Y (2016). In vitro Antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6 : 156-162.
10. Breton C, Pinatel C, Médail F, Bonhomme Fr, Berville A (2008). Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms. *Plant Science* 175: 524–532.

11. Bulmus V, Woodward M, Lin L, Murthy N, Stayton P, 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 : 105-120.
12. Cardoso SM, Guyot S, Marnet N, Lopes-da-Silva JA, Renard C, Coimbra MA (2005). Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *J Sci Food Agric*. 85:21–32.
13. Centre d'activités régionales pour la proper (CAR/PP) plan d'action pour la méditerranée (2000). Prévention de la pollution dans la production d'huile d'olive. Ministère de l'environnement Espagne. Pp 140.
14. Chandra S, Chatterjee P, Dey P, 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.
15. Chanioti S, Tzia C (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. 48: 228-239.
16. Christoforou E, Fokaides PA (2016). A review of olive mill solid wastes to energy utilization techniques. *Waste Management*. Volume 49, March 2016, Pages 346-363
17. Cioffi G, Pesca MS, De Caprariis P, Braca A, Severino L, De Tommasi N (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry* 121: 105–111.
18. Conterno L, Martinelli F, Tamburini M, Fava F, Mancini A, Sordo M, Pindo M, Martens S, Masuero D, Vrhovsek U, Dal Lago C, Ferrario G, Morandini M, Tuohy K (2019). Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Nutr*. 58:63–81.
19. Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Moulti-Mati F, Michaud P (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*. 48: 1532–1552.
20. Ducom G, Gautier M, Pietraccini M, Tagutchou JP, Lebouil D, Dumont N, Gourdon R (2019). Caractérisation de grignons d'olives en vue d'une valorisation thermo-chimique par gazéification. *Déchets Sciences et Techniques*. 82 :42- 54.
21. Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazza E, Izzo AA, Novellino E, Santini A (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*. 1–23.
22. Fidelis M, do Carmo MAV, da Cruz TM, Azevedo L, Myoda T, Furtado MM, Marques MB, Sant'Ana AS, Genovese MI, Oh WY, Wen M, Shahidi F, Zhang L, Franchin

- M, de Alencar SM, Rosalen PL, Granato D (2019). Camu-camu seed (*Myrciaria dubia*) - from side stream to antioxidant, antihyperglycemic, antiproliferative, antimicrobial, antihemolytic, anti-inflammatory, and antihypertensive ingredient. doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125909. 310, 125909.
23. Fidelis M, Santosa JS, Eschera GB, Rochab RS, Cruzb AG, Cruzc TM, Marquesc MB, Nunesd JB, do Carmoe MAV, de Almeidaf LA, Kaneshimag T, Azevedoe L, Granato D (2020). Polyphenols of jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O.Berg] seeds incorporated in a yogurt model exert antioxidant activity and modulate gut microbiota of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Food Chemistry*. 334: 127565.
24. Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*. 15: 8813-8826
25. Han X, Shen T, Lou H (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int. J. Mol. Sci*. 8: 950-988.
26. Hashmi MA, Khan A, Hanif M, Farooq U, Perveen S (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2015, Article ID 541591, 29 pages
27. Johri S, Khan N (2017). In vitro Antioxidant and Antihemolytic Potential of *Triticum aestivum* Grass. *Int J Complement Alt Med*. 9: 00310.
28. Johri S, Khan N (2017). In vitro Antioxidant and Antihemolytic Potential of *Triticum aestivum* Grass. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*. 9: 00310.
29. Klen TJ, Wondra AG, Vrhovšek U, Vodopivec BM (2015). Phenolic Profiling of Olives and Olive Oil Process-Derived Matrices Using UPLC-DAD-ESI-QTOF-HRMS Analysis. *J. Agric. Food Chem*. 63: 3859–3872.
30. Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A, Pougna JL, Perrin C (2016). Hemolysis by surfactants — A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 228:1–16.
31. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 79: 727–47.
32. Martin KR, Appel CL (2010). Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements*: 2 1–12

33. Mennan Z, Tada S, Aki I, Faid M, Hassani S, Salmaoui S (2010). Caractérisation physico-chimique et microbiologique des grignons d'olive de 26 huileries traditionnelles de la région de Beni Mellal (Maroc). *Les technologies de laboratoire*. 5, N°19 : 4- 9.
34. Mezzour H, Belhaj Khelifa A, Neffati F, Douki W, Ben Amor A, Najjar MF (2006). Détermination de l'hémoglobine plasmatique et évaluation spectrophotométrique de l'hémolyse en Biochimie Clinique. *Revue francophone des laboratoires*. 386 : 59- 64.
35. Mohammedi Z, Atik F (2014). Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 5: 495- 500.
36. Morsi MKS, Galal SM, Alabdulla O (2016). Antioxidative Activity of Olive Pomace Polyphenols Obtained by Ultrasound Assisted Extraction. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. 10: 95-100.
37. Mushtaq A, Asif Hanif M, Adnan Ayub M, Bhattil IA, Romdhane M (2020). Olive. Chapitre 40. *Medicinal Plants of South Asia*. 541-555. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00040-9>
38. Nabavi SM, Nabavi SF, Setzer WN, Alinezhad H, Zare M, Naqinezhad A (2012). Interaction of Different Extracts of *Primula heterochroma* Stapf. with Red Blood Cell Membrane Lipids and Proteins: Antioxidant and Antihemolytic Effects. *Journal of Dietary Supplements*. 9:285–292.
39. Oyedapo OO, Akinpelu BA, Akinwunmi KF, Adeyinka MO, Sipeolu FO (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantanacamera* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2: 46-51.
40. Paini M, Casazza AA, Aliakbarian B, Perego P, Binello A, Cravotto G (2016). Influence of ethanol/water ratio in ultrasound and high-pressure/ high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. *International Journal of Food Science and Technology*. 51: 349–358.
41. Pawlikowska-Pawlega B, Gruszeckib WI, Misiakb LE, Gawrona A (2003). The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochemical Pharmacology*. 66: 605–612.
42. Qdais HA, Alshraideh H (2014). Selection of management option for solid waste from olive oil industry using the analytical hierarchy process. *J Mater Cycles Waste Manag*. DOI 10.1007/s10163-014-0321-3, pp 09.
43. Roig A, Cayuela ML, Sanchez-Monedero MA (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26 : 960–969.

44. Sadique J, Al-Rqobah WA, Bughaith MF, El-Gindy AR (1989). The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*. 60: 525-532.
45. Saleem A, Saleem M, Akhtar M F, Sharif A, Javaid Z, Sohail K (2019). In vitro and in vivo anti-arthritis evaluation of *Polystichum braunii* to validate its folkloric claim. *Pak. J. Pharm. Sci.* 32: 1167-1173.
46. Sharma A, Goyal R, Sharma L (2016). Potential biological efficacy of *Pinus* plant species against oxidative, inflammatory and microbial disorders. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:35.
47. Speroni CS, Stiebe J, Guerra DR, Beutinger Bender AB, Ballus CA, dos Santos DR, Dal Pont Morisso F, Picolli da Silva L, Emanuelli T (2019). Micronization and granulometric fractionation improve polyphenol content and antioxidant capacity of olive pomace. *Industrial Crops & Products*. 137: 347–355.
48. Sridevi G, Sembulingam K, Muhammed I, Srividya S, Prema S (2015). Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of *pergularia daemia*. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4:1100-1108.
49. Umopathy E, Ndebia EJ, Meeme A, Adam B, Menziwa P, Nkeh-Chungag BN, Iputo JE (2010). An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4:789-795.
50. Williams LAD, Connar A O, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker JA, Conrad J, Vogler B, Rosner H, 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: 327- 331.
51. Zaidi F, Hassissene N, Allouache H, Kichou M, Ourdani S, Rezki K, Bellal MM, Grongnet JF, Youyou A (2009). Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *Revue Méd. Vét.* 160 : 67-73.
52. Zhang L, Santos JS, Cruzc TM, Marques MB, do Carmo MAV, Azevedo L, Wang Y, Granato D (2019). Multivariate effects of Chinese keemun black tea grades (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) on the phenolic composition, antioxidant, antihemolytic and cytotoxic/cytoprotection activities. *Food Research International*. 125: 108516.

Tableau A1 : Pourcentage d'hémolyse des globules rouges par l'acide gallique, l'extrait éthanolique et méthanolique des grignons d'olive délipidé.

Concentration	125µg/ml	250µg/ml	500µg/ml	1000µg/ml
Acide gallique	13.40%	21.30%	34%	80%
E.méthanolique	7%	9%	25%	68%
E.éthanolique	7%	10%	18%	30%

Tableau A2 : effet anti-hémolytique entre l'acide gallique, le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanolique des grignons d'olive délipidé.

Concentration	10µg/ml	30µg/ml	75µg/ml	150µg/ml	300µg/ml
Acide gallique	37%	60%	82%	79%	52%
Diclofénac	21%	30%	54%	72%	80%
E.méthanolique	69%	71%	73%	73%	74%
E.éthanolique	26%	58%	62%	66%	70%

Tableau A3 : Inhibition de la dénaturation protéique par le Diclofénac et les extraits méthanolique et éthanoliques de grignon d'olive délipidé

concentration	250 pg/ml	250 ng/ml	250µg/ml
Diclofénac	69%	75%	89%
E.méthanolique	78%	98%	99%
E. éthanolique	79%	99%	99%

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:

الهوامش و النفل مخلفات من صناعة الزيتون . انتاج النفل العالمي يقدر بنحو 2.9 مليون طن مما يؤدي الى تلوث ضار بالبيئة , و من هنا تأتي أهمية تعزيز هذا المنتج الثانوي بالمركبات الفينولية ; في هذا السياق الهدف من هذا العمل هو تقييم السمية و مضادات انحلال الدم و مضادات التأثيرات الالتهابية لثفل الزيتون عن طريق الاختبارات المعملية باستخدام مذيبيات الاستخلاص البولي فينول و الميثانول و الايثانول ; و كلا المستخلصين اعطيا عوائد جيدة.

النتائج التي تم الحصول عليها اظهرت ان التأثير المضاد لانحلال الدم للمستخلصات مهم جدا حتى في المستويات المنخفضة تركيز (10 ميكروغرام/مل) علاوة على ذلك فان التأثير المضاد للالتهابات مهم عند التركيز العالي (250 ميكروغرام / مل) وهو ضعيف عند التركيز المنخفض . قد يكون لهذه المقتطفات تأثير سام للخلايا في تركيز عال (1 مجم / مل). سمحت لنا هذه الدراسة باستنتاج أن ثفل الزيتون ليس كذلك ليس فقط النفايات الضارة ، ولكن يمكن استخدامها في مجالات مختلفة ، بسبب التراكيب المثيرة للاهتمام التي لها خصائص بيولوجية مهمة.

الكلمات المفتاحية : ثفل الزيتون ، تأثير مضاد للدم ، تأثير مضاد للالتهابات ، مركبات الفينولات والسمية.

